

03062

7



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

CENTRO DE INVESTIGACIÓN SOBRE FIJACIÓN
DE NITRÓGENO

DETECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS
DIAZÓTROFAS ENDÓFITAS DEL MAÍZ

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
PRESENTA:

PAULINA ESTRADA DE LOS SANTOS

JUNIO, 2000

279759



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Programa de Ecología Molecular y Microbiana del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la Asesoría del Dr. Jesús Caballero Mellado.

Comité Tutorial durante el posgrado:

Dr. José de Jesús Caballero Mellado (Tutor principal)

Dra. María Esperanza Martínez Romero

Dr. David René Romero Camarena

Jurado de Examen:

Dr. José de Jesús Caballero Mellado

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Dra. María Esperanza Martínez-Romero

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Dra. María Valdés Ramírez

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	9
Objetivos.....	11
Material y Métodos.....	12
Resultados.....	23
Discusión.....	56
Conclusiones.....	69
Perspectivas de investigación.....	70
Anexo.....	71
Referencias bibliográficas.....	74

RESUMEN

El maíz es uno de los cultivos agrícolas más importantes en México y en el mundo. Su importancia deriva tanto de su uso como fuente alimenticia para el mexicano, como por la gran cantidad de subproductos que pueden ser obtenidos de él. Tomando como base las altas tasas de fijación biológica del nitrógeno registrados en la caña de azúcar (50-80 % del N de la planta), se ha sugerido que las bacterias endófitas pudiéran ser más importante que las rizosféricas sobre el crecimiento de las plantas. A pesar del conocimiento que se tiene sobre la presencia de bacterias endófitas del maíz, el estudio de los diazótrofos en esta planta es prácticamente nulo. Sobre esta base resulta importante investigar la presencia de bacterias endófitas del maíz y evaluar su contribución sobre el crecimiento y en la economía del nitrógeno de la planta.

La presencia de bacterias diazótroficas endófitas se determinó en dos variedades de maíz ("rojo" y "piedra blanca") cultivadas en la región indígena Mije de Oaxaca. Mediante cromatografía de gases se detectó actividad reductora de acetileno (ARA) en macerados de plantas de maíz inoculadas y no inoculadas con suelo rizosférico, pero esta actividad no se registró en granos de maíz germinados. El número total de diazótrofos endófitos encontrados fue en el orden de 10^4 UFC/g de tejido fresco. De las cepa aisladas del maíz "rojo", 13 fueron identificadas como diazótrofos mediante ensayos de reducción de acetileno e hibridación con los genes *nifHDK* de *Rhizobium etli*. Del maíz "piedra blanca" se aislaron 15 cepas diazótroficas. Mediante el uso de pruebas bioquímicas se determinó que los diazótrofos encontrados en el interior de las plantas de maíz pertenecen a los géneros *Kebsiella*, *Enterobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia*. El hallazgo de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia* resulta interesante debido a que hasta ahora solo se ha reportado la asociación de diazótrofos de este género con el arroz. Además, mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S se determinó que los aislados no pertenecen a alguna de las especies fijadoras conocidas del género *Burkholderia*, lo cual indica que se trata de nuevas especies de este género. No obstante, para definir la posición taxonómica correcta de estas cepas se requiere de un análisis más amplio, en el cual se deben incluir ensayos de homología DNA-DNA. Ensayos de inoculación en dos variedades de maíz (híbrido y criollo) con los aislados identificados como *Enterobacter* y *Burkholderia* fueron llevados a cabo. La respuesta del maíz a la inoculación resultó variable dependiendo de la cepa, la variedad de maíz y la adición de nitrógeno mineral. Determinación del nitrógeno total en las plantas de maíz muestra que las plantas inoculadas poseen un nivel más alto que el de las testigo. No obstante, la determinación del porcentaje de nitrógeno en plantas inoculadas y no inoculadas muestra que los niveles de este elemento son similares, sugiriendo que la contribución bacteriana al crecimiento de las plantas no fue a través de la FBN. La producción de compuestos auxínicos en medio de cultivo por las cepas de *Enterobacter* sugiere que la contribución al crecimiento de las plantas de maíz podría deberse a estos compuestos. El mecanismo mediante el cual la cepa identificada como *Burkholderia* promueve el crecimiento de las plantas de maíz se desconoce.

En este trabajo se demuestra que los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo los tejidos internos de las plantas donde no causan daño. Sin embargo, la presencia endófitica de los diazótrofos no significa que la FBN se lleve a cabo en interior de las plantas, pero sugiere que dicha actividad pudiera expresarse.

INTRODUCCION

En la naturaleza existe un gran número de microorganismos entre los cuales se incluyen especies de hongos, actinomicetos y bacterias. Por citar un ejemplo, tan solo en una pequeña porción de suelo pueden encontrarse varios cientos de millones de ellos (Torsvik y col. 1990). Sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre los microorganismos es escaso, ya que la gran mayoría son ignorados o desconocidos a menos que sean los causantes de alguna enfermedad o de la pudrición de alimentos.

