

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MEXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIERREZ

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

**DIVERSIDAD DE RHIZOBACTERIAS ASOCIADAS A LA
LEGUMINOSA ARBUSTIVA *Ormosia macrocalyx* Y SU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

PRESENTA

JOSEFA TRINIDAD COUTIÑO MEGCHÚN

ASESOR INTERNO:

DR. REINER RINCÓN ROSALES

CONTENIDO

	PAG
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE CUADROS	ii
RESUMEN	iii
I.-INTRODUCCION	1-2
II.- MARCO TEORICO	3-24
2.1.- Aspectos biológicos de <i>Ormosia macrocalyx</i>	3
2.1.1.- Características botánicas	3-5
2.1.2.- Clasificación taxonómica	6
2.1.3.- Distribución de <i>Ormosia macrocalyx</i>	7
2.1.4.- Usos e importancia	8
2.2.- Simbiosis leguminosa-microorganismo	8
2.2.1.- Asociación de la leguminosa con sus simbioses	8-10
2.3.- Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)	10-15
2.3.1.- Biología de las BPCV	10
2.3.2.- Clasificación de las BPCV	11
2.3.3.- Empleo de las BPCV como fertilizantes	11
2.3.3.1.- Capacidad para tolerar temperatura extremas	12
2.3.3.2.- Capacidad para tolerar diferentes concentraciones de salinidad (NaCl).	13-14
2.3.3.3.- Tolerancia a diferentes niveles de pH	14
2.3.3.4.- Resistencia Intrínseca a los Antibióticos	14-15
2.4.- Herramientas moleculares y genéticas para el estudio de las Comunidades bacterianas.	15-16
2.4.1.- Empleo de los genes cromosomales	16
2.4.1.1.- El gen 16S como marcador universal	16-17
2.4.2.- Huellas genómicas bacterianas	17
2.4.2.1.- Estudio de las huellas genómicas mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	17-18
2.4.2.2.- Tipos de huellas genómicas y su importancia	18
2.4.2.2.1.- Secuencias repetitivas Enterobacterial Consensus (ERIC_PCR)	18-19
2.4.2.2.2.- Analisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)	19-20
2.4.3.- Analisis filogenético	20
2.4.3.1.- Filogenia	20-22
2.4.3.2.- Construcción de un análisis filogenético	22-23
2.4.3.3.-Tipos de análisis filogenéticos	23-24
III.- JUSTIFICACION	25
IV.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
V.- OBJETIVOS	27
VI.-HIPOTESIS	27

VII.- MATERIALES Y METODOS	28-37
7.1.- Ubicación del sitio de muestreo	28
7.2.- Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas	29
7.3.- Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas	29
7.3.1.- Estudio de la morfología de las colonias bacterianas en medio de cultivo PY- calcio	29-30
7.3.2.-Pruebas fisiológicas de las cepas bacterianas	30
7.3.2.1.- Tolerancia a diferentes grados de temperatura	30
7.3.2.2.- Tolerancia a diferentes niveles de pH	30
7.3.2.3.- Tolerancia a la salinidad por NaCl	30
7.3.2.4.- Resistencia Intrínseca a Antibióticos	31
7.4.- Caracterización genotípica de las cepas bacterianas	32
7.4.1.- Extracción de ADN genómico bacteriano	32
7.4.2.- Huellas genómicas ERIC_PCR	33-34
7.4.3.- Amplificación del gen cromosomal 16S ARNr	34-35
7.4.4.- Perfil de huellas genómicas ARDRA	35-36
7.4.5.- Purificación y secuenciación del gen 16s rRNA	36
7.4.6.- Análisis filogenético	36-37
VIII.-ALCANCES Y LIMITACIONES	37
IX.-RESULTADOS Y DISCUSIONES	38-56
9.1.- Características del sitio de colecta	38
9.2.- Características fenotípicas	39
9.2.1.- Características celulares bacterianas	39-40
9.2.2.- Morfología de las colonias en medio PY-calcio	41-42
9.3.- Aspectos fisiológicos de las cepas bacterianas	43
9.3.1.- Tolerancia a diferentes grados de temperatura	43
9.3.2.- Tolerancia a diferentes niveles de pH	44
9.3.3.- Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad	45
9.3.4.- Resistencia Intrínseca a los antibióticos	46
9.4.- Características genotípicas de las cepas bacterianas	47
9.4.1.- ADN genómico bacteriano	47
9.4.2.- Perfil de huellas genómicas ERIC_PCR	48-50
9.4.3.- Amplificación del gen 16S rRNA	51
9.4.4.- Perfil de huellas genómicas ARDRA	52-53
9.4.5.- Análisis filogenético	54-56
X.- CONCLUSIONES	57
XI.- COMPETENCIAS DESARROLLADAS	58
XII.- RECOMENDACIONES	59
XIII.- LITERATURA CONSULTADA	60-65

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura		PAG
1	Fotografía de la flor de la leguminosa arbórea	3
2	Fotografía de los frutos de <i>Ormosia macrocalyx</i>	4
3	Fotografía de las semillas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	4
4	Ubicación geográfica de la Leguminosa arbustiva <i>Ormosia macrocalyx</i>	7
5	Mecanismos de nodulación	10
6	Construcción de un árbol filogenético	23
7	Ubicación del sitio de colecta	28
8	Programa usado en el termociclador para ERIC_PCR	34
9	Programa usado en el termociclador para la amplificación del gen 16S rRNA	35
10	Extracción de ADN genómico de cepas puras.	47
11	Perfil de huellas genómicas ERIC_PCR	48
12	Amplificación del gen 16S rRNA	51
13	Perfil de huellas genómicas ARDRA 1	52
14	Perfil de huellas genómicas ARDRA 2	52
15	Árbol filogenético de las cepas aisladas	55

ÍNDICE DE CUADROS

No. Cuadros		PAG
1	Composición del medio PY-calcio	29
2	Valores para la interpretación de la prueba de antibióticos	31
3	Carga de reacción para la prueba de ERIC_PCR	33
4	Mezcla de reactivos del gen 16S rRNA	34
5	Mezcla de reacción para la prueba ARDRA	35
6	Características fenotípicas de las cepas por Tinción de Gram	39-40
7	Morfología de las colonias de las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	41-42
8	Características de crecimiento variando la temperatura de las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	43
9	Características de crecimiento variando el pH de las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	44
10	Características de crecimiento variando las concentraciones de NaCl de las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	45
11	Prueba de antibióticos a las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	46
12	Clasificación de los grupos ERIC_PCR	48-50
13	Agrupamiento de las cepas mediante la prueba de ARDRA	53
14	Cepas representativas con un porcentaje de similitud con las cepas aisladas de <i>Ormosia macrocalyx</i>	54

RESUMEN

Las plantas comúnmente se asocian con una diversidad de microorganismos para adquirir nutrientes que mejoran su crecimiento y desarrollo. Las bacterias que habitan en el suelo pueden adherirse a las raíces o penetrar al interior de los tejidos de las plantas y contribuir en la captación de nutrientes esenciales, tales como el nitrógeno y fósforo, y también coadyuvan en la sanidad de la planta. En este trabajo, se presenta información relacionada con la diversidad de bacterias asociadas a la leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx*, que crece en los bosques tropicales en el sureste de México. Las cepas fueron aisladas de nódulos de las raíces de las plántulas que crecen en su ambiente natural y posteriormente cultivadas en medios PY-calcio y YEMA. Las cepas fueron caracterizadas fenotípicamente mediante análisis microscópico, pruebas fisiológicas y bioquímicas. La identificación taxonómica de las cepas aisladas se realizó mediante el empleo del marcador molecular 16S rRNA, el estudio de las huellas genómicas ERIC y ARDRA, y análisis filogenético. También la capacidad de inhibición de hongos fitopatógenos fue estudiada, a través de pruebas antagónicas in-vitro. Un total de 140 cepas fueron aisladas de los nódulos de *O. macrocalyx*. El análisis microscópico permitió observar una diversidad de formas celulares, pero principalmente predominó la forma de bacilos pequeños y coco-bacilos. En el medio de cultivo PY-calcio, las cepas presentaron un rápido crecimiento, una variedad de tonalidades y principalmente tuvieron la capacidad para producir exopolisacáridos. El análisis filogenético permitió agrupar las cepas en 7 diferentes géneros: *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Novosphingobium*, *Pantoea* y *Paenibacillus*. La mayor parte de los aislados mostraron capacidad crecer a diferentes concentraciones de salinidad, temperatura y pH. También mostraron resistencia a los antibióticos evaluados. Las cepas del género *Pantoea* y *Sinorhizobium* tuvieron capacidad para fijar nitrógeno. Esta investigación permitió determinar que la leguminosa arbustiva *O. macrocalyx* se asocia con una amplia variedad de especies bacterianas con gran potencial biotecnológico, considerando sus cualidades biológicas, bioquímicas y moleculares, así como su capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos.

I. INTRODUCCION

La diversidad biológica terrestre de México comprende una gran variedad de paisajes y de comunidades vegetales que cubren el territorio del país. Se han propuesto muy diversas clasificaciones para regionalizar el territorio, que varían con la escala, los criterios y enfoques. La familia de plantas leguminosas se compone de más de 17, 000 especies en aproximadamente 650 géneros pertenecientes a 41 tribus y 3 subfamilias (**Polhill y Cuervo, 1981**). El género *Ormosia* fue descrito por primera vez por G. Jackson en 1810. El nombre proviene de la palabra griega "Hormos" (collar), que se refiere a los collares hechos por los pueblos indígenas de las semillas rojas y/o negras duras. Algunas especies de *Ormosia* son grandes árboles de la selva, pero algunas son pequeñas e incluso escandentes (**Rudd, 1965**). Esta especie de leguminosa arbustiva que crece en selvas tropicales, desde el sur de México hasta el norte y el oeste de Sudamérica. En Chiapas y Tabasco, esta leguminosa es muy apreciada por las comunidades Mayas por la calidad de su madera, su follaje y por sus semillas que son utilizadas en trabajos artesanales. Como la gran mayoría de las plantas, el éxito de la germinación y establecimiento de plántulas en el medio natural está determinado por factores bióticos como la densidad, depredadores y patógenos (especialmente hongos), y por factores abióticos como la disponibilidad de luz, agua, temperatura y nutrientes del suelo (**Harms y Paine, 2003**). Solo cuando las condiciones abióticas son adecuadas, se inicia el proceso de germinación como parte de sus estrategias adaptativas (**Figueroa, 2000**). Actualmente estos factores se han visto gravemente afectados debido a la transformación de los bosques nativos en áreas ganaderas, agrícolas y urbanas, al igual que los problemas de deforestación, las condiciones ambientales, así como los incendios que han contribuido en la simplificación, degradación y desaparición de las poblaciones de la leguminosa *O. macrocalyx* (**Vazquez-Yanes y Orozco-Segovia, 1992; Lanly, 2003**), a tal grado que la SEMARNAT bajo la NOM-059, la ha considerado como una especie en peligro de extinción. Debido a lo anterior, es necesaria la propagación de esta especie nativas para el enriquecimiento, la reforestación y la restauración de las áreas afectadas.

Sin embargo, cuando las plántulas se encuentran cultivadas en condiciones de invernadero, son frecuentemente, atacadas por hongos fitopatógenos, los que ocasionan pudrición severa en las raíces y daños a las hojas, provocando lento crecimiento y alto índice de mortalidad. Esta situación obliga al empleo de fungicidas y fertilizantes químicos con poco éxito y por el contrario incrementan la contaminación del ambiente. Para superar este problema, es posible utilizar bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son comúnmente utilizadas como biofertilizantes; considerando la capacidad de estos microorganismos para sintetizar sustancias reguladoras del crecimiento (auxinas, giberelinas, etc.) y potencial antagónico contra hongos fitopatógenos en diversos cultivos con éxito.

Bacterias, agrupadas en los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Serratia*, entre otras, son consideradas como BPCV y estudios relacionados con sus características biológicas y su potencial como inoculantes han incrementado en los últimos años. En este trabajo, se presenta información sobre las características fenotípicas y genotípicas de bacterias asociadas con la leguminosa *Ormosia macrocalyx* y su potencial uso como biofertilizante.

II. MARCO TEORICO

2.1 Aspectos biológicos de *Ormosia macrocalyx*

2.1.1 Características botánicas

Árbol de 12 a 23 m de altura, de 35 a 60 cm en grosor; a veces con pequeños contrafuertes; ramas jóvenes blanco-seríceas. Su corteza externa café amarillenta, moderadamente lisa, albura blanca amarillenta. Sus hojas compuestas imparipinnadas, alternas, con 7 folíolos largo peciolados, de 6 a 12 mm de largo por 3-4.5 de ancho, oblongos u ovado oblongos, ápice obtuso a base redondeada o muy obtusa, casi glabros; nervaduras más o menos prominentes en ambas superficies. Las flores son en panículas terminales con racimos laxos, las ramas densamente gris-seríceas, flores de colores morado claro, zigomorfos, cáliz densamente seríceo, agudo en la base. Las flores presentan un aroma muy penetrante lo que hace que sea fácilmente percibido por los insectos polinizadores (Pérez, 2009).



Figura 1.- Fotografía de la flor de la leguminosa arbórea *Ormosia macrocalyx*.

Los frutos son en vainas de color castaño, o negruzco, de 2.3-3.5 cm de largo x 2.5 cm de ancho, con constricciones entre las semillas, glabro con la edad, las valvas leñosas, sus márgenes engrosados y acostillado, con 1-2 semillas. (Pérez, 2009).



Figura 2.- fotografía de los frutos de *Ormosia macrocalyx*.

Las semillas son de color escarlata, de 1 cm de largo, muy lustrosas; su embrión consta de un par de cotiledones de almacenamiento, un par de paracotiledones, endospermo y su eje embrionario. Un kg de semilla contiene 2070-2096 unidades con un contenido de humedad del 13.5% (Sautu et al., 2006).



Figura 3.- fotografía de las semillas de *Ormosia macrocalyx*.