Se conoce que del total de las bacterias observadas al microscopio, sólo entre el 0.1 y 1 % logran ser cultivadas en el laboratorio (Torsvik y col. 1990). Bull y col. (1992) refieren en cerca de 5,000 el número de especies de organismos no eucarióticos, y de acuerdo con sus estudios presentan un estimado total de 40,000 especies bacterianas en la naturaleza, calculando que el porcentaje de bacterias conocidas asciende a un 12 %.

Hoy en día es aceptado generalmente, que el conocimiento sobre los microorganismos se ve limitado severamente debido a la necesidad de obtener cultivos puros para su caracterización. Por ejemplo, mediante el uso de métodos dependientes de medios de cultivo la estructura de una comunidad bacteriana no puede ser descrita adecuadamente debido a que pueden obtenerse resultados parciales (Wagner 1993). Existen distintas razones que impiden cultivar a un gran número de microorganismos, entre éstas se encuentran las interdependencias que existen entre muchos de ellos, y en algunos casos, el microorganismo puede encontrarse en un estado viable pero no cultivable (Oliver y col. 1991). Es conocido también que, dependiendo de la composición y características fisicoquímicas del medio de cultivo utilizado se logra el aislamiento de solo algunos grupos bacterianos (Balandreau 1983).

En la actualidad la diversidad puede conocerse independientemente del cultivo de los microorganismos. Al respecto, Torsvik y col. (1990) han demostrado una alta diversidad bacteriana en el ambiente del suelo. Estos autores, mediante la desnaturalización térmica y reasociación del DNA, determinan que la mayor parte de la diversidad encontrada pertenece a una porción de la comunidad que no puede ser aislada ni cultivada en el laboratorio.

El interés reciente que han despertado los microorganismos, en particular las bacterias, se debe en gran medida al impacto benéfico que algunas especies tienen sobre la actividad del ser humano. Se reconoce el importante papel que juegan en la biotecnología, en la producción

de alimentos, medicamentos y energía (Madigan y col. 1997). Así mismo, es reconocido el papel que desempeñan en los procesos biogeoquímicos en la naturaleza y en la agricultura (Madigan y col. 1997). En este último caso, se conoce que las plantas pueden interactuar con una gran variedad de bacterias rizosféricas y que algunas de estas relaciones resultan favorables para su crecimiento. Distintos mecanismos bacterianos mediante los cuales las plantas se ven favorecidas han sido descritos. Entre éstos se encuentran la solubilización de minerales (Graham 1986), la supresión de patógenos (Weller 1988), la producción de hormonas reguladoras del crecimiento vegetal (Holland y Polacco 1994) y la fijación biológica de nitrógeno, FBN (People y col. 1995).

Tomando en cuenta algunos de estos mecanismos, distintas especies bacterianas han sido seleccionadas para llevar a cabo ensayos de inoculación de cultivos de gran importancia agronómica. Los primeros éxitos de la inoculación bacteriana fueron obtenidos con el uso de diferentes especies de *Rhizobium* asociadas a leguminosas, en donde se ha demostrado que el efecto benéfico se debe a la FBN. Sin embargo, el éxito de *Rhizobium* debido a la FBN parece estar restringido a la simbiosis con la leguminosa hospedera. En experimentos de inoculación de arroz con *R. leguminosarum* bv. trifolii se encontró un incremento significativo en el peso seco de las plantas, pero los resultados obtenidos en el contenido de nitrógeno de éstas no fueron contundentes para ser atribuidos a la FBN, lo cual sugirió que algún otro mecanismo fue el responsable de los incrementos observados (Yanni y col. 1997). Estos autores propusieron como mecanismo alternativo la producción de fitohormonas, considerando que éstas estimulan el crecimiento radical de las plantas y con ello la eficiencia en la captación de nutrientes y el agua del suelo.

La inoculación de cepas de *Pseudomonas* spp. y *Klebsiella* spp. a plántulas de manzano mostró incrementos en su crecimiento hasta en un 65 %, lo cual, aparentemente se debe a un efecto antagónico sobre los hongos patógenos (Caesar y Burr 1988).

El análisis de los resultados obtenidos de numerosos experimentos de inoculación de diferentes gramíneas con *Azospirillum* spp. mostraron que entre el 60-70 % de los experimentos fueron exitosos, observándose incrementos significativos en la producción de los cultivos en el orden de 5 a 30 % (Okon y Labandera 1994). El principal mecanismo involucrado en la promoción del crecimiento de las plantas se ha atribuido a la capacidad de *Azospirillum* spp. para producir fitohormonas. Actualmente el uso de inoculantes de

Azospirillum spp. está cobrando auge en la agricultura intensiva de países como Francia y Sudáfrica (Y. Okon com. pers.), y en México se han inoculado 750 mil hectáreas de maíz, trigo y cebada (CIFN, UNAM-INIFAP, SAGAR) con resultados exitosos.

No obstante el éxito obtenido con la inoculación de distintas especies bacterianas, se reconoce que éste parece depender de distintos factores. Entre éstos se encuentran el número óptimo de células en el inóculo y el método de inoculación utilizado. Un gran énfasis se ha puesto sobre la necesidad de poseer un mayor conocimiento sobre la interacción de *Azospirillum* spp. con la planta y su capacidad de colonizar la rizosfera antes de seleccionar cepas para fines agronómicos (Assmus y col. 1995). Estos autores demuestran que la distribución de *Azospirillum brasilense*, en la rizósfera o en el interior de las raíces de trigo, depende de la cepa inoculada.

Es interesante señalar que aún en la década de los '40s se consideraba que una planta saludable se mantenía estéril en su interior, sin embargo, Schanderl (1940, citado por Dobereiner y col. 1993) realiza una extensa revisión en la literatura y concluye que las bacterias son habitantes normales de los tejidos internos de las plantas. Estudios recientes han confirmado la presencia de bacterias en el interior de las plantas sin causar daño visual. Esta clase de microorganismos podrían ser más importantes que las poblaciones residentes en el ambiente rizosférico debido a que se encuentran en una mejor ubicación para aprovechar los nutrientes en el interior de la planta, los cuales, podrían ser utilizados para el desarrollo de las actividades bacterianas que contribuyan con el desarrollo de la planta. Por ejemplo, el nitrógeno fijado durante la FBN o las hormonas producidas por la actividad bacteriana podrían ser liberadas directamente en el interior de las plantas. Si una bacteria es capaz de invadir y proliferar en el interior de las plantas sin causarle daño, probablemente existirá una interacción más íntima con el hospedero que cuando la bacteria se encuentra en la rizosfera o en el rizoplano (Reinhold-Hurek y Hurek 1998b).

Las bacterias que se encuentran en el interior de las raíces de las plantas se han denominado frecuentemente como organismos endorizosféricos (van Peer y col. 1990, Hurek y col. 1994), término que Kloepper y col. (1992) proponen eliminar debido a que la palabra endorizosfera describe al suelo y no a un nicho dentro de la planta. Estos autores mencionan que los microorganismos que habitan el interior de la raíz podrían denominarse colonizadores internos de la raíz o alternativamente endófitos. Sin embargo, la palabra endófito ha sido

utilizada también para definir a grupos de hongos que invaden el interior del tallo y las hojas de plantas sin causar síntomas de enfermedad (Wilson 1993).

Existen distintas definiciones que han sido aplicadas al término endófito. Se ha propuesto que endófito podría referirse simplemente a la localización del organismo: endo, que significa dentro y fito, que significa planta y que dicho término debe incluir hongos y bacterias (Wilson 1995). Endófito ha sido definido también como aquella bacteria que habita el tejido vivo de una planta sin causar daño o recibir algún beneficio más que el de una “residencia segura” (Kado 1991). Otra de las definiciones dadas al término endófito es la de aquel microorganismo que habita el interior de la planta durante la mayor parte de su ciclo de vida sin causar síntomas aparentes de enfermedad (Quispel 1992). Reinhold-Hurek y Hurek (1998a) adoptan esta definición y además proponen el término de endófito oportunista para aquel microorganismo invasivo que vive comúnmente en el suelo. James y Olivares (1997), cuando se refieren a bacterias endófitas, retoman la definición de endófito que Kloepper y col. (1992) proponen. No obstante, esta definición no hace ninguna distinción entre bacterias patógenas y no patógenas. Es conocido que existe una línea divisoria muy fina entre endófitos patógenos, no patógenos y simbioses. Los endófitos y endosimbioses pueden evolucionar a organismos patógenos debido a cambios ambientales o del hospedero (Kado 1991). También, algunas bacterias pueden comportarse o no como patógenos dependiendo de la planta que colonizan. Por ejemplo, *Herbaspirillum seropedicae* pueden infectar tanto el sorgo como el pasto Napier produciendo la enfermedad “mottled stripe”, mientras que la caña de azúcar no es dañada por esta bacteria (Pimentel y col. 1991). A pesar de la variación en las distintas definiciones utilizadas para describir a un endófito, todas éstas coinciden en que el organismo, patógeno o no, hongo o bacteria, se encuentra localizado en los tejidos internos de una planta.

La presencia de bacterias endófitas no patógenas, o al menos no causantes de daño aparente, ha sido reportada en tejidos de plantas como limón (Gardner y col. 1982), remolacha (Jacobs 1985), alfalfa (Gagné y col. 1987), algodón (Mishagi y Donndelinger 1990), maíz (Fisher y col. 1992), vid (Bell 1994), maíz dulce y algodón (McInroy y Kloepper 1995a) y papa (Sturz 1995). Los géneros bacterianos que frecuentemente logran ser aislados de las distintas plantas son *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas*.