GERMINACIÓN: De acuerdo a la clasificación de **Ibarra-Manríquez et al. (2001)**, su germinación es fanerocotilar hipógea con cotiledones de reserva, en los viveros locales, inicia su germinación a los 8 días y a los 40 días se obtiene un 73.3%, previo remojo de 72 horas. La imbibición de la semilla inicia prontamente, posteriormente la radícula rompe la cubierta seminal y crece hasta alcanzar unos dos cm, el hipocótilo se desarrolla para descubrir los cotiledones de reserva, los cuales se quedan en la base del epicótilo, a los 12 días después de la germinación, se desarrollan los paracotiledones, los cuales tienen una longitud de 2.5 cm. Estos se caracterizan por tener un limbo ovado, ápice aristado y una base atenuada.

Las plántulas se desarrollan mejor en una sombra del 80%, aunque se considera que es una especie demandante de luz para su posterior crecimiento (**Pérez, 2009**). La mejor respuesta al porcentaje y en la velocidad de la germinación se obtiene con semillas almacenadas, puede ser porque esto se relaciona con cambios en las propiedades de las cubiertas que dan lugar a un aumento en la permeabilidad de los gases y disminución en la resistencia mecánica que opone y facilita la lixiviación de los inhibidores o de los tejidos internos de las semillas (**Camacho, 1994**). Para alcanzar un porcentaje de germinación de 78% se realiza una escarificación mecánica (lijado) + AG_3 aplicado (100 mg L^{-1} de AG_3 al 10%). Según, **Sautu et al. (2006)**, el tiempo promedio de germinación es de 9 días, obteniéndose un porcentaje de 50, su germinación finaliza en la 19^a semana.

2.1.2 Clasificación taxonómica

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Papilionoideae
Tribu:	Ormosieae
Género:	Ormosia
Especie	Macrocalyx

Nombre científico: *Ormosia macrocalyx* Ducke.

Nombre común: Caracolillo, Colorín

2.1.3 Distribución de *Ormosia macrocalyx*

La leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx* se distribuye desde el sureste de México, hasta el norte y el oeste de Sudamérica incluyendo Bolivia, Brasil, Perú, Barinas, Cojedes, Portuguesa, Zulia, Falcón y Amazonas. Esta especie crece principalmente en selvas bajas, a bajas y medianas elevaciones, bosques de galería, en bosques húmedos o muy húmedos y crece bien en climas tropicales (**Pérez, 2009**). Está presente en los bosques siempre verdes y en bosques secundarios. (**Llamoza et al., 2003**), En Tabasco, se puede localizar poblaciones de esta leguminosa en los municipios de Centla, Centro, Tacotalpa, Cárdenas, Teapa y Balancán, formando parte de la estructura boscosa de las selvas tropicales perennifolias (Figura 4). En Venezuela Florece en diciembre y presenta frutos todo el año (**Llamoza et al., 2003**). En Panamá florece y fructifica de junio a enero. Las semillas son dispersadas por diversos mamíferos y aves. Los árboles de esta especie mantienen su follaje de forma permanente. (**Roman F. et al 2012**)

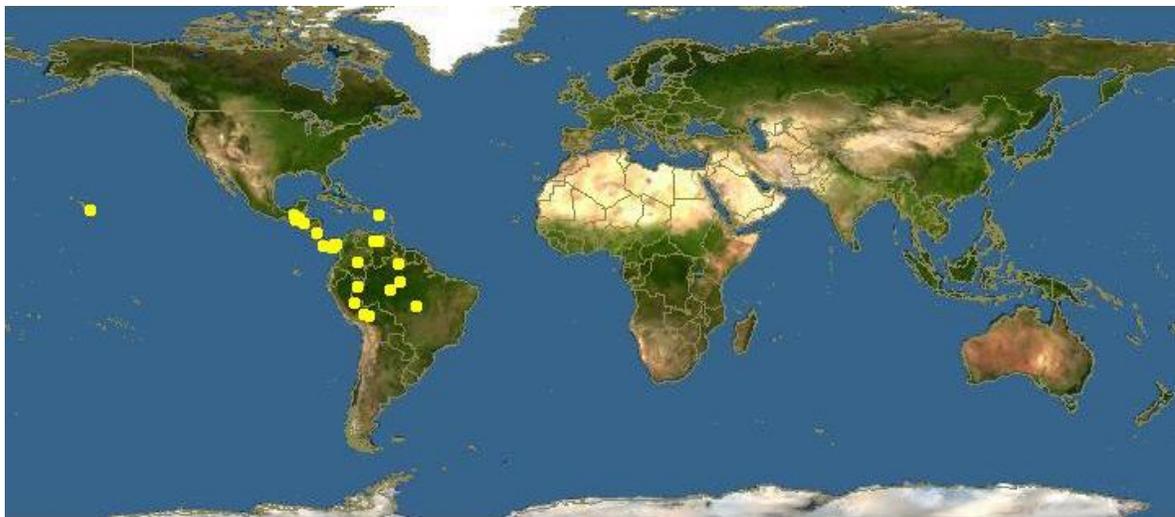


Figura 4. Ubicación Geográfica de la leguminosa arbustiva

2.1.4 Usos e importancia

En tabasco la madera de *Ormosia macrocalyx* es utilizada como vigas en construcciones de casas, también para la fabricación de canoas. Su follaje se emplea como sombra para ganado en los potreros y las semillas para confeccionar artículos artesanales (**Pérez, 2009**).

En panamá y Neotrópico *Ormosia macrocalyx* es común como planta ornamental en parques y avenidas. La madera se utiliza en la ebanistería, en la carpintería para la elaboración de muebles y pisos, quillas de barcos, tornería, puentes y durmientes de ferrocarril. Con las semillas se fabrican collares y aretes, se usa generalmente para agroforestería (fijación de nitrógeno) y ornamental. (**Roman F. et al 2012**)

En Venezuela esta especie es considerada “vulnerable” ya que la principal amenaza se relaciona con la explotación de su madera, las semillas son muy apreciadas para elaborar collares, pulseras, rosarios, aretes, cortinas y adornos artesanales. (**Llamoza et al., 2003**).

2.2 Simbiosis Leguminosa-microorganismo

2.2.1 Asociación de la leguminosa con sus simbiosis

La asociación simbiótica de las bacterias fijadoras de nitrógeno con las raíces de las plantas, generalmente se lleva a cabo en estructuras multicelulares llamadas nódulos. El intercambio de señales moleculares entre el microbio y el hospedero, puede ser ejemplificado por medio de las relaciones simbióticas, como las de las bacterias fijadoras de nitrógeno Gram- negativas del género *Rhizobium* y las plantas de la familia Leguminosae. Esta interacción ha sido objeto de numerosos estudios durante casi un siglo. *Rhizobium* infecta y nodula a un hospedero con cierta especificidad y la velocidad de su crecimiento ha determinado que se le divida en dos generos: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

El establecimiento de este tipo de simbiosis *Rhizobium- leguminosa*, es un proceso muy complejo que puede resumirse en los siguientes pasos:

- 1.- La bacteria migra hacia la rizosfera (área que rodea íntimamente a la raíz), por medio de una respuesta quimiotáctica, probablemente mediada por atrayentes, del tipo

flavonoide que la raíz secreta. De este modo la bacteria puede reconocer a su hospedero. Los rizobios han evolucionado de tal modo que pueden utilizar estos flavonoides como reguladores positivos de los genes involucrados en la nodulación (genes *nod*).

2.- La bacteria infecciosa secreta ciertos factores que estimulan las divisiones celulares subepidérmicas en la raíz. Estas células en división, determinan la formación de pelos radicales que se convierten en blanco para la infección. La bacteria se fija al pelo radical del hospedero o a ciertas células de la raíz, genéticamente predispuestas a convertirse en pelos radicales. Esta, ya fijada, induce el enroscamiento del pelo radical, lo cual parece ser importante para la iniciación del proceso de infección.

3.- El hospedero, que también es capaz de reconocer a la bacteria, deposita nuevo material en la pared celular apuesta al punto donde el rizobio se encuentra fijado en el enroscamiento del pelo radical.

4.- El nuevo material de la pared es utilizado para formar una estructura tubular llamada filamento de la infección.

5.- Una hilera de rizobios se introduce al filamento de infección, el cual crece hasta la base del pelo radical.

6.- Las células de la corteza de la raíz empiezan a dividirse y diferenciarse como tejido nodular.

7.- El filamento de infección pasa a través de la pared celular del pelo radical y empieza a ramificarse hacia la zona adyacente de células corticales que están en plena división y diferenciación.

8.- Las bacterias son liberadas del filamento de infección hacia el citoplasma de las células de la corteza y son rodeadas por una membrana peribacteroide formada por el hospedero.

9.- *Rhizobium* adquiere formas irregulares singulares conocidas como bacteroides, las cuales son capaces de reducir el nitrógeno atmosférico en amoníaco, es cual es aprovechado por la planta para su crecimiento y desarrollo.

10.- Las proteínas nodulares específicas del hospedero leghemoglobina y nodulina también son inducidas en una etapa temprana del proceso de infección.

El éxito del establecimiento de una relación simbiótica efectiva, requiere de un intercambio de señales célula- célula.

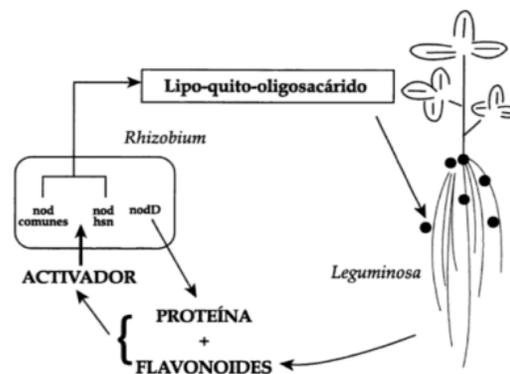


Figura 5.- Mecanismo de nodulación de una leguminosa por *Rhizobium*

2.3 Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

2.3.1 Biología de las BPCV

Las Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (BPCV) (Kloepper et al. 1980), son microorganismos de vida libre que viven en la rizósfera o rizoplano, en estrecho contacto entre raíces- suelo- microorganismo. Realizan funciones, tales como: estimular la síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento. Fijar nitrógeno, solubilizar los nutrientes, producir sideróforos y controlar los fitopatógenos del suelo. Razón por la cual, las BPCV en la agricultura se postulan como alternativa prometedora para reducir el uso de agroquímicos (Lemanceau et al., 2008). Estas una vez inoculadas a las semillas, inducen la germinación, colonizan la raíz, y transforman los exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal, mediante un tipo de estimulación muy similar a las fitohormonas comerciales. En este proceso ocurre la proliferación de pelos radicales, el

incremento en la absorción mineral de nutrientes (nitrógeno, fósforo y hierro), entre otros efectos (**Mallik y Williams, 2008**).

2.3.2 Clasificación de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV)

Las BPCV pueden clasificarse en dos grupos:

- Bacterias promotoras de crecimiento en plantas, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos. Los mecanismos que estas bacterias utilizan pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la captación de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o “ayudando” a otros microorganismos benéficos para que actúen de mejor manera sobre las plantas (Bashan y Holguín, 1998).
- Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos.

2.3.3 Empleo de las BPCV como fertilizante

Desde su re-descubrimiento por Döbereiner y colaboradores (**Döbereiner et al., 1976**), las especies de *Azospirillum* son las BPCV más estudiadas. A pesar de muchos experimentos exitosos, tanto en condiciones de invernadero como de campo, su aplicación a gran escala no ha sido fácil, debido a problemas como la inconsistencia y lo poco previsible de los resultados obtenidos en campo, especialmente cuando los agricultores tienen poco tiempo o conocimiento acerca de la inoculación con bacterias (**Okon y Labandera, 1994**). Este hecho ha desanimado a los cultivadores y a la industria. Sin embargo, durante los últimos años varios inoculantes comerciales producidos a pequeña escala han entrado lentamente en el mercado internacional, tanto en Europa como en Sur América. Además de su aplicación

directamente en agricultura, *Azospirillum* se ha convertido en un excelente modelo para los estudios genéticos de bacterias asociadas a plantas en general.

El mayor volumen de literatura sobre *Azospirillum* consiste en estudios genéticos en casi todos los aspectos de la bacteria, y su asociación con las plantas. Debido a esto, *Azospirillum* constituye la piedra angular de las investigaciones relacionadas con la rizósfera, a pesar de su cuestionable aplicación en campo. Adicionalmente, aplicaciones diferentes a la agrícola, como la producción de poli-beta-hidroxibutirato para usos médicos, degradación de contaminantes, producción de vitaminas y tratamiento de aguas residuales, están introduciéndose lentamente (Holguin et al., 2001; Puente et al., 2004).

2.3.3.1- Capacidad de microorganismos para tolerar temperaturas extremas

Es uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la proliferación y mantenimiento de la vitalidad de los microorganismos. Cada bacteria tiene su propia temperatura mínima por debajo de la cual no puede proliferar, temperatura óptima en la cual el crecimiento es más rápido y temperatura máxima por encima de la cual no puede multiplicarse. Así, es posible distinguir tres grupos de microorganismos según el rango de temperatura en el que es posible su multiplicación: psicrófilas, crecen entre -5 y 30°C, temperatura óptimo de 15°C; mesófilas, crece entre 10 y 45°C, con el óptimo a los 30°C y termófilas, que crecen entre 25 y 80°C, con el óptimo en 55°C. En el laboratorio se puede determinar la temperatura óptima de crecimiento, sembrando el microorganismo en estudio en un medio de cultivo adecuado e incubándolo a diferentes temperaturas, para después evaluar los rendimientos obtenidos en las distintas condiciones. Si bien la mayoría de los microorganismos de interés médico son mesófilos, pueden existir diferencias entre las temperaturas de crecimiento óptimas de los mismos, siendo para la mayoría de 35 a 37°C.

2.3.3.2.- Capacidad para tolerar diferentes concentraciones de salinidad

Como resultado de la presencia de la membrana citoplasmica, las bacterias, igual que otras células, están sujetas a los fenómenos osmóticos. En general suelen ser bastante tolerantes. Muchas crecen en soluciones con un contenido en sales del 0.1 al 1%, pero otras denominadas halófilas (u osmofilas), pueden crecer a más altas concentraciones, incluso cerca de la saturación. La rápida exposición de bacterias a altas concentraciones salinas (2 a 25% de cloruro sódico) puede causar plasmolisis y únicamente algunas bacterias marinas dependen para su existencia de determinadas concentraciones salinas y se lisan cuando se les traslada del agua de mar a agua destilada (**Pumarola, 1990**).

Los microorganismos halófilos son aquellos que se encuentran en los ambientes hipersalinos, pero se diferencian de los halotolerantes porque son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sales que en su ausencia. Existe una amplia diversidad de estos microorganismos tanto en el Phylum procarionte como en el eucarionte; estos microorganismos tienen la capacidad de balancear su presión osmótica en relación con el medio y resistir los efectos nocivos de la sal. Dentro de los microorganismos halófilos hay una gran variedad de heterótrofos y metanógenos en el phylum Archaea, adaptados para resistir altas concentraciones de NaCl, mediante una serie de mecanismos moleculares, tales como enzimas que mantienen su actividad a concentraciones elevadas de sal, membranas púrpura que permite el crecimiento fotótrofo, sensores como rodopsina que regulan la respuesta fototáctica y vesículas de gas que promueven la flotación de las células.

Los microorganismos halófilos están ampliamente distribuidos en los medios hipersalinos (en zonas áridas hipersalinas, costas, diferentes profundidades del agua de mar, etc.). En los halófilos eucariontes hay microorganismos fotosintéticos, litótrofos y heterótrofos. (**DasSarma y Arora, 2001**).

Aunque las sales se requieren para todas las formas de vida, los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su

crecimiento: los halófilos ligeros muestran crecimiento óptimo dentro de una concentración de NaCl que oscila entre 0.2 y 0.85 M (2-5%): los halófilos moderados, crecen entre 0.85 y 3.4 M (5-20 %) de NaCl, y por último, los halófilos extremos, que crecen de 3.4 a 5.1 M (20-30%) de NaCl. En contraste, los organismos no halófilos sólo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos halófilos y halotolerantes pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales (DasSarma y Arora, 2001).

2.3.3.3.- Tolerancia a diferentes niveles de pH

Un pH adecuado es un factor esencial en el metabolismo y crecimiento de las bacterias. Cada microorganismo tiene un rango de pH en cual puede crecer y un pH óptimo bien definido. Según en el pH que se obtenga mayor rendimiento, encontramos microorganismos acidófilos, neutrófilos y alcalófilos, que crecen bien en pH ácidos, neutros y alcalinos respectivamente. Para la mayoría de las bacterias, el pH óptimo es de 7.2 a 7.6. Sin embargo, hay microorganismos, como *Mycobacterium tuberculosis* que resisten valores muy bajos de pH. Como los microorganismos al multiplicarse y realizar sus funciones metabólicas, suelen modificar el pH del medio, éste puede prepararse con amortiguadores de pH (buffer), los cuales mantiene el pH relativamente constante (Joklik et al., 1994).

2.3.3.4.- Resistencia Intrínseca a antibióticos

Se dice que las bacterias tienen una “resistencia intrínseca” a un antibiótico cuando sus características normales las vuelven inmunes al mecanismo de efecto del antibiótico. La resistencia intrínseca no se ve afectada por el abuso de los antibióticos. De hecho, es valiosa para determinar cuál antibiótico será el más eficaz en contra de determinado microbio. Por ejemplo, la membrana exterior de las bacterias Gram negativas las vuelve relativamente impermeables a los compuestos hidrofóbicos tales como los antibióticos macrólidos, confiriendo así una resistencia intrínseca a estos fármacos. Algunas bacterias

pueden también utilizar estrategias temporales en las que diferentes genes se expresan o se suprimen para permitir la supervivencia en presencia de los antibióticos, y los patrones de expresión regresan a la normalidad una vez que ha pasado la amenaza que representan esos fármacos en particular.

Por el contrario, las bacterias pueden adquirir resistencia a un antibiótico, adoptando una nueva característica a través de la mutación de genes o de la transferencia de material genético entre las bacterias. Las características adquiridas que pueden volver a las bacterias resistentes a un antibiótico incluyen cambios en la membrana bacteriana que evitan que los antibióticos entren en la célula. Las bacterias también pueden utilizar enzimas para descomponer los antibióticos, o pueden emplear “bombas de eflujo” para eliminar los antibióticos por completo o reducir su concentración por debajo de los niveles de eficacia.

Si una bacteria es capaz de desempeñar más de una de estas funciones, puede ser resistente a más de un tipo de antibióticos, lo que da como resultado una resistencia a multifármacos. (Farrell N. 2009)

2.4 Herramientas moleculares y genéticas para el estudio de las comunidades bacterianas.

Las bacterias son microorganismos con una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Para comprender la esencia de esta capacidad es importante conocer sus bases genéticas, es decir cómo está organizada la información genética, como realizan y regulan su expresión y que mecanismos de variación génica poseen.

El estudio de la diversidad genética se realiza para clasificar un individuo o población comparada con individuos u otras poblaciones, esta determinación puede basarse en información de tipo morfológica, bioquímica y molecular. Sin embargo, los marcadores moleculares han tomado ventaja sobre los otros tipos, en donde se muestran las diferencias genéticas en un nivel más detallado y sin interferencias de factores ambientales, en donde se involucran técnicas que proveen resultados rápidos detallando la diversidad genética.

(Binneck et al., 2010). Por otro lado el descubrimiento de plataformas de alto rendimiento incrementa el número de datos por corrida y reducen el costo de datos incrementando la resolución del mapa (Caliskan, 2012).

2.4.1 Empleo de genes cromosomales

Las técnicas del ADN recombinante nos ayudan a clasificar a los organismos de un modo más correcto, de acuerdo a su filogenia. Estos estudios podemos hacerlos estudiando la secuencia total de nucleótidos del genoma del microorganismo, pero actualmente se utilizan los estudios del rRNA 16S o 18S, porque son secuencias que se han mantenido bastante uniformes a lo largo de la evolución, y por eso se ven claramente las diferencias entre los distintos microorganismos y se pueden realizar árboles filogenéticos y esquemas evolutivos.

2.4.1.1.- Gen 16S como marcador universal

El ARNr 16S es un polirribonucleotido codificado por el gen rrs o ADN ribosómico ARNr 16S (ADN 16S) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. Análogo del ARNr 18S en eucariotas, ambos se denominan ARNr SSU (small subunit). Es secuenciado utilizando una modificación de la técnica de Sanger (1977) de dideoxinucleotidos, en la que conocidos primers complementarios a las regiones conservadas del rRNA 16S, son elongados utilizando una transcriptasa inversa. Las pequeñas cadenas de DNA producidas pueden ser amplificadas mediante la PCR o por clonación, y después secuenciadas mediante un proceso automatizado por electroforesis en geles de poliacrilamida.

El análisis de la secuencia del ARNr 16S constituye una herramienta muy útil en el estudio de la diversidad bacteriana en muestras clínicas y ambientales, por lo que se ha estudiado en un gran número de especies bacterianas. Aunque las secuencias disponibles en las bases de datos presentan un tamaño variable, suelen analizarse entre 500 y 1.500 pb. Actualmente, GenBank es la base de datos con mayor información ya que contiene más de 2 millones de secuencias depositadas del gen ARNr 16S. Es también interesante considerar

cuando es necesario analizar la secuencia completa o cuando una secuencia de menor tamaño va a proporcionar información suficiente. Para diferenciar taxones específicos, establecer diferencias entre cepas o para describir nuevas especies, es necesario el análisis de la secuencia completa del ARNr 16S. Por el contrario, para la mayoría de los aislamientos clínicos, la secuencia de 500 pb proporciona una identificación adecuada (a menor coste), aumentando la posibilidad de encontrar diferencias cuanto mayor es el fragmento secuenciado (más diversidad por kilobase secuenciada). Hay que tener en cuenta, que las relaciones filogenéticas y los dendrogramas generados pueden ser similares, pero no idénticos en función del tamaño del fragmento del 16S analizado.

2.4.2 Huellas genómicas

2.4.2.1.- Estudio de las huellas genómicas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica, por la que su creador, Cary Mullis, obtuvo el Premio Nobel, amplifica exponencialmente cualquier segmento de ADN de secuencia conocida. El componente clave de una reacción PCR es la ADN polimerasa aislada de *Thermophylus aquaticus*, un microorganismo adaptado a vivir y multiplicarse a muy alta temperatura. Esta polimerasa termoestable permite la replicación de cadenas en ciclos y produce un crecimiento geométrico del número de copias del ADN diana. Un ciclo PCR incluye tres pasos: i) desnaturalización del ADN a 90-95 °C para separar el ADN en dos cadenas que servirán de plantilla; ii) hibridación de una pareja de oligonucleótidos de cadena única corta (cebadores) complementarios de las regiones diana que flanquean por ambos extremos el fragmento de interés, a 45-65 °C; iii) extensión o elongación de las cadenas recién sintetizadas de ADN iniciada por los cebadores y facilitada por la Taq-polimerasa, a 72 °C. Dicho ciclo se puede repetir, normalmente unas 25 a 45 veces, para permitir la amplificación de suficientes amplicones (un fragmento de un gen o de ADN sintetizado usando la PCR) para que se puedan detectar.

2.4.2.2.- Tipos de huellas genómicas y su importancia

2.4.2.2.1.- Secuencias Repetitivas Enterobacterial Consenso Intergénica (ERIC_PCR)

Las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP) y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) son algunas de las secuencias REP que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos. La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR) es otra técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gran negativas, como *A. baumannii*. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR.

Secuencias Repetitivas Enterobacterial Consenso Intergénica (ERIC), también descritos como unidades repetitivas intergénicas, difieren de la mayoría de otras repeticiones bacterianas en ser distribuido a través de una gama más amplia de especies. Secuencias ERIC se describieron primero en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y en otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, así como *Vibrio cholerae* (**Higgins y Sharp, 1991**). La secuencia de ERIC es un palíndromo imperfecto de 127 pb. Además, las secuencias más cortas producidas por deleciones internas también se han descrito, así como secuencias más largas debido a inserciones de aproximadamente 70 pb en sitios internos específicos. Secuencias ERIC sólo se han encontrado en las regiones intergénicas, al parecer sólo dentro de las regiones transcritas (**Hulton et al., 1991**). El número de copias de la secuencia ERIC varía según las especies: se estimó inicialmente por extrapolación que puede haber cerca de 30 copias en *E. coli* K-12 y quizá 150 en *S. entérica Typhimurium* LT2 mientras que la secuencia del genoma de *Photobacterium luminescens* se ha informado que contienen más de 700 copias (**Duchaud et al. 2003**).

Estas diferencias de número de copia implican que las regiones intergénicas ortólogos pueden contener una secuencia de ERIC en una especie pero no en otro, y esto se encontró para las comparaciones entre *E. coli* y *S. enterica*. Sin embargo, no se sabe nada acerca de la naturaleza de la movilidad de estos elementos, tales como la tasa o medio de

generación de copias. Tampoco está claro si todas las copias tienen una función. El grado de similitud de secuencia entre las copias en *E. coli* y *V. cholerae* implícito de la conservación o la transferencia horizontal, sino en el caso en el que se compararon las copias ortólogos entre *E. coli* y *S. enterica*, la secuencia parecía tener sustituciones acumuladas a la tasa neutral.

2.4.2.2.2.- Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA)

Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA) es una herramienta poderosa para la identificación microbiana y clasificación, incluso a nivel de especies, y se ha utilizado para agrupar y clasificar grandes conjuntos de aislamientos y clones. Automated ARDRA se ha realizado con amplicones de PCR fluorescentes obtenidos mediante la incorporación de dUTP marcado con fluorescencia durante la PCR. Después de la digestión con enzimas de restricción, los fragmentos se separan en un gel de secuenciación de ADN automatizada. Diferentes secuencias de ADN resultan en un perfil único de la comunidad analizada. Los datos del patrón de restricción pueden ser comparados con los resultados de análisis de restricción de secuencias de ADNr de bacterias conocidas obtenidos utilizando las secuencias de base de datos. ARDRA es una técnica sencilla, rápida y rentable que puede ser útil para detectar cambios estructurales en las comunidades microbianas simples, pero no es capaz de medir la diversidad microbiana o para detectar grupos filogenéticos específicos dentro de un perfil de la huella dactilar de la comunidad.

Esta técnica se ha utilizado ampliamente para evaluar los cambios en la estructura de la comunidad microbiana (principalmente bacterias). Por ejemplo, **Smit et al. (1997)** y **Torsvik et al. (1998)** encontraron diferencias claras en la estructura de la comunidad microbiana en suelos contaminados con metales pesados en comparación con el suelo no contaminado.

En otro estudio, **Pérez De Mora et al. (2006)** evaluaron los efectos de la remediación in situ de un suelo contaminado por metales pesados en la diversidad estructural microbiana

después de 18 meses. Los resultados revelaron diferencias en ambas estructuras de la comunidad de bacterias y hongos, como consecuencia de los diversos tratamientos ensayados. Sin embargo, diferentes resultados se obtuvieron con las dos enzimas de restricción empleadas en los patrones de huellas genómicas bacterianas y fúngicas.

2.4.3 Análisis filogenético

2.4.3.1.- Filogenia

El método comparativo filogenético ha sido sin duda uno de los fenómenos más importantes de la biología evolutiva durante las últimas décadas. Podemos definir el método comparativo como un enfoque analítico basado en la comparación de diferentes objetos con el fin de dilucidar los mecanismos en el origen de su diversidad. A partir de esto, podemos definir el método comparativo filogenético como el estudio analítico de las especies, las poblaciones y los individuos en un marco histórico, con el objetivo de dilucidar los mecanismos en el origen de la diversidad de la vida.

Es importante señalar que el método comparativo filogenético (PCM) es distinta de, pero no es independiente de la filogenética, el estudio y la reconstrucción de las relaciones históricas entre las especies.

Con el fin de reconstruir la historia filogenética de un organismo en un nivel molecular, múltiples fuentes de información de caracteres están disponibles en forma de diferentes genes. Hoy en día se acepta ampliamente que las filogenias deben ser reconstruidas con toda la información disponible en un análisis combinado, ya que proporciona el mayor poder explicativo posible (**Pickett et al., 2005**). Además, los conjuntos de datos combinados se han demostrado para revelar apoyo oculto incluso para relaciones en conflicto entre los análisis de marcadores individuales (**Gatesy et al., 1999**). Por lo tanto, en un estudio de un ADN, al menos debería intentarse la toma de muestras de diferentes genes (por ejemplo mitocondrial y nuclear).