Dentro de las bacterias endófitas existe un grupo que ha resultado de particular interés; en éste se encuentran algunas bacterias que poseen la capacidad de fijar nitrógeno o denominadas

simplemente como diazótrofos endófitos. Distintos diazótrofos endófitos han sido aislados de plantas como caña de azúcar (Rennie y col. 1982, Cavalcante y Dohereiner 1988, Fuentes-Ramírez y col. 1993), kallar grass (Reinhold-Hurek y col. 1993a), palmeras productoras de aceite (Ferreira y col. 1995), piña (Tapia-Hernández y col. 2000), plátano (Weber y col. 1995), sorgo, *Panicum maximum*, *Digitaria decumbens*, *Brachiaria decumbens*, *Melinis minutiflora* (Olivares y col. 1996), maíz dulce y teocintle (Palus y col. 1996), arroz (Barraquío y col. 1997), cafeto (Jiménez-Salgado y col. 1997), *Penissetum purpureum*, *Miscanthus sinensis*, *M. sacchariflorus* y *Spartina pectinata* (Kirchhof y col. 1997). Entre los distintos diazótrofos endófitos que han sido aislados se encuentran *Acetobacter diazotrophicus*, especies de *Azoarcus* y *Azospirillum*, así como especies de *Enterobacter*, *Herbaspirillum* y *Klebsiella*.

Se han propuesto diferentes vías de penetración y diseminación endófitas de las bacterias en la planta. Mundt y Hinkle (1976), analizando óvulos y semillas de distintas especies de plantas, aislaron de sus interiores diferentes bacterias, siendo éstas distribuidas en 19 géneros y 46 especies. De estos resultados propusieron que las bacterias evaden los mecanismos de protección de la planta y son transportadas y depositadas en el interior de los óvulos. McInroy y Kloeppe (1995b) destacan que las bacterias endófitas son habitantes naturales de las regiones internas de la raíz y tallo de maíz dulce y algodón y sugieren que provienen de la semilla y del suelo. Algunas evidencias indirectas han permitido sugerir que las bacterias pueden entrar a la planta a través de las heridas producidas naturalmente o en los espacios que se generan por las células que se pierden durante el crecimiento de la raíz, así como en las uniones de las raíces laterales (Gagne y col. 1987, van Peer y col. 1990, James y col. 1994). También se ha sugerido que la penetración de las bacterias a la planta ocurre en las uniones de las células epidérmicas y corticales y a través de las heridas producidas en los puntos de emergencia de las raíces laterales (Reinhold y Hurek 1988). Es posible que las bacterias "endófitas oportunistas" alcancen el interior de la planta mediante la agregación con bacterias que poseen la capacidad de entrar a la planta (van Peer y col. 1990). La presencia de enzimas celulolíticas en *Azoarcus* sugiere que esta bacteria podría infectar las raíces de *Leptochloa fusca* mediante la degradación de la celulosa, la cual es uno de los principales constituyentes de las plantas (Reinhold-Hurek y col. 1993b). Del mismo modo se sugiere que en el proceso de infección de trébol por *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii se encuentren involucradas

enzimas que degradan la pared celular de las células de la raíz (Mateos y col. 1992). Otros puntos posibles de entrada son los estomas (Ruppel y col. 1992) y las flores. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* es capaz de colonizar las cavidades sub-estomáticas en la caña de azúcar, lo cual indica una vía probable de entrada y salida de la bacteria a través de los estomas de la planta (Olivares y col. 1997), además es posible que las bacterias se diseminen a través del viento infectando otras partes de la planta u otras plantas. Isopi y col. (1995) determinaron que *A. diazotrophicus* puede introducirse a plantas de *Sorghum bicolor* cv. Keller vía esporas de hongos micorrízicos, pero también se sugiere que pudiera transmitirse y diseminarse a través de algunos insectos homópteros (Ashbolt e Inkerman 1990). La caña de azúcar, al igual que otras gramíneas, es una planta que se cultiva mediante propagación vegetativa. Esta forma de reproducción podría ser otra vía probable de transmisión y diseminación de las bacterias que se encuentran en el interior de las plantas.

Una vez dentro de la planta, las bacterias pueden migrar y establecerse en aquellos tejidos donde las condiciones de crecimiento sean las óptimas (Fisher 1992). Se ha sugerido que el xilema es un buen sitio para que las bacterias diazótropas lleven a cabo la FBN y para el intercambio de metabolitos entre la planta y la bacteria endófita (James y col. 1994). Esto podría ser particularmente cierto, ya que algunos fijadores de nitrógeno se han localizado en el xilema de plantas de familias distintas (Ruppel y col. 1992; Hurek y col. 1994; Caballero-Mellado y col. 1997; Olivares y col. 1997; Fuentes-Ramírez y col. 1999). Por supuesto, la presencia de bacterias en el xilema no es indicativo que la FBN u otra actividad bacteriana que promueva el crecimiento de las plantas se lleven a cabo en las mismas.