Filogenéticamente caracteres informativos se distribuyen a través de toda la secuencia del gen. Esta distribución no es aleatoria, ya que las limitaciones funcionales y estructurales en diferentes partes del gen gobiernan selectivamente la evolución de diferentes regiones dentro de un gen. Por lo tanto, este mecanismo también explica el hecho de que la mayoría de los genes contienen ambas regiones más conservadoras y más variable, lo que podría ser o bien informativo en diferentes niveles ordinales, o no informativo en absoluto.

Por lo tanto, una exploración de secuencias homólogas existentes podría identificar las regiones potencialmente problemáticas, lo que podría excluir a priori a partir del estudio de un ADN. En otras palabras, potencialmente regiones informativos pudieron ser identificados, y se incluyen de forma selectiva en el análisis. Varios métodos para analizar la calidad de un conjunto de datos sobre el contenido de información o de carácter incongruente se han propuesto en el pasado.

Un enfoque fue introducido por **Lyons-Weiler et al. (1996)** en forma del programa de RASA (Relativa Análisis Aparente Syna-Pomorphy). Este método de pruebas (bajo un supuesto conjunto de datos estructurado jerárquicamente) si la proporción entre el potencial synapomorphie y el potencial informativo de las dos ampliaciones de taxones son similares encima de lo esperado por el azar. Si bien este método ha sido utilizado por varios investigadores, **Simmons et al. (2002)** probaron una serie de conjuntos de datos hipotéticos y empíricos con una fuerte señal filogenética bajo estos criterios, e informó de un fallo en la detección de la señal filogenética de ambas matrices.

Otro enfoque es una comparación de la homogeneidad de la señal en diferentes genes a través de una serie de pruebas de partición homogéneas (PHT) (**Swof-ford 2002**). La PHT, también conocida como prueba de diferencia de longitud de incongruencia (ILD, **Farris et al. 1994**) examina la relación entre incongruencia y exactitud filogenética. Esta prueba se distingue entre los casos en los que la combinación de los datos en general, la mejora de la precisión filogenética ($P > 0,01$) y los casos en los que la precisión de los datos combinados sufrió en relación con las particiones individuales ($P < 0,001$). Aplicado a un gen existente,

dividido en sub-regiones definidas, potencialmente subregiones incongruentes y congruentes podría definirse a priori, la secuencia de un ADN y podría ajustarse en consecuencia. Como una advertencia sin embargo, se ha demostrado, que el ruido en sí mismo puede generar resultados altamente significativas en la prueba de ILD (**Dolphin et al. 2000**). Además, **Dowton y Austin (2002)** mostraron que la prueba de ILD es poco probable que sea una medida eficaz de congruencia cuando dos conjuntos de datos difieren marcadamente en tamaño.

2.4.3.2.- Construcción de un análisis filogenético

En el paso inicial, se unen los dos *neighbors* (secuencias) que tengan la menor distancia genética. Luego, este par inicial se considera como una sola entidad, y se busca el siguiente terminal que tenga la menor distancia genética con este. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (**Saitou y Nei 1987**). En el caso de secuencias de ADN, la distancia genética entre dos terminales se calcula en base al número total de sustituciones de bases nitrogenadas, es decir en el número de bases nitrogenadas que son diferentes en estas dos secuencias.

Para seleccionar los terminales que tengan menor distancia genética, lo que en la práctica es escoger las secuencias más parecidas, es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones de terminales. Entonces se construye el “árbol filogenético” agregando terminales tomando como información los valores de la matriz de distancias (**Saitou y Nei 1987**).

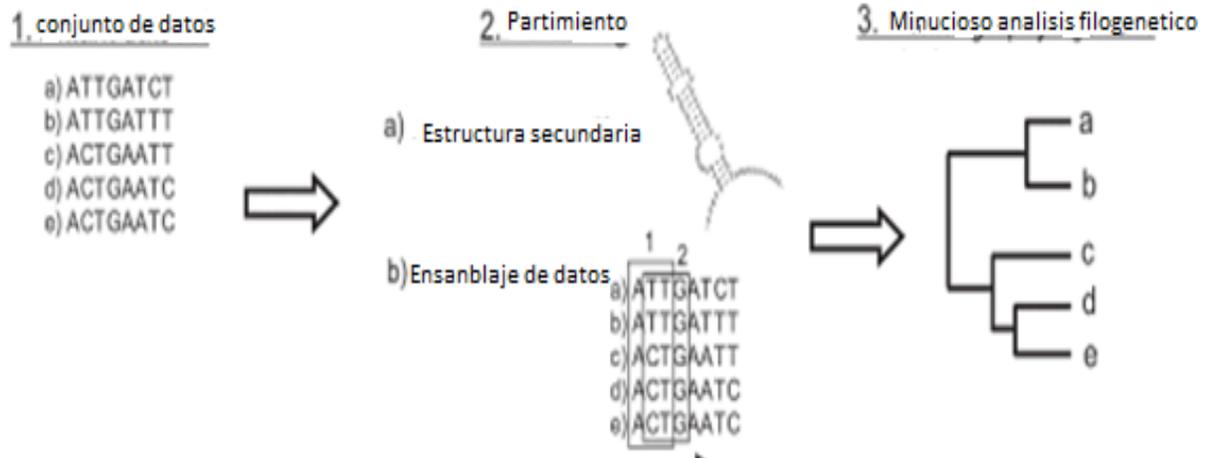


Figura 6.- Construcción de un análisis filogenético en forma de árbol.

2.4.3.3.- Tipos de análisis filogenéticos

Existen tres métodos comúnmente utilizados en estudios de sistemática filogenética: i) la Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP); ii) Maximum Likelihood (ML) y la iii) Inferencia Bayesiana (IB). En recientes años se viene utilizando con frecuencia el método Neighbor-Joining (NJ). De los tres métodos válidos para inferencia filogenética, MP, ML, e IB, algunos sistemáticos utilizan solo uno de ellos para sus manuscritos, o combinaciones de los tres. Por lo general, estas preferencias se basan en fundamentos filosóficos y/o razones prácticas. La finalidad de los análisis filogenéticos es estimar una filogenia (árbol filogenético) que muestre la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio. Es decir, el objetivo final es un árbol filogenético que sea reflejo del proceso de evolución donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” (**Darwin 1859**) entre especies ancestrales y descendientes. Una manera de cumplir este objetivo es mediante la búsqueda de indicios de descendencia con modificación en las especies, ya sea caracteres morfológicos o moleculares. Por ejemplo, se puede utilizar el carácter morfológico “notocorda” que apareció en la especie ancestral de todos los cordados y ha sido heredada y modificada múltiples veces (estados de carácter) a lo largo de la historia evolutiva del filo Chordata. La aparición de esqueleto rodeando la notocorda (o vestigios de esta) se utiliza para agrupar al grupo “vertebrados”. En el

contexto filogenético, el grupo que incluye la especie ancestral, donde apareció este estado de carácter, y todas sus especies descendientes se denomina clado o grupo monofilético (en este caso, clado Vertebrata).

El método NJ es frecuentemente usado en estudios de “código de barras molecular” (*DNA barcoding*) (**Hebert et al., 2010**), el cual consiste en utilizar un segmento de 648 bases nitrogenadas del gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa I (COI) como identificador único para cada especie del reino animal (**Hebert et al. 2003**). El objetivo fundamental de este método es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Además, existe la posibilidad de descubrir especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible (**Silva-Brandão et al. 2009**). Esto es factible ya que la variabilidad intra-específica de esta secuencia es menor que la variación existente entre especies diferentes. Luego de secuenciar el fragmento del COI para grupos de individuos, especies de un mismo género, o incluso especies pertenecientes a diferentes filos (**Hebert et al., 2003**), dependiendo del nivel taxonómico que se quiera estudiar, es necesario analizar las secuencias. El algoritmo de preferencia para estudios de código de barras molecular es el Neighbor-Joining.

El algoritmo NJ fue creado por Saitou y Nei en 1987 y consiste en generar un único “árbol filogenético” final, el cual, según los autores, no necesariamente será el “árbol verdadero”. Si bien **Farris et al. (1996)** señala algunos problemas en el método NJ, es importante notar que el “árbol filogenético” final solamente refleja el grado de similitud de los terminales. Por esto, NJ es útil en estudios de código de barras molecular ya que los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza (o semejanza de sus secuencias COI). Sin embargo, el método NJ no toma en cuenta la relación ancestro–descendientes. Tampoco considera el principio de descendencia con modificación. Por lo tanto, el árbol que se obtiene usando NJ no refleja relaciones evolutivas, en realidad es una representación del grado de similitud de los terminales, lo cual corresponde al campo de la fenética (Crisci& López, 1983), no de la sistemática filogenética.

III. JUSTIFICACION

En la estructura arbórea de los bosques tropicales, las leguminosas arbustivas juegan un papel importante en la productividad y funcionalidad de los ecosistemas terrestres, considerando la capacidad de estas plantas para fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con una variedad de rizobacterias, especialmente del genero *Rhizobium*. El caracolillo *Ormosia macrocalyx*, es una leguminosa arbustiva de gran relevancia para la comunidades locales en la región Maya de Tabasco y Chiapas. Esta leguminosa crece como arbusto o árbol y es apreciado por su follaje, madera y semillas que se emplean en trabajos de artesanías. Desafortunadamente, la deforestación para la práctica de la ganadería extensiva, incendios y la tala inmoderada, han conllevado a que las poblaciones de esta leguminosa hayan disminuido significativamente, a tal grado que ya aparece en la lista de especies en vías de extinción (SEMARNAT, 2001). Por este motivo, en estas regiones se han iniciado programas encaminados a la reforestación de la leguminosa *O. macrocalyx*.

Sin embargo, durante la etapa de propagación de esta especie en los viveros, las plántula presentan un lento crecimiento, por la falta de nutrientes adecuados y principalmente, porque son atacadas por una variedad de hongos fitopatógenos, principalmente de las especies *Fusarium*, *Alternaria* y *Colletotrichum*, que causan la pudrición de las raíces y hojas de la planta.

La biofertilización usando Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV) es una alternativa eficiente para mejorar el crecimiento de las plantas y para suprimir el daño ocasionado por hongos fitopatógenos, como ha sido demostrada en varios tipos de cultivo de importancia agrícola y forestal. Las BPCV permiten una mayor sobrevivencia, crecimiento y desarrollo de plántulas sanas con mejores condiciones biológicas para su establecimiento y reforestación en su hábitat natural.

Por lo anterior, es importante estudiar la diversidad de bacterias asociadas a la leguminosa *O. macrocalyx* y determinar la calidad de las cepas para su empleo como biofertilizante en esta importante especie de leguminosa.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- En los bosques tropicales del sureste de México, la deforestación, la práctica de la ganadería extensiva, los incendios, el tráfico de maderas preciosas y la tala inmoderada, han ocasionado que grandes extensiones de la cobertura vegetal de los bosques están desapareciendo a un ritmo acelerado. La leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx*, conocida como “caracolillo” o “colorin”, forma parte de la estructura arbórea de estos bosques y ha sido una de las especies que más afectaciones ha sufrido por estas actividades humanas, a tal grado que ya aparece en la lista de especies plantas en vías de extinción (SEMARNAT, 2001).
- A pesar de que *Ormosia macrocalyx* pueden ser propagada en condiciones de invernadero o vivero, se presenta el problema de que las plántulas son frecuentemente, atacados por hongos fitopatógenos. Especies de *Fusarium*, *Alternaria* y *Colletotrichum* ocasionan pudrición severa en las raíces y daños a las hojas, provocando lento crecimiento y alto índice de mortalidad.
- La mortalidad de las plantas de *O. macrocalyx* por hongos fitopatógenos se ha tratado de controlar por medio del empleo y aplicación de fungicidas y fertilizantes químicos, pero con poco éxito y por el contrario el uso indiscriminado de estos agroquímicos ha incrementado la contaminación y alteración de los ecosistemas en bosques tropicales.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar y estudiar las rizobacterias asociadas con leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx* y seleccionar cepas con potencial biotecnológico.

Específicos:

- Aislar y cultivar rizobacterias asociadas a *Ormosia macrocalyx*, utilizando medios de cultivos específicos
- Estudiar fenotípicamente las cepas rizobacterianas mediante análisis microscópico, tinciones especiales, pruebas fisiológicas y bioquímicas.
- Realizar la identificación taxonómica de las rizobacterias mediante el uso del marcador molecular 16S rRNA, huellas genómicas y análisis filogenético.

VI. HIPOTESIS

Existe una amplia diversidad de bacterias asociadas a leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx* y algunas de estas rizobacterias tienen un alto potencial para su empleo como biofertilizantes.

VII. MATERIALES Y METODOS

7.1 Ubicación del sitio de muestreo

Las plantas de caracolillo (*O. macrocalix*) fueron colectadas en un bosque tropical mesófilo, ubicado en municipio de Nacajuca, Tabasco (LN: 17° 59' 21.92'' y LO: 92° 58' 24.56''; altitud: 12.450 m). Con un clima cálido húmedo con lluvias todo el año (Af), la temperatura promedio es de 26°C. La precipitación alcanza una media anual de 3424 mm (INEGI 2006) El cual presenta suelos de texturas medias franco-arcillosas a arcillosas que corresponden al tipo Cambisol gleyico y Vertisol pélico, mismos que se inundan durante la época de lluvias más intensas (septiembre-noviembre), por lo que están mal oxigenados. con vegetación secundaria y porción de selva baja espinosa perennifolia de tinto (*Haematoxylum campechianum*) (Ascencio & Maldonado 2002).



FIGURA 7.- Ubicación del sitio de colecta FUENTE: Ascencio & Maldonado 2002

7.2 Aislamiento y cultivo de cepas bacterianas

Las rizobacterias fueron aisladas de nódulos formados en las raíces de las plantas. Se seleccionaron nódulos sanos y que presentaban una pigmentación rosa o rojiza. Los nódulos fueron desinfectados con un lavado en etanol al 96% durante 1min, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 25% de 3-4 min, terminando con varios lavados de agua destilada esterilizada. El jugo celular de los nódulos exprimidos, se cultivaron en medio nutritivo Peptona-Extracto de Levadura- Calcio (PY) a 28° C durante 1-5 días.

Cuadro 1.- Composición del medio PY-Calcio

MEDIO PY-CALCIO	
REACTIVOS	PROPORCIONES (100 mL)
Extracto de levadura (g)	0.3
Peptona de caseína (g)	0.5
Cloruro de calcio (ml)	1
Agar bacteriológico (g)	1.5

7.3 Caracterización fenotípica de las cepas bacterianas

Las cepas obtenidas fueron resembradas continuamente mediante la técnica de estría cruzada hasta obtener cepas puras, las cuales fueron comprobadas por medio de tinción Gram y análisis microscópico. La tinción Gram se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor marca HYCEL®. Para el análisis de las características celulares se empleó preparaciones fijas y se analizaron en un microscopio fotónico Marca Carls Zeiss, Modelo K-4 (Alemania)

7.3.1.- Estudio de la morfología de las colonias bacterianas en medio de cultivo PY-Calcio

Las cepas bacterianas fueron resembradas mediante la técnica de estría cruzada en el medio de cultivo PY-Calcio y se incubaron a 28° C durante 24-72 hrs. Después de este tiempo las colonias fueron analizadas bajo un microscopio estereoscopio Marca Micapsa (USA). Se

revisó la forma, color, aspecto y las dimensiones de las colonias formadas en el medio de cultivo (**Vincent, 1980**).

7.3.2- Pruebas fisiológicas de las cepas bacterianas

7.3.2.1.- Tolerancia a diferentes grados temperatura

Las cepas bacterianas aisladas fueron cultivadas en placas con medio PY-Calcio solido a un pH de 6.8 y estriadas de forma masiva. Las placas se incubaron a diferentes temperaturas: 28°C, 37°C y 44°C durante 1-5 días, la temperatura de 28°C fue utilizada como control.

7.3.2.2.- Tolerancia a diferentes niveles de pH

Cada una de las cepas bacterianas fue inoculada en tubos de vidrio de (13 x 100 mm) que contenían caldo PY- calcio con una modificación en el pH (4.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0) que fue ajustada con la ayuda de un pH-metro modelo SENSION 3 marca HACH, (USA). Los cultivos bacterianos fueron incubados a 28°C, con una agitación de 100rpm, durante 24-48hrs. La concentración crecimiento celular (UFC/ml) fue determinado en un espectrofotómetro marca Thermo scientific modelo Genesys 20 (USA) a una longitud de onda de 580nm.

7.3.2.3.- Tolerancia a salinidad por NaCl.

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en tubos de vidrio (13 x 100 mm) que contenían medio PY- calcio, al cual se le agregaron diferentes concentraciones de NaCl: (0.5%, 1.0%, 2.0%, 3.0% y 5.0%). Los cultivos fueron incubados a 28°C, con una agitación de 100 rpm durante 24-48 hrs. La concentración crecimiento celular (UFC/ml) fue determinado en un espectrofotómetro marca Thermo scientific modelo Genesys 20 (USA) a una longitud de onda de 580nm.

7.3.2.4.- Resistencia Intrínseca a antibióticos:

Para esta prueba se utilizaron multidisco de la marca BIO-RAD® (california). Este kit cuenta con 12 distintos antibióticos (cuadro 2). Cajas Petri con medio PY-calcio fueron inoculadas con un hisopo estéril de algodón el cual fue humedecido previamente con la cepa bacteriana, se estrió el medio sobre la totalidad de la superficie, hasta que se obtuvo un inóculo uniforme. Cuando el inóculo se secó, se procedió a colocar el disco. Los discos fueron en el centro de la caja, con la ayuda de una pinza estéril, se presionaron ligeramente para asegurar un contacto con la superficie. Las cajas fueron incubadas a 30°C por 24 a 48 hrs. Después de este tiempo, los halos de inhibición fueron medidos con la ayuda de un vernier. Las cepas se clasificaron en: Resistentes (R), Intermedias (I) o Sensibles (S), dependiendo del diámetro del halo de inhibición (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Valores para la interpretación de la prueba de antibióticos

Antimicrobianos combinados para bacterias			
Agente antimicrobiano	Diámetro de halo de inhibición en mm		
	R	I	S
Amikacina (AK)	≤14	15-16	≥17
Ampicilina (AM)	≤13	14-16	≥17
Cefalotina (CF)	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima (CFX)	≤14	15-22	≥23
Dicloxacilina (DC)	≤10	11-12	≥13
Ceftriaxona (CTX)	≤13	14-20	≥21
Cloranfenicol (CL)	≤12	13-17	≥18
Gentamicina (GE)	≤12	13-14	≥15
Netilmicina (NET)	≤12	13-14	≥15
Nitrofurantoina (NF)	≤14	15-16	≥17
Penicilina (PE)	≤14	-	≥15
Sulfametoxazol/ Trimetoprim (STX)	≤10	11-15	≥16

7.4 Caracterización genotípica de las cepas bacterianas

7.4.1.- Extracción de ADN genómico bacteriano

El ADN total fue extraído usando el kit de la marca Roche™ “DNA Isolation Kit for Cells and Tissues”, para esto, se utilizaron muestras de cada una de las cepas y se colocaron en tubos conteniendo 250 μL de agua marca PISA® estéril de tal forma que quedaran las muestras homogenizadas. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 1 min para obtener un pellet de éstas células. Se eliminó el sobrenadante con una micropipeta cuidadosamente para no tocar el pellet. Se le agregaron 120 μL de la solución de lisis y se resuspendió la muestra suavemente, hasta disolver el pellet en la solución. Se le agrego 0.5 μL de la enzima lisozima y entonces, la muestra se incubó a 80°C por 40 min en un termomixer marca Eppendorf (USA). Al terminar la incubación, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y después se les adicionó 0.5 μL de la enzima RNAsa. Los tubos se mezclaron invirtiéndose 25 veces cuidadosamente. Después se agregó 40 μL de la solución para precipitar proteínas, se vortexeo vigorosamente por 20 seg, las muestras se colocaron en hielo durante 10 min. Después de este tiempo, se procedió a centrifugar a 13000 rpm por 8 min. En un tubo nuevo se colocó cuidadosamente el sobrenadante (que contiene el ADN) y se le adicionó 250 μL de isopropanol puro. Los tubos se invirtieron cuidadosamente 50 veces, después se centrifugaron por 10 min a 13000 rpm. Ahora se procedió a drenar y escurrió completamente el sobrenadante y se cuidó la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Se adicionó 250 μL de etanol frio al 70% por las paredes del tubo e invertimos nuevamente por 30 veces a los tubos con la muestra, después se centrifugó por 5min a 13000 rpm, se drene el sobrenadante en papel absorbente y se dejó secar la pastilla del ADN por 30 min. Después de este tiempo se agregó 25 μL de solución de hidratación del ADN y la muestra se incubó a 65° por 30 min. ADN genómico aislado fue conservado en refrigeración a 4° C hasta su empleo.

7.4.2.- Huellas genómicas ERIC_ PCR

Para conocer la huella genómica de cada cepa aislada de *Ormosia macrocalyx*, se realizó la técnica de PCR_ERIC descrita por **Brujin (1992)**. Con la finalidad de agruparlas y discriminarlas por su similitud entre los patrones de electroforesis obtenidos por cada cepa. Se realizó la PCR para ERIC utilizando un termociclador modelo 2720 de la marca Applied Biosystems, usando los primers ERIC1 y ERIC2 descritos por **Versalovic et al. (1991)**. Para esto se preparó la mezcla de reacción presentada en el Cuadro 3. Posteriormente la mezcla se dividió en 26 tubos para PCR colocando 9.2µL a cada uno, a los cuales se les agregó 0.8 µL de ADN extraído, para poder ser amplificado.

Cuadro 3.- Carga de reacción para la prueba ERIC_ PCR

Reactivos	Proporciones descritas 1 tubo (10 µL)	Proporciones usadas 26 tubos (10 µL)
Buffer 10x	1	26
DMSO	1	26
MgCl ₂	1.52	39.52
Dntp's	1.24	32.24
Eric 1	0.2	5.2
Eric 2	0.2	5.2
Taq polimerasa	0.08	2.08
ADN	0,8	0.8(26 muestras)
H ₂ O MQ	3.96	102.96
VOL FINAL	10	260

Al ingresarlo al thermociclador este presenta el programa descrito en la figura 8.

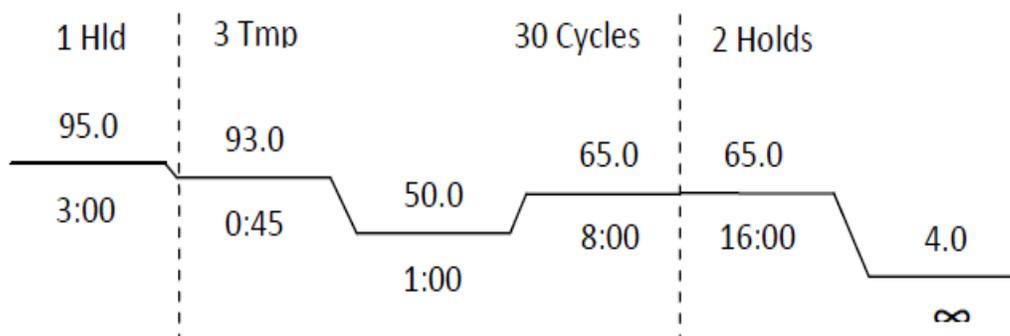


Figura 8.- Programa usado en el termociclador para Eric_PCR

7.4.3.- Amplificación del gen cromosomal 16S ARNr

Se amplificó el gen 16S ADNr, a partir de ADN total extraído de cada cepa, usando los primers 27F (AGAGTTTGACCTGGCTCAG) y 1492R (GGTACCTGTTACGACTT) (Weisburg *et al.*, 1991), a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 4).

CUADRO 4.- Mezcla de reacción para amplificación del gen 16S Rrna

Reactivos	Proporción estandarizada 1 tubo (25µL)	Proporción utilizada 20 tubos(25 µL)
Dntp's	0.2	4
27 F	0.25	5
1492 R	0.25	5
Mg ⁺⁺	0.75	15
Buffer 10x	2.5	50
Taq polimerasa	0.125	2.6
H ₂ O M.Q.	20.92	418.4
VOL FINAL	25	500

Posteriormente se amplificó el gen 16S rRNA, por medio de la PCR con el siguiente programa (Figura 9)

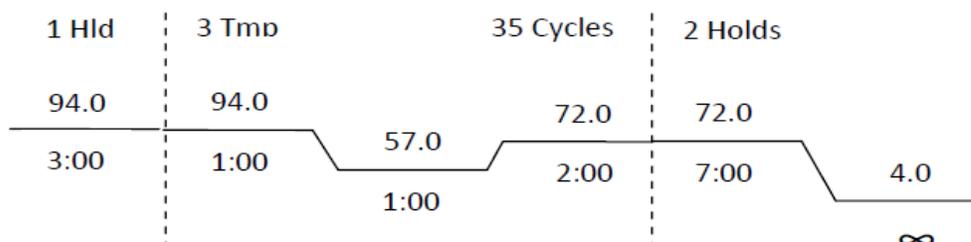


Figura 9.- Programa de termociclador para la amplificación del Gen 16S

Los productos de la PCR 16S rRNA se cargaron en un gel de agarosa al 1%, colocando 5µL del producto de PCR de cada muestra y 3µL de Syber Green al 1X, usando 2µL de marcador de peso molecular 1kb. Las muestras se corrieron a 100 volts por 40 min.

7.4.4.- Perfil de huellas genómicas ARDRA

Utilizando los productos de PCR del gen 16S rRNA de cada cepa, se realizó una digestión con la enzima de restricción HinfI (Thermo Scientif-USA) para agrupar las cepas con el mismo patrón de corte. La cual se preparó de la forma indicada en el cuadro 5.

Cuadro 5.- Mezcla de reacción para la prueba de ARDRA

Reactivos	Proporción estándar 1 tubo (10µL)	Proporciones utilizadas 18 tubos(10 µL)
Buffer 10X	1	18
Enzima Hinf I	0.3	5.4
Producto de PCR	1.5	27
H ₂ O M.Q.	7.2	129.6
Vol. Final	10	180

Se mantuvo a una incubación de 37° durante 2 h para una buena actividad de la enzima. Las huellas genómicas fueron analizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X y los perfiles fueron observados con la ayuda de un fotodocumentador UPK usando luz UV-320nm.

7.4.5 Purificación y secuenciación del gen 16S rRNA.

Los productos de PCR para amplificar el gen 16S ADNr fueron purificados, 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*) mezclándose 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 13000rpm por 1 minuto y el filtrado fue desechado. Se realizó un segundo lavado con 200µl del buffer de lavado y se centrifugaron nuevamente, desechándose el filtrado. A continuación el tubo con el filtro se trasladó a un tubo eppendorf nuevo estéril de 1.5ml y se colocaron 30µl de buffer de elución (*Elution Buffer*) y se centrifugó nuevamente durante un minuto para obtener los ADN purificados.

7.4.6.- Análisis filogenético

Los productos de PCR de las cepas bacterianas seleccionadas por ARDRA fueron purificadas y posteriormente se enviaron para su secuenciamiento al Instituto de Biotecnología-UNAM (México). Las secuencias del gen 16S rDNA de cada una de las cepas fueron primeramente editadas de forma manual corroborando visualmente la correspondencia de picos de diferentes colores (a cada base se le asigna un pico de color distinto) con la secuencia de bases que aparece en la parte superior del cromatograma y alineadas usando el programa Bioedit V. 7.5.2 (Hall, 1999) y Para la inferencia del árbol filogenético las cepas fueron comparadas con secuencias análogas obtenidas del GenBank

en la página web del “*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*” (www.NCBI.Org). Al igual que con cepas tipo obtenidas de “*Ribosomal Database Project*”. (<http://rdp.cme.msu.edu>) Se analizaron por el método de *Neighbor-Joining (NJ)* con el modelo de Tamura-Nei utilizando el software MEGA v.4 (Kumar *et al.*, 2004).