Aún cuando existen evidencias que muestran las vías de entrada de las bacterias a las plantas y se conoce su presencia endófita, poca información se tiene sobre los factores involucrados en la interacción de planta con bacterias benéficas. La simbiosis entre *Rhizobium* y plantas leguminosas es una de las interacciones más estudiadas. En esta relación existe un intercambio de señales entre la planta y la bacteria que conducen a la formación de un nódulo en donde la bacteria lleva a cabo la FBN (Schultze y Kondorosi 1998). Sin embargo se ha visto que la formación del nódulo y la FBN se inhiben en presencia de nitrógeno mineral (Schultze y col. 1994). El establecimiento de *A. diazotrophicus* en el interior de la caña de azúcar parece estar ligado a la concentración de nitrógeno mineral aplicado al suelo donde crece la planta (Fuentes-Ramírez y col. 1993). Estos autores observaron que la cantidad de

aislamientos de *A. diazotrophicus* obtenidos en plantas de caña cultivadas con altas dosis de fertilizantes nitrogenados es menor a la de aquellas cultivadas con menor cantidad de nitrógeno, resultado que ha sido confirmado por Muthukumarasamy y col. (1999). La misma situación se presenta, aparentemente, con esta bacteria cuando la planta de pina (*Ananas*) es fertilizada (Tapia-Hernández y col. 2000). Similarmente, el número de diazótrofos endófitos detectados en plantas gramíneas distintas, cultivadas sin la adición de fertilizantes nitrogenados, es mayor que el de plantas fertilizadas con nitrógeno mineral (Kirchhof y col. 1997). Aunado a lo anterior, se ha observado que la población de *A. diazotrophicus* aislada de plantas de caña de azúcar que se cultivan con altas dosis de fertilizantes nitrogenados exhibe una menor diversidad genética que la población aislada de caña cultivada con bajos niveles (Caballero-Mellado y col. 1995). Recientemente se observó que la adición de fertilizantes nitrogenados a plantas de frijol reduce la diversidad genética de las poblaciones de *Rhizobium* que se recuperan de los nódulos de esta planta (Caballero-Mellado y Martínez-Romero 1999).

Aparentemente, cuando una bacteria traspasa las barreras físicas de una planta, ésta lleva a cabo la selección de ciertos genotipos bacterianos en el interior de la misma y como consecuencia existe una diversidad reducida, en comparación con la población del suelo (Reinhold-Hurek y Hurek 1998b). Esta aparente selectividad ejercida por la planta ha sido documentada anteriormente con el análisis de poblaciones de *Bacillus polymyxa* (Mavingui y col. 1992) y de *Pseudomonas* (van Peer y col. 1990). En el caso de *Bacillus polymyxa*, la población en suelo rizosférico y no rizosférico de plantas de trigo presenta una diversidad genotípica y fenotípica mayor a la observada en el rizoplano (Mavingui y col. 1992). En forma similar se observó que la población de *Pseudomonas* aislada del interior de la raíz de plantas de tomate es distinta a la encontrada en la rizósfera de esta planta

Sería muy interesante conocer la diversidad de las especies diazótrofas endófitas en plantas de importancia agronómica, como maíz, y conocer su capacidad para contribuir con el crecimiento de las plantas y con la producción de los cultivos. La distribución de los endófitos en la naturaleza es más amplia de lo que se pensaba, incluso, en años recientes. Por ejemplo, en las raíces de plantas de arroz se determinó, mediante el análisis comparativo de las secuencias de los genes que codifican para la enzima nitrogenasa, que existe una alta diversidad genética de diazótrofos endófitos, algunos de los cuales, aún no son cultivados (Ueda y col. 1995a,b).

ANTECEDENTES

El maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) es uno de los cultivos, entre los cereales, más importantes en el continente americano. Su domesticación, a partir del teocintle, data de aproximadamente 7000 años (White y Doebley 1998) y es tan avanzada que de cierta manera podría denominarse una "monstruosidad biológica" (Beadle 1980).

El maíz, a diferencia del teocintle, se encuentra envuelto en un sin número de hojas que impiden que las semillas sean dispersadas, este hecho conduciría a que el maíz pereciera en pocas generaciones si no es por la ayuda del hombre (Beadle 1980). El maíz y el teocintle son dos plantas extremadamente diferentes en cuanto a su arquitectura, sin embargo, este hecho muestra un ejemplo sorprendente y complejo de la evolución morfológica de las plantas.