VIII. ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances:

Se logró conocer la diversidad genética de las bacterias asociadas a la planta *O. macrocalyx*, que crece en condiciones físico químicas especiales, usando técnicas microscópicas, extracción de ADN y herramientas moleculares tales como; huellas genómicas ERIC-PCR, un marcador molecular (gen 16S rRNA), un análisis de restricción ARDRA. Lo anterior permitió identificar y clasificar las distintas especies bacterianas asociadas a este tipo de leguminosa, con lo que fue posible lograr la secuenciación de estas cepas y su análisis filogenético. También fue posible seleccionar una cepa representativa de cada especie a las cuales se le realizaron pruebas bioquímicas específicas para lograr identificar su potencial biotecnológico.

Limitaciones:

El tiempo para el desarrollo del proyecto debido a que la falta de crecimiento de las semillas retrasó el inicio de las pruebas y por ello la eliminación del experimento a nivel invernadero. En el proceso de extracción de ADN, la calidad no fue la adecuada para las pruebas de amplificación, debido a la presencia de impurezas tales como proteínas y sales, lo anterior retrasó más el trabajo y se debió a que las cepas bacterianas tenían exceso de crecimiento o producción de mucosidad provocando impurezas difíciles de retirar. Esto provocó la pérdida de algunas cepas a las que no se les pudo extraer el ADN.

IX. RESULTADO Y DISCUSIONES

9.1 Características del sitio de colecta

Un total de 10 plántulas de *Ormosia macrocalyx* que crecen en un bosque tropical perennifolio en el municipio de Nacajuca, Tabasco fueron obtenidas para este estudio. Este bosque está constituido por diversas formas biológicas como hierbas, epifitas, enredaderas, arbustos y árboles. Aquí predominan especies como *Terminalia amazonia*, *Swietenia macrophylla*, *Cedrela mexicana*, *Manilkara zapota*, *Dioscorea composita*, *Chamaedorea* sp. *Brosimum alicastrum*. Con un clima cálido húmedo con lluvias todo el año (Af), la temperatura promedio es de 26°C. La precipitación alcanza una media anual de 3424 mm (INEGI 2006) El cual presenta suelos de texturas medias franco-arcillosas a arcillosas que corresponden al tipo Cambisol gleyico y Vertisol pélico, mismos que se inundan durante la época de lluvias más intensas (septiembre-noviembre), por lo que están mal oxigenados. Con vegetación secundaria y porción de selva baja espinosa perennifolia (Ascencio & Maldonado 2002).

El análisis fisicoquímico permito determinar, que la textura del suelo corresponde al tipo franco, este tipo de suelo se caracteriza por estar formado por una mezcla de arena, limo y arcilla en proporciones tales que no predominan en ella las características de ninguno de sus componentes. Es blando y algo arenoso al tacto (Barioglo C. 2006).

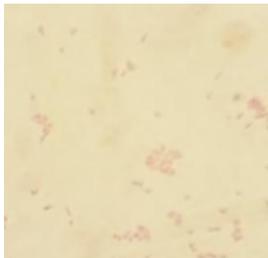
Así mismo se determinó un pH de 7.2, que corresponde a un suelo ligeramente alcalino cercano a la neutralidad, poco típico de este tipo de ecosistemas debido a que la mayoría presenta suelos ácidos. Estos suelos caracterizan por su alto contenido en materia orgánico, y presenta alta humedad. Lo anterior, permite apreciar estructura y funcionalidad de un bosque tropical donde la leguminosa *Ormosia macrocalyx* juega un papel importante junto con sus microsimbiontes. Las leguminosas presentan sistemas radiculares especializados que les permiten crecer en suelos áridos, salinos y de naturaleza acida-basica, lo cual también es posible debido a las relaciones simbióticas que establecen con bacterias diazotrofas que le proporcionan nutrientes esenciales para su crecimiento (Castro, 2009).

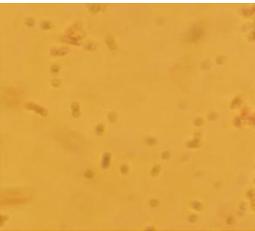
9.2 -Características fenotípicas de las cepas bacterianas

9.2.1.- Características celulares bacterianas

A partir de 35 nódulos de las raíces de la leguminosa *Ormosia macrocalyx* se aisló un total de 140 cepas bacterianas. Las cuales fueron analizadas al microscopio compuesto, las cepas presentaron una variedad de formas celulares de diferentes tamaños y formas, principalmente tuvieron forma de bacilos y coco bacilos y fueron en su mayoría Gram negativo, salvo algunas bacterias agrupadas en el género *Bacillus* que fueron del tipo Gram positivo (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Características fenotípicas de las cepas por tinción Gram

CEPA- CLAVE	Nombre de las CEPAS	TINCION GRAM	CARACTERISTICAS	FOTOGRAFIA
CA-02	<i>Pantoeasp</i>	(-)	Coco-bacilos	
CA-03	<i>Enterobactersp.</i>	(-)	Coco-bacilos pequeños	
CA-11	<i>Bacillus</i> sp.	(+)	Bacilos grandes	

CA-12	<i>Paenibacillus</i> sp.	(-)	Bacilos pequeños	
CA-14	<i>Sinorhizobium</i> sp.	(-)	Bacilos cortos pequeños	
CA-15	<i>Citrobacter</i> sp.	(-)	Cocos pequeños	
CA-16	<i>Novosphingobium</i> sp.	(-)	Cocos medianos	

En este cuadro mediante la tinción de Gram se observó que en *sinorhizobium* sp, la morfología de las células y sus características tintoriales correspondían con las descritas para este grupo de bacterias: las células eran bacilos Gram negativos, de pequeño tamaño, finos y no formaban esporas. De forma general, estas aparecen en los diferentes géneros de rizobios (Garrity y Holt, 2001).

9.2.2 Morfología de las colonias en medio PY-calcio

Para realizar el estudio fenotípico de las bacterias aisladas de *Ormosia macrocalyx* es necesario tener en cuenta las características de morfología celular y colonial, así como las bioquímicas y fisiológica, entre otras. El cúmulo de estos datos permite describir estos microorganismos y ubicar sus características en los distintos géneros y especies reportados hasta ahora en la literatura (cuadro 7).

Cuadro 7.- Morfología de las colonias de las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*

CEPA-CLAVE	Nombre de las CEPAS	CARACTERISTICAS	FOTOGRAFIA
CA-02	<i>Pantoea</i> sp	Color blanco claro, colonias medianas de forma circular, de borde entero, elevación convexa, superficie lisa, brillante, cremosa e invasiva. (24hrs)	
CA-03	<i>Enterobacter</i> sp.	Color blanco crema, colonias pequeñas, forma circular, borde entero, elevación convexa, superficie lisa, brillante, mucosa e invasiva. (24hrs)	
CA-11	<i>Bacillus</i> sp.	Color beige claro, colonias medianas, de forma irregular, de borde ondulado, elevación plana, superficie rugosa con un punto café claro en el centro, mate, cremosa, con crecimiento abundante. (24hrs)	

<p>CA-12</p>	<p><i>Paenibacillus</i> sp.</p>	<p>Color amarillizo, colonias medianas de forma circular con centro claro, borde entero, elevación plana, superficie lisa, seca. (24hrs)</p>	
<p>CA-14</p>	<p><i>Sinorhizobium</i> sp.</p>	<p>Color aperlado, colonias pequeñas, de forma circular con halo color agua, borde entero, elevación convexa, superficie lisa, acuosa o mucosa. (24hrs)</p>	
<p>CA-15</p>	<p><i>Citrobacter</i> sp.</p>	<p>Color amarillo brillante, colonias pequeñas, forma puntiforme, borde entero, elevación convexa, superficie lisa, mucosa. (48hrs)</p>	
<p>CA-16</p>	<p><i>Novosphingobium</i> sp.</p>	<p>Color amarillo brillante, colonias pequeñas, forma puntiforme, borde entero, elevación convexa, superficie lisa, mucosa.(24hrs)</p>	

La morfología celular se llevó a cabo en el medio nutritivo peptona- extracto de levadura calcio (PY-Calcio), en el cual se observó un crecimiento rápido para la mayoría de las cepas bacterianas, , debido a que la peptona y el extracto de levadura proporcionan factores de crecimiento y la fuente de nitrógeno a las bacterias (U. S. Dept. Agric. Tech. Bull. 1984). Excepto para *citrobacter* sp y *Novosphingobium* sp a quienes se les observo un bajo crecimiento.

9.3.- Aspectos fisiológicos de las cepas bacterianas

9.3.1.- Tolerancia a diferentes grados de temperatura

Las cepas bacterianas aisladas de los nódulos de la leguminosa *Ormosia macrocalyx* tuvieron capacidad para crecer a temperaturas mayores de 44°. A excepción de la cepa *Novosphingobium* sp y *Sinorhizobium* sp. que no tuvieron la capacidad para tolerar esa temperatura. La temperatura es un factor importante en el crecimiento de una cepa bacteriana, ya que no solo mide el crecimiento sino la viabilidad de esta, su resistencia a cambios o estrés climático, etc. (Cuadro 8)

Cuadro 8.- características de crecimiento variando la temperatura de las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*

Cepa	Crecimiento		
	28°	37°	44°
<i>Bacillus</i> sp	+	+	+
<i>Citrobacter</i> sp	+	+	+
<i>Enterobacter</i> sp	+	+	+
<i>Novosphingobium</i> sp	+	+	-
<i>Paenibacillus</i> sp	+	+	+
<i>Pantoea</i> sp	+	+	+
<i>Sinorhizobium</i> sp.	+	+	-

.(+) crecimiento, (-) Sin crecimiento.

Para cada especie bacteriana hay una temperatura definida que puede variar entre los límites máximos y mínimos, donde existen diversos puntos intermedios entre los cuales se encuentra la temperatura óptima de crecimiento. De acuerdo al cuadro anterior se observa que las temperaturas adecuadas para el crecimiento de las cepas de *Ormosia macrocalyx* oscila entre 28-37°

9.3.2- Tolerancia a diferentes niveles de pH

La mayoría de las cepas bacterianas aisladas de los nódulos de la leguminosa *Ormosia macrocalyx* tuvieron capacidad para tolerar diferentes niveles de pH. A excepción de un pH ácido de 4.0 en el cual existió desarrollo únicamente de *pantoea sp.* (Cuadro 9)

El género *Pantoea sp* es capaz de crecer a pH bajos y metabolizar diferentes compuestos salinos entre ellos el NaCl y el fosfato. (Park et al. 2006).

Cuadro 9.- características de crecimiento variando el pH de las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*.

Cepa	Crecimiento				
	4.0	5.0	7.0	9.0	11.0
<i>Bacillus sp</i>	-	-	+	+	+
<i>Citrobacter sp</i>	-	-	+	+	+
<i>Enterobacter sp</i>	-	+	+	+	-
<i>Novosphingobium sp</i>	-	+	+	-	-
<i>Paenibacillus sp</i>	-	+	+	+	+
<i>Pantoea sp</i>	+	+	+	+	+
<i>Sinorhizobium sp.</i>	-	+	+	+	-

(+) Crecimiento, (-) Sin crecimiento.

Para el crecimiento de las bacterias el pH es otro factor esencial, ya que este debe ser óptimo para que la bacteria pueda reproducirse metabólicamente. De acuerdo a lo observado en el cuadro 11 podemos concluir que el pH 7.0 es el pH adecuado para las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*.

9.3.3- Tolerancia a diferentes concentraciones de salinidad

La mayoría de las cepas bacterianas aisladas de los nódulos de la leguminosa *Ormosia macrocalyx* tuvieron capacidad para tolerar diferentes concentraciones de NaCl. (Cuadro 10) A excepción de la concentración del 5.0% en el cual existió desarrollo únicamente de *Bacillus sp* y *Paenibacillus sp* los cuales toleran concentraciones de hasta el 5 y 7% de NaCl (Nagel M. and Andreesen J. 1991).

Cuadro 10.- Características de crecimiento variando la concentración de NaCl de las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*.

Cepa	Crecimiento				
	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%	5.0%
<i>Bacillus sp</i>	+	-	+	+	+
<i>Citrobacter sp</i>	+	+	+	+	-
<i>Enterobacter sp</i>	+	+	+	-	-
<i>Novosphingobium sp</i>	+	+	+	+	-
<i>Paenibacillus sp</i>	+	+	+	+	+
<i>Pantoea sp</i>	+	+	-	-	-
<i>Sinorhizobium sp.</i>	+	+	+	-	-

(+) Crecimiento, (-) Sin crecimiento.

los rhizobio no toleran altas concentraciones de sal y generalmente se encuentra variabilidad ya al 1% de NaCl, siendo capaces de crecer en el 0,5% de NaCl muchos de ellos sin embargo en presencia de 1,5% de sal entran dentro de la normalidad, ya que los rhizobia habitualmente no crecen a concentraciones de NaCl superiores al 2% (Kuykendall, 2005).

9.3.4.- Resistencia intrínseca a los antibióticos

La resistencia de los aislados de *Ormosia macrocalyx* a los antibióticos y concentraciones indicados se muestran en el cuadro 11. Como se puede observar, el patrón de antibióticos fue bastante constante en todos los aislados. Observándose que las bacterias no presentan inhibición alguna para los antibióticos DC y PE, Considerando que algunos antibióticos son muy útiles para diferenciación de especies y en algunos casos también para analizar la diversidad Infraespecífica puesto que dentro de la misma especie se pueden hallar resultados variables. (Ramírez-Bahena et al., 2008)

Cuadro 11.- Prueba de antibióticos a las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*

Cepa	Crecimiento											
	AK	A M	CF	CF X	DC	CT X	CL	GE	NET	NF	PE	STX
<i>Bacillus</i> sp	R	-	-	-	-	-	R	R	R	R	-	-
<i>Citrobacter</i> sp	-	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> sp	R	-	-	-	-	-	R	R	R	-	-	-
<i>Novosphingobium</i> sp	R	-	-	-	-	-	-	R	-	R	-	-
<i>Paenibacillus</i> sp	R	-	-	-	-	-	-	R	R	I	-	R
<i>Pantoea</i> sp	R	-	R	R	-	R	R	R	R	-	-	-
<i>Sinorhizobium</i> sp.	-	-	R	R	-	I	I	-	-	-	-	-

(R)Resistente, (I) Intermedio, (S) Sensible.