El maíz es el recurso renovable más importante del mundo; cada año la mayor parte de los países que lo cultivan dedican a su producción 1.5 hectáreas de cada 4 cultivables (FIRA 1998). La producción mundial de maíz alcanzó, en el año agrícola 1996-1997, 600 millones de toneladas (FIRA 1998). En la República Mexicana el maíz ocupa una superficie que alcanza casi 8 millones de hectáreas. Su producción total es alrededor de 18 millones de toneladas (INEGI 1998) y actualmente se perfila como el más valioso de los granos por la gran diversidad de usos que se le puede dar en la alimentación humana, como forrajes en la alimentación del ganado y por la gran cantidad de productos que pueden obtenerse de este (FIRA 1998).

En las últimas tres décadas, a nivel mundial, la mitad de los incrementos logrados en los cultivos de cereales ha sido con base en la aplicación de fertilizantes nitrogenados debido a la escasez de este nutriente en los suelos agrícolas (Graham y col. 1988) y a la alta demanda requerida por estos cultivos. El desarrollo de la fijación biológica de nitrógeno en el maíz podría ser considerado, por un lado, de alto valor económico ya que el costo de la fertilización es muy elevado y por otro, de gran beneficio para el ser humano debido a los problemas de contaminación ambiental que causa el uso de éstos.

Diversas estrategias se han propuesto para extender la fijación biológica de nitrógeno nodular hacia los cereales (Dixon y col. 1993, Boddey y col. 1995, Christiansen 1998), sin embargo, para su aplicación se requiere de estudios a largo plazo. Una de las estrategias que presenta mejores posibilidades, al menos en corto plazo, es el uso de los diazótrofos asociados

en forma natural con las plantas (Triplett 1996).

Diferentes especies bacterianas se han aislado de la rizosfera del maíz (Boddey y Dobereiner 1988, Di Cello y col. 1997) así como de los tejidos internos de la planta (McInroy y Kloepper 1995a). Aparentemente la edad (McInroy y Kloepper 1995b) y la ubicación de los tejidos de plantas de maíz dulce (Fisher y col. 1992) son factores importantes que influyen en la colonización y persistencia de los endófitos. Se ha observado gran variación en el número de bacterias endófitas dependiendo de la parte de la planta analizada, 3.5×10^6 por gramo de tejido de la parte baja del tallo y de 2.0×10^2 bacterias en la parte superior de la planta (Fisher y col. 1992).

A pesar de conocer la existencia de bacterias endófitas asociadas con el maíz, el estudio de los diazótrofos en esta planta es poco. Recientemente se logró el aislamiento y la identificación presuntiva de *Klebsiella* sp. de los tejidos internos de plantas de maíz dulce (Palus y col. 1996), siendo en la actualidad éste, el único trabajo enfocado hacia el aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas del maíz.

Tomando en cuenta que el estudio de los diazótrofos endófitos del maíz es un área poco explorada, sería muy importante y de gran valor desarrollar trabajos dirigidos hacia la búsqueda y evaluación de este grupo microbiano con la finalidad de ampliar los conocimientos sobre la biodiversidad de los diazótrofos asociados y avanzar hacia la sustitución, al menos parcial, de los fertilizantes nitrogenados.

OBJETIVO GENERAL

Aislamiento e identificación de bacterias diazótrofes endófitas de maíz y determinación de su posible contribución con el crecimiento de la planta.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la existencia de bacterias diazótrofes endófitas en variedades de maíz criollas de alta producción y en su caso, llevar a cabo la caracterización fenotípica y genética de algunas de las especies bacterianas predominantes.

Evaluar bajo condiciones de invernadero, el efecto de la inoculación de algunas bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento de plantas de maíz.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de maíz, suelo y localización.

En la comunidad indígena Mixe de Totontepec estado de Oaxaca se colectó, para el aislamiento de los diazótrofos endófitos, el suelo adherido a las raíces de maíz y semillas de maíces criollos, "rojo" y "piedra blanca". La producción de estas variedades en esa zona fluctúa entre 2-3 toneladas/ha, cultivándose sin la aplicación de fertilizantes y abonos (Hallberg, com. pers.). La variedad de maíz criollo "arrocillo" cultivado en el estado de Puebla y el híbrido B-555 que se cultiva en el estado de Morelos, fueron usados en los ensayos de invernadero para evaluar el efecto de la inoculación de los endófitos sobre el crecimiento de la planta.

Esterilización superficial y germinación de las semillas de maíz.

Las semillas de maíz fueron esterilizadas superficialmente utilizando Tween 20 al 1 % durante 10 minutos y cloro comercial diluído al 1.2 % por 6 minutos. Al finalizar cada tratamiento se realizaron abundantes lavados con agua destilada estéril (ADE) para eliminar la presencia del cloro. Las semillas se colocaron en placas con el medio de cultivo LB (Ausubel y Frederick 1987)¹ y fueron incubadas a 29⁰ C hasta su germinación, generalmente por 4 días, para comprobar la esterilización superficial de la semilla.