El espectro de resistencia natural a antibióticos es una prueba habitual en la caracterización de la rhizobia aunque es una prueba con bajo valor taxonómico porque muchas veces la resistencia natural a antibióticos es codificada en plásmidos y se transfiere fácilmente de unas cepas a otras. Se han realizado numerosos trabajos sobre la tolerancia de la rhizobia a los antibióticos (Amarger, 2001).

9.4 Características genotípicas de las cepas bacterianas

9.4.1.- ADN genómico bacteriano

En la figura 10 se presentan las electroforesis de ADN total de algunas de las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx*, en el primer carril se observa el marcador de peso molecular de 1 kb y en los siguientes el ADN total de las cepas.

Como podemos observar los círculos rojos presentan el arrastre de proteínas y el círculo amarillo indica que el ADN no está presente en la extracción esto puede ser a consecuencia de que la suspensión bacteriana de la que parte el proceso de extracción fue pobre de producto permitiendo la pérdida de las células bacterianas.

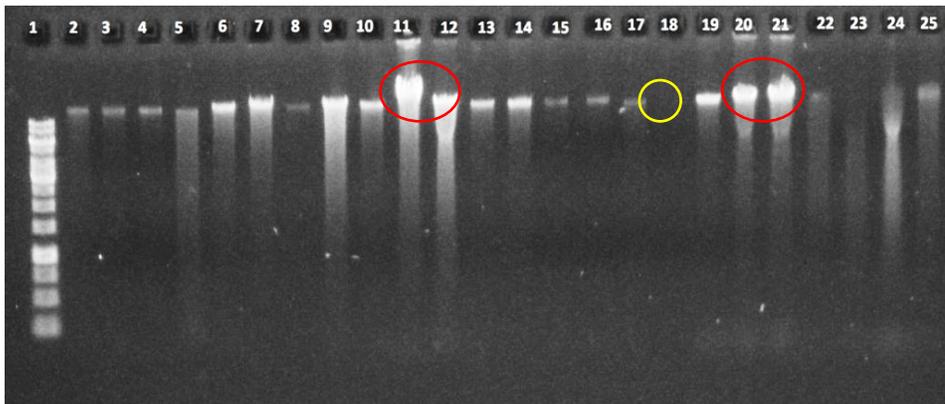


Figura 10.- Extracción de ADN genómico de cepas puras

Con el gel de electroforesis observamos que de las 25 cepas a las que se les extrajo ADN, 4 presentan arrastre de proteínas, lo que implica un ADN ligeramente sucio, 18 presentan ADN limpio y 2 no tienen presencia de ADN.

9.4.2.- Perfil de huellas genómicas ERIC_ PCR

Eric_PCR es una técnica que nos permite discriminar a nivel cepa, permitiéndonos reducir el número de cepas bacterianas iguales en un gel de electroforesis. Presentándonos patrones de huellas genómicas con las cuales se realizan las comparaciones y se agrupan las cepas con las mismas características (figura 11) por medio de la revelación del gel de agarosa.

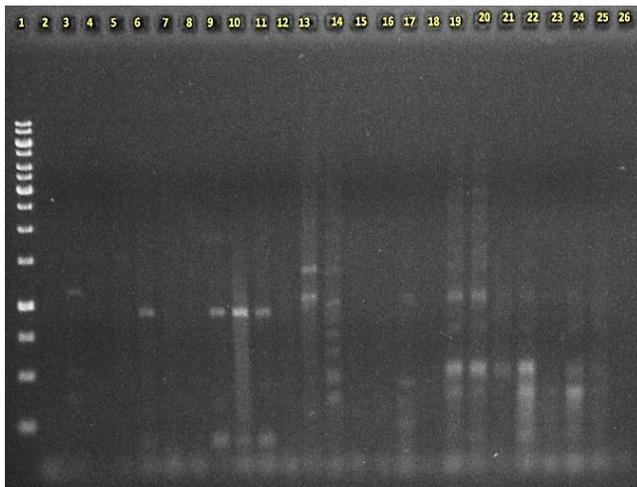
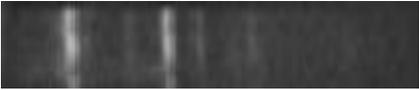
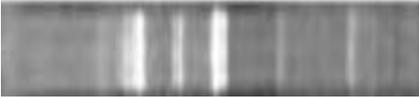
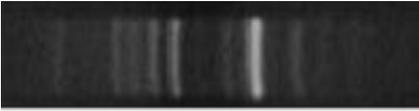
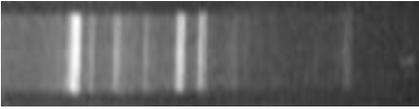
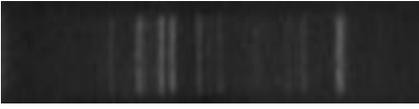
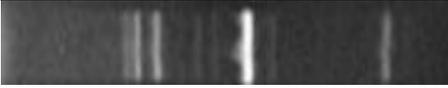
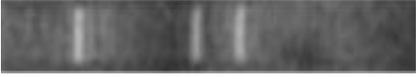
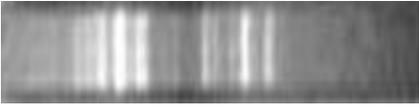


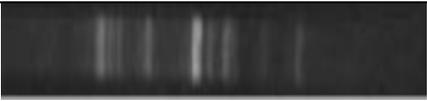
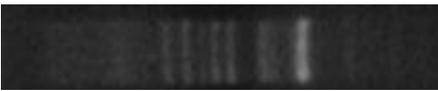
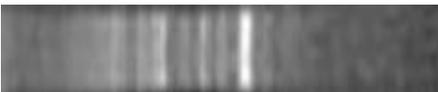
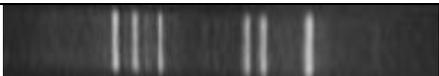
Figura 11.- Perfil de huellas genómicas Eric_PCR

La caracterización genotípica, permitió agrupar a las rizobacterias en 20 grupos (cuadro 14). En donde sobresalió el grupo VIII con 3 cepas.

Cuadro 12.- Clasificación de los grupos Eric_PCR

	CEPA	% DE ABUNDANCIA
	1	4.16
	2	4.16

	3	4.16
	4	4.16
	5	4.16
	6	4.16
	7	4.16
	8,9,10	12.48
	11	4.16
	12	4.16
	13	4.16
	14	4.16
	15	4.16

		
	16	4.16
	17	4.16
	18,19	8.32
	20	4.16
	21,23	8.32
	22	4.16
	24	4.16

Con lo anterior podemos observar que en la leguminosa arbustiva *Ormosia macrocalyx* existe una amplia diversidad de rizobacterias.

9.4.3.- AMPLIFICACION DEL GEN 16S rRNA

De las 25 cepas agrupadas se tomó una cepa representativa de cada uno de los 20 grupos obtenidos a la cual se les realizó la amplificación del gen 16s ARNr, para posteriormente someterlas a un análisis de restricción (ARDRA). Los fragmentos amplificados se muestran en la figura 12 con un tamaño estimado de 1500 pb.

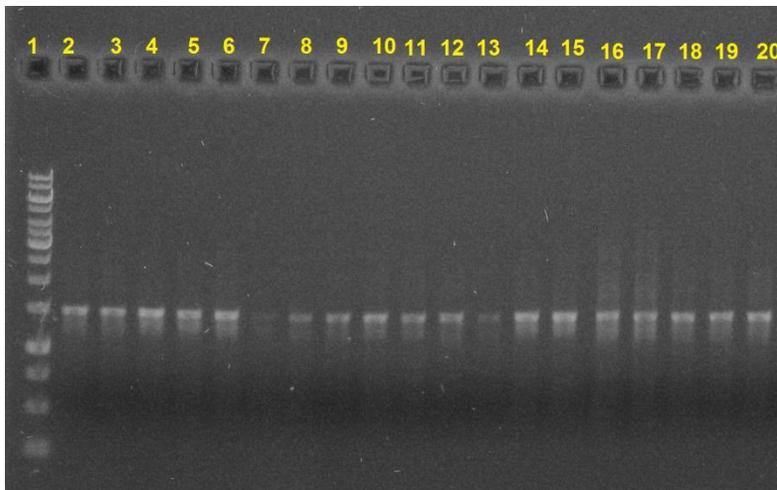


Figura 12.- Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S nos sirve para realizar la prueba de restricción ARDRA que nos permitirá la reducción de nuestras cepas, debido a que esta macromolécula presenta una serie de características, en base a las cuales fue considerado por Woese como cronómetro molecular definitivo (Rodicio& Mendoza, 2005).

Conociendo que el ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Lo que permitirá la expresión del árbol filogenético.

9.4.4.- Perfil de huellas genómicas ARDRA

Se realizaron digestiones con la enzima de restricción Hinf I de los fragmentos amplificados del gen 16S ARNr. Se llevaron a cabo dos pruebas de ARDRA para obtener los resultados de las 12 cepas sin bandaje observados en la revelación del gel de electroforesis (Círculos amarillos) (Figura 13).

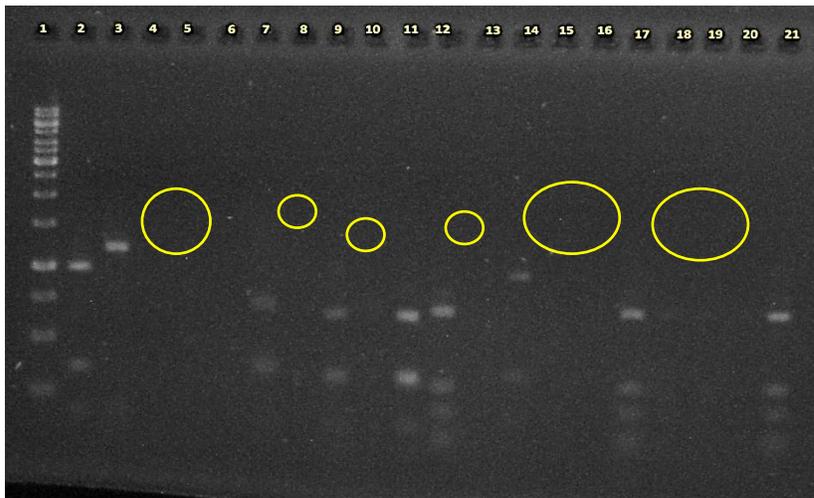


Figura 13.- Perfil de huellas genómicas ARDRA 1

En la segunda digestión con la enzima Hinf I la mayoría de las cepas faltantes presentaron marcaje excepto por 1, 2, 6, 8, 12. Después del revelado del gel de electroforesis se observaron semejanzas entre las cepas aisladas, reduciendo así más la diversidad de especies (Figura 14).

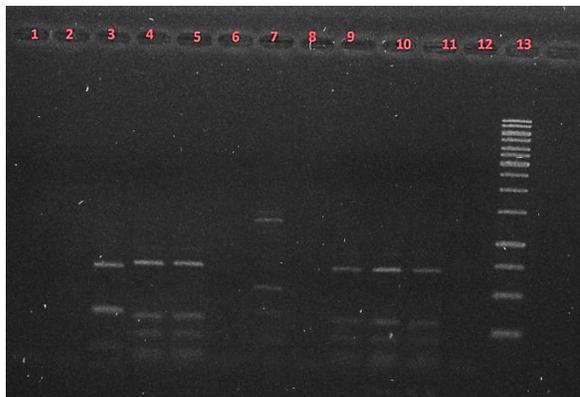


Figura 14.- Perfil de huellas Genómicas ARDRA 2

Se obtuvieron 8 patrones distintos (descartando dos cepas que no amplificaron gen 16s ARNr y no presentaron marcaje de banda), de los cuales 5 fueron patrones únicos, y los 3 restantes se agruparon de 2-7 patrones de restricción. (Cuadro 13).

Cuadro 13.- Agrupamiento de las cepas mediante la prueba ARDRA

GRUPOS	CEPAS
I	1,5,15
II	2
III	6
IV	7, 11, 13, 18, 20, 21, 22, 24
V	8,12
VI	14
VII	16
VIII	17

Las huellas genéticas ARDRA, permitieron determinar 8 especies bacterianas diferentes de acuerdo a los perfiles del gen 16S ADNr, lo que corrobora la amplia diversidad de bacterias asociadas a la leguminosa *O. macrocalyx*.

A estas cepas se les amplificó el Gen 16S en una proporción de 100µL para poderlas purificar y enviarlas a un secuenciamiento.

9.4.5.- ANALISIS FILOGENETICO

Para determinar las cepas con las que trabajamos se secuenciaron parcialmente los genes 16S ADNr de las 8 cepas representantes. Las secuencias del 16S obtenidas de estas cepas fueron alineadas con otras secuencias de diferentes géneros, que presento la base de datos NCBI y ribosomal database Project, las cuales fueron usadas como referencias para el análisis filogenético. (Cuadro 14)

Se registraron solamente 7 cepas debido a que la secuencia parcial de una no presento información sobre esta.

Cuadro 14.- Cepas representativas con un porcentaje de similitud con las aisladas de *Ormosia macrocalyx*

Código de las cepas aisladas	Nombre del genero la Cepa similar
CA-02	<i>Pantoea</i>
CA-03	<i>Enterobacter</i>
CA-11	<i>Bacillus</i>
CA-12	<i>Paenibacillus</i>
CA-14	<i>Sinorhizobium</i>
CA-15	<i>Citrobacter</i>
CA-16	<i>Novosphingobium</i>

El árbol filogenético (Figura 15) fue construido por el algoritmo de Neighbor-Joining, usando secuencias de genes 16S ARNr las cepas fueron comparadas con secuencias análogas obtenidas del GenBank en la página web del “National Center for Biotechnology Information (NCBI)”. Al igual que con cepas tipo obtenidas de “Ribosomal Database Project” representantes de los géneros bacterianos presentados en el cuadro 14.