Determinación de la actividad nitrogenasa (ARA) en semillas de maíz.

Las semillas de las variedades de maíz "rojo" y "piedra blanca", superficialmente estériles, se colocaron en viales que contenían los medios de cultivo LGI modificado (Cavalcante y Dobereiner 1988), NFb (Dobereiner 1980) y Medio A, se taparon con algodón en condiciones de esterilidad y se incubaron a 29⁰ C hasta su germinación. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la actividad nitrogenasa.

1. La composición de los medios de cultivo, soluciones y fórmulas se dan en el Anexo.

Determinación de la actividad nitrogenasa (ARA) en plantas de maíz.

Las semillas superficialmente estériles y germinadas de maíz "rojo" fueron sembradas en matraces de 1 litro con vermiculita estéril, humedecidas con 100 ml de ADE y 100 ml de una solución nutritiva estéril carente de nitrógeno combinado. Los matraces fueron tapados con algodón en condiciones de esterilidad y mantenidos en el invernadero bajo condiciones de temperatura controlada (28-30^o C) y períodos de iluminación de 16 horas. Transcurridos 15 días de incubación se determinó la actividad nitrogenasa (ARA).³

Aislamiento de endófitos.

Para el aislamiento de los endófitos se siguieron 5 diferentes estrategias:

- 1) Bacterias presentes tanto en el interior como en la superficie de la semilla de maíz (Tratamiento-1). Se usaron semillas sin esterilizar, las cuales se sembraron directamente en vermiculita estéril.
- 2) Bacterias con potencial endofítico presentes en la semilla y en suelo rizosférico (Tratamiento-2). Se utilizaron semillas sin esterilizar, las cuales se sembraron en vermiculita estéril e inoculadas con suelo (5 g resuspendidos en 10 ml de ADE).
- 3) Bacterias presentes en el interior de la semilla (Tratamiento-3). Fueron usadas semillas esterilizadas superficialmente y germinadas, las cuales se sembraron en vermiculita estéril.
- 4) Bacterias con potencial de colonizar el interior de las plantas de maíz presentes en suelo rizosférico (T-4). Fueron utilizadas semillas esterilizadas superficialmente, germinadas y sembradas en vermiculita estéril e inoculadas con suelo (5 g resuspendidos en ADE).
- 5) Bacterias presentes en el interior de la semilla (T-5). Fueron utilizadas semillas esterilizadas superficialmente, germinadas y maceradas.

Las semillas germinadas de los maíces "rojo" y "piedra blanca", de los distintos tratamientos, fueron sembradas en matraces de 250 ml con vermiculita estéril, humedecidos con 80-100 ml de ADE y tapados con papel aluminio en condiciones de esterilidad. Las plantas se incubaron en una cámara de crecimiento a 29^o C y con un fotoperíodo de 16 horas. Transcurridos 15 días después de la emergencia, las plántulas fueron colectadas y divididas en raíz y parte aérea. Ambas partes fueron esterilizadas superficialmente por inmersión en cloramina T al 1 % durante 10 minutos y lavadas abundantemente con ADE. Tanto las semillas

del tratamiento 5 (T-5), así como las partes de las plantas provenientes de los distintos tratamientos fueron maceradas en condiciones de esterilidad con una solución de 10 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Alícuotas de 100 μ l de las diluciones decimales de los distintos macerados fueron inoculadas por triplicado en viales con medios de cultivo semigelificado y carente de nitrógeno. Previamente los viales con el medio de cultivo fueron adicionados de cicloheximida a una concentración final en el medio de cultivo de 100 mg/ml. Se utilizaron los medios de cultivo LGI modificado, NFb y Medio A. Los viales fueron incubados durante 5 días a 29^o C. Transcurrido el tiempo de incubación fueron hechos ensayos para evaluar la actividad nitrogenasa mediante la detección de actividad reductora de acetileno (ARA). Cultivos de los viales que presentaron ARA fueron sembrados en placas que contenían el medio de cultivo respectivo, el cual fue complementado con una fuente nitrogenada. Las bacterias de los viales con medio de cultivo NFb fueron sembradas también en placas con el medio rojo Congo (Rodríguez-Cáceres 1982). A partir de cada medio de cultivo fueron seleccionados los aislados con morfología colonial diferente y éstos fueron tratados para obtener cultivos puros. Los cultivos puros fueron conservados en glicerol al 20 % a -80^o C hasta su uso.

Determinación de la actividad nitrogenasa mediante la actividad reductora de acetileno, ARA.

El ensayo se realizó con: a) Las semillas de maíz esterilizadas superficialmente y pregerminadas. b) Los macerados de las semillas de maíz esterilizadas superficialmente y pregerminadas. c) Las plantas de maíz cultivadas en condiciones de esterilidad. d) Los macerados de plantas esterilizadas superficialmente. e) Los cultivos bacterianos puros.