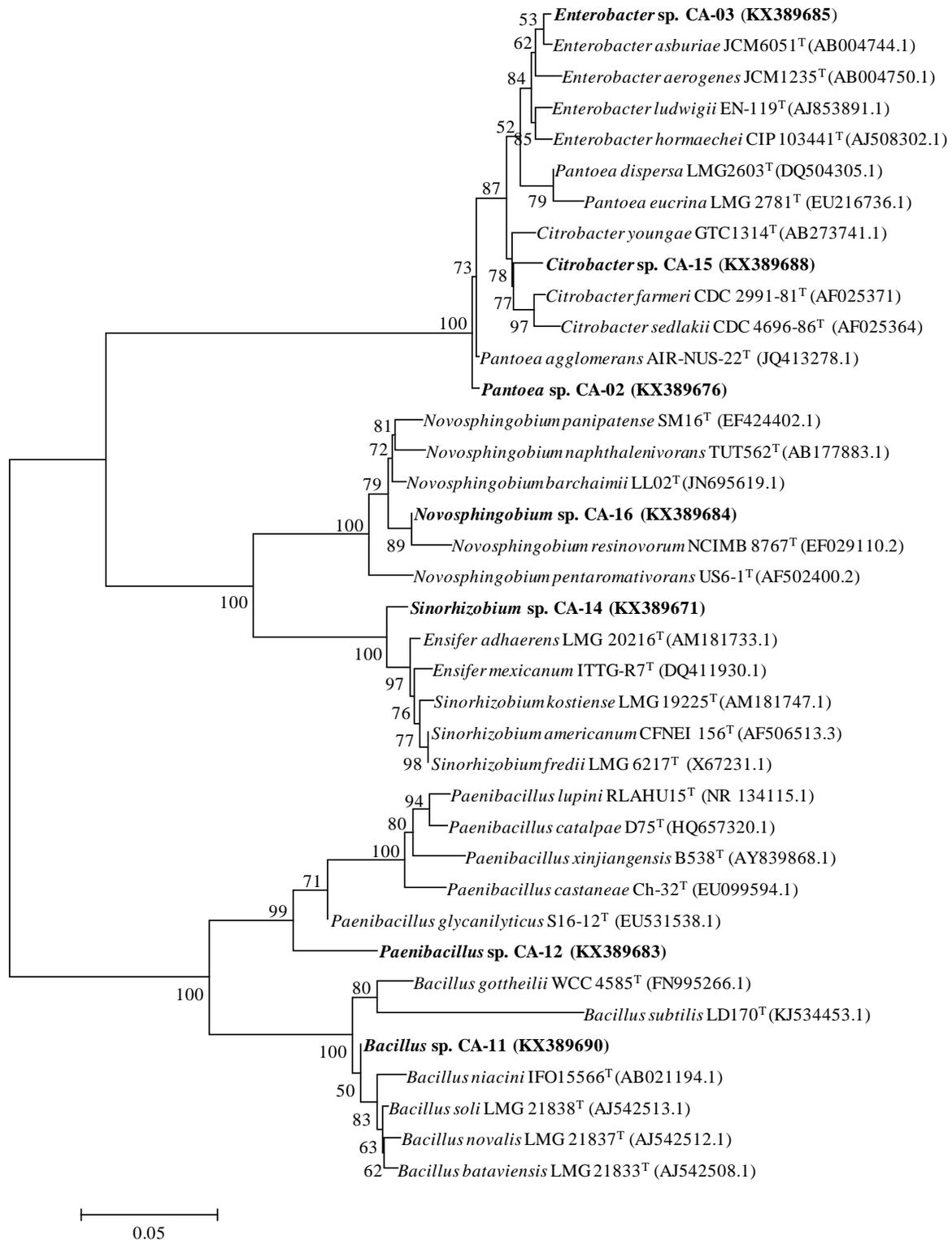


Figura 15.- Árbol filogenético de las especies aisladas de *Ormosia macrocalyx*.

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. Dándonos a conocer cuál es la especie evolutivamente hablando con la más se parece, obteniendo así datos relevantes de la cepa a estudiar y cuáles son sus posibles resultados si existen experimentos sobre ella.

La comparación de las secuencias de los ARNr 16S (o de los genes que los codifican) permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariontas. Este hecho ha tenido una enorme repercusión en taxonomía bacteriana, dando lugar al sistema de clasificación vigente y permitiendo la identificación rápida y precisa de las bacterias. En microbiología clínica la identificación molecular basada en el ADNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. Esto último ha conducido al descubrimiento de nuevos agentes patógenos. Teniendo en cuenta su potencialidad. A medida que los recursos técnicos aumenten y el precio se haga más competitivo, la identificación bacteriana basada en el ARNr 16S encontrará probablemente una aplicación más amplia en el laboratorio de microbiología clínica.

X. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que:

A partir de 140 cepas aisladas y mediante las pruebas realizadas como huellas genómicas obtuvimos un total de 7 especies diferentes, Determinando que existe diversidad genética en *Ormosia macrocalyx*. En su totalidad excepto por un género las cepas resultaron ser Gram negativas. Los géneros bacterianos que se encuentran en esta leguminosa fueron *Pantoea*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sinorhizobium*, *Citrobacter*, *Novosphingobium*, predominando con un total de 8 cepas el género de *Novosphingobium*. La secuenciación del ARNr 16S constituye un método rápido y eficaz de identificación bacteriana, del cual puede beneficiarse la microbiología, al igual que otras ramas de esta.

Las cepas aisladas de *Ormosia macrocalyx* presentaron tolerancia a diferentes condiciones de crecimiento, como tolerancia a NaCl, a diferentes niveles de temperatura e incluso un pH básico, son resistentes a la mayoría de los antibióticos en especial *Pantoea*, *Bacillus* y *Citrobacter*. Esto indica un alto índice para poder ser Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

XI. COMPETENCIAS DESARROLLADAS

Con esta residencia profesional pude obtener, desarrollar, fortalecer y aplicar las habilidades necesarias para realizar las actividades específicas que me fueron asignadas, como el manejo de equipos de laboratorio, técnicas como extracción de ADN, Eric_PCR, 16S y ARDRA, al igual que trabajo en equipo, colaborativo y sistemático. Obteniendo responsabilidades que me permitieron madurar profesionalmente.

Otro punto importante a destacar fue el conocimiento sobre la planeación de actividades de investigación, el seguimiento de proyectos, manejo de conflictos, capacidad de decisión, creatividad e innovación, y al mismo tiempo se generó habilidad para consulta de información de carácter científico actualizada en los recursos digitales.

Por ello, esta experiencia que fue una oportunidad dada termina por definir y orientar mi formación profesional de una manera significativa, dándome una fuerte toma de decisiones que me permitirán cumplir mis metas futuras.

XII. RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas bioquímicas a las cepas para comprobar su producción de exopolisacaridos para con ello determinar protocolos de extracción ADN dirigidos a este tipo de bacterias con el fin de obtener ADN de mayor calidad.
- *Ormosia macrocalyx* presenta 7 diferentes géneros bacterianos en su rizósfera por lo que es necesario realizar un estudio de diversidad más amplio, promoviendo una investigación científica más afondo que nos permita realizar comparaciones con leguminosas de la misma especie o del mismo género.
- Realizar una investigación más a fondo sobre el potencial biotecnológico que pueden tener las cepas caracterizadas en este proyecto.
- Realizar las pruebas de PGPB en invernadero para determinar las características de las cepas como biofertilizantes, para comprobar su uso como este.

XIII. LITERATURA CONSULTADA

- Amarger, N. (2001). Rhizobia in the field. En *Advances in Agronomy*. London (UK): Academic Press.
- Anaya Lang, A (2003). *Ecología química*. Relaciones simbióticas entre microorganismos. Editorial plaza valdes. 1era edición. Pag 118
- Ascencio, R. J. M. & Maldonado M. F. 2002. El jardín botánico universitario “José Narciso Rovirosa” un esfuerzo para la conservación de la flora tabasqueña. *Kuxulkab Revista de Divulgación*, 7(14): 34-47.
- Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013; **28**:1327–1350.
- Barioglio C. 2006. *Diccionario de las ciencias agropecuarias*. Editorial Brujas, 396-495 pages
- Bashan Y.; Holguin G.; Ferrera-Cerrato R. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos I. *Azospirillum*. *Terra Volumen 14 Número 2*. pp. 159-194
- Bashan Yoav; Gina Holguin; Ran Lifshitz. 1993. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. Capítulo 21, 332-342 p.

- Bashan, Y., and Holguin, G. 1998. Proposal for the division of the plant growth-promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1225-1228.
- Bashan, Y., Y. Ream, H. Levanony y A. Asade. 1989. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany* 67: 1317-1324.
- Camacho-Cruz, A., M. Gonzalez-Espinosa, J.H.D., Wolf y B.H.J. de Jong. 2000. Germination and survival of tree species in disturbed forests of the highlands of Chiapas, Mexico. *Canadian Journal of Botanic* 78:1309-1318.
- Camacho, M. F. 1994. Dormición de semillas, causas y tratamientos. Ed. Trillas, México, 128 p.
- Challenger A, Soberón J (2008). Los ecosistemas terrestres. *Capital natural de México* vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 87-108.
- DasSarma, S. & P. Arora. 2001. Halophiles. *Enciclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group/www.els.net: 1-9
- Döbereiner, J. 1979. "Fixação de Nitrogênio em Gramíneas Tropicais". *Interciencia* 4(4): 200-206.
- Döbereiner, J. 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Editado por Kassem Alef y Paolo Nannipieri. Academic Press Limited. London, Great Britain. pp. 134-139.

- Farrel N. 2009. *Environmental Health Perspectives*, volumen 117, .salud pública de méxico / vol. 51, número 6, junio, páginas A244-A250
- Figueroa, J. 2000. Aspectos ecologicos de la germinacion en especies del bosque templado-humedo del sur de Chile. *Revista Chilena de Flora y Vegetacion Chloris Chilensis*. 3(2). <http://www.chlorischilecl/semillas/semillas.htm>.
- Hall TA. 1999. Bioedit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95–98.
- Harms, K.E. y C.E.T. Paine. 2003. Regeneracion de arboles tropicales e implicaciones para el manejo de bosques naturales. *Revista Ecosistemas* 3. 16p. http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8893/1/ECO_12%283%29_03.pdf
- Ibarra – Manríquez, G., M. M. Ramos, and K. Oyama. 2001. Seedling functional types in a lowland rain forest in México. *Am. J. Bot.* 88: 1801 -1812.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2006. Cuaderno estadístico municipal, Teapa, Tabasco. México, INEGI.
- Joklik, W., Willet, H., & Amos, D. (1994). *ZinsserMicrobiología*. Madrid: Médica Panamericana.
- Kloepper J.W., Leong J., Teintze M., Schroth M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*. 286: 885-886.
- Kumar A, Seringhaus M, Biery MC, Sarnovsky RJ, Umansky L, Piccirillo S, Heidtman M, Cheung KH, Dobry CJ, Gerstein MB, Craig NL, Snyder M.

(2004) Large-scale mutagenesis of the yeast genome using a Tn7-derived multipurpose transposon. *Genome Res* 14(10A):1975-86

- Kuykendall, L. D. (2005). Order VI. Rhizobiales ord. nov. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (The Proteobacteria), part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria), p. 324. New York: Springer.
- Lanly, J.P. 2003. Deforestation and forest degradation factors. Congress Proceedings B, XII World Forestry Congress, 21-28 September 2003, Quebec, Canada. Pp. 75-83.
- Llamozas, S., Duno, R., Meier, W., Riina, R., Stauffer, F., Aymard, G., Huber, O. y R., Ortiz. 2003. Libro Rojo De La Flora Venezolana. Fundación Polar. Caracas (Venezuela). 555p
- Mallik, M.A.B. and Williams, R.D. (2008). Plant growth promoting Rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S.M., editors. *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*, New York: Springer. Pp. 321-345.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091
- Navarro, h. & Martín, j. (2011). *Problemas resueltos de iniciación al análisis estadístico de datos*. ES: UNED.

- Pérez, H.I. 2009. Germinación y sobrevivencia de plántulas de seis especies forestales nativas tropicales de la sierra de Tenosique, Tabasco, México. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. Villahermosa, Tab. pp. 129.
- Polhill, R. M. 1981a. Papilionoideae. Pages 191 208. *In*: R. M. Polhill & R H. Raven, editors. *Advances in legume systematics. Part 1.* Royal Botanic Gardens, Kew
- Pumarola, A. (1990). *Microbiología y parasitología medica.* España: Salvat.
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Willems, A. y Velázquez, E. (2009a). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1929-1934.
- Ricker, M., Daly, D., Veen, G., Robbins, E., V., M., & I., J. et al. (1999). Distribution of Quinolizidine Alkaloid Types in Nine *Ormosia* Species (Leguminosae-Papilionoideae). *Brittonia*, 51(1), 34
<http://dx.doi.org/10.2307/2666554>
- Rodicio, M. & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245. <http://dx.doi.org/10.1157/13059055>
- Roman, F.; De Liones R.; Sautu A.; Deago J.; Hall J. 2012. Guía para la propagación de 120 especies de árboles nativos de Panamá y el Neotrópico. Environmental Leadership and Training Initiative – ELTI Yale School of Forestry & Environmental Studies 205 Prospect Street, New Haven, CT 06511, USA pag 113

- Rudd, V.E. 1965. The American species of *Ormosia* (Leguminosae). Contr. U.S. Natl. Herb. 32: 275-391.
- Sautu, A., Baskin, J. M., Baskin, C.C. y R. Condit. 2006. Studies on the seed biology of 100 native species of trees in a seasonal moist tropical forest, Panama, Central America. *Forest Ecology and Management*, 234: 245-263.
- Son, H., Park, G., Cha, M., & Heo, M. (2006). Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt- and pH-tolerant Pantoea agglomerans R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology*, 97(2), 204-210.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.021>
- Taxonomy Browser *Ormosia macrocalyx* Ducke, base de datos NCBI.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=681472>
- Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. <http://www.ujat.mx/dceymst/22709>
- U. S. Dept. Agric. Tech. Bull. No. 1029, 1951 J. Tropical Med. Hyg., 42 : 176, 1939 American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods. Segunda Edición. 1984
- Vazquez-Yanes, C. y A. Orozco-Segovia. 1992. El bosque lluvioso en America Tropical: Dinamica forestal, reforestacion, manipulacion de las semillas y problemas de manejo. *Tree Planters Notes* 43(4):119-124.
- Willan, R.L. 1991. Guía para la manipulación de semillas forestales, estudio con especial referencia a los tropicos. FAO Montes 20/2. Roma, Italia. 502 p.