En todos los casos se utilizaron los diferentes medios de cultivo descritos anteriormente, excepto en las determinaciones de plantas completas las cuales fueron sembradas en vermiculita. Después del período de incubación los tapones de algodón de los viales y matraces fueron sustituidos por tapones de hule (Suba Seal). Se extrajo el 10 % del volumen de aire y se inyectó acetileno en cantidad igual. Los viales y matraces fueron incubados a 29^o C por 12 horas determinándose la producción de etileno mediante cromatografía de gases, utilizando un cromatógrafo Varian 3300 conectado a un integrador Varian 4290.

Electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE).

Cada aislado bacteriano, procedente del maíz "rojo" y de los ensayos de inoculación, fue inoculado en 30 ml del medio de cultivo apropiado y se incubaron a 29^o C, durante 24 horas en agitación orbital constante (200 rpm). El paquete celular fue obtenido mediante centrifugación y se resuspendió en 0.3 ml de MgSO₄·7H₂O 10 mM conteniendo 0.3 mg de lisozima. Fueron colocados a -80^o C por 15 minutos y descongelados, el proceso fue repetido y los extractos enzimáticos se guardaron a -80^o C. El procedimiento usado para la electroforesis de los geles y tinción de las enzimas se realizó de acuerdo con lo descrito por Selander y col. (1986). Las enzimas metabólicas utilizadas fueron glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P), isocitrato deshidrogenasa (IDH), xantino deshidrogenasa (XDH), malato deshidrogenasa (MDH), enzima málica (EM), alcohol deshidrogenasa (ADH), glutamato deshidrogenasa (GD2), lisina deshidrogenasa (LYS), leucina deshidrogenasa (LEU), alanina deshidrogenasa (ALD) y aspartato deshidrogenasa (ASD).

Pruebas fenotípicas.

Las cepas aisladas de los maíces "rojo" y "piedra blanca" fueron caracterizadas mediante taxonomía clásica. Los ensayos utilizados fueron tinción de gram, reacción de la catalasa, rojo metilo, Voges Proskauer, licuefacción de la gelatina, producción de indol, utilización de citrato y de lactosa, descarboxilación de la ornitina y la lisina, utilización de glucosa y sacarosa, movilidad y actividad de la enzima ureasa. Para complementar la caracterización fenotípica de algunos de los aislados de maíz se utilizó el sistema de identificación API 20E. BioMerieux, siguiendo las instrucciones marcadas por el fabricante. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa APILAB Plus el cual indica la especie más cercana con la cual se relaciona la cepa bacteriana analizada.

Determinación de ácido indol acético (AIA).

Los aislados bacterianos No. 3, No. 12ch, No. 16 y No. 24 fueron cultivados en caldo nutritivo durante 24 horas a 30^o C en agitación orbital constante (200 rpm). Al término de la incubación los cultivos fueron centrifugados dos veces y resuspendidos cada ocasión con ADE. El pre-inóculo bacteriano fue ajustado a 50 unidades Klett (2×10^{-5} UFC ml⁻¹) y 1 ml fue adicionado a matraces de 125 ml con 49 ml de medio de cultivo a base de sales minerales, ácido succínico, fructosa y triptofano (Devender y Patriquin 1984). Los cultivos bacterianos fueron incubados a 30^o C durante 72 horas en agitación orbital constante. Concluida ésta etapa los cultivos fueron centrifugados a 10,800 g durante 15 min. a -4^o C. Los sobrenadantes obtenidos fueron ajustados a pH 2.5 con HCl y los compuestos indólicos fueron extraídos tres veces con 20 ml de acetato de etilo (Crozier y col. 1988). Los extractos fueron evaporados al vacío con un rotavapor a 37^o C y resuspendidos en 1 ml de metanol. Se determinó la concentración de indoles totales mediante la reacción de Salkowsky (Tang y Bonner 1947). Con alícuotas de 20 µl de cada extracto se realizó cromatografía en capa fina utilizando cromatofolios con silica-gel (HF₂₅₄, Merck). La cromatografía fue desarrollada utilizando como fase móvil el sistema de solventes benceno-acetato de etilo-ácido acético (70:25:5). Los estándares de indoles fueron los siguientes: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (IBA), ácido indol-3-láctico (ILA), ácido indol-3-propiónico (IPA), ácido indol-3-pirúvico (IPyA), indol-3-acetaldehído (IAld). Los compuestos fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV 254 nm). El AIA fue cuantificado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con una columna C-18 y fase móvil en gradiente, metanol-acetonitrilo, 80:20 v/v y ácido acético 0.5 % (Falik y Okon 1989), empleando un cromatógrafo L-4250 UV-Vis Detector, L6200A Intelligent pump, D2500A Cromato-Integrator, Merck Hitachi. Los tiempos de retención de los picos obtenidos fueron comparados con el estándar de AIA.

Detección de genes *nifHDK*.

El ADN total de los aislados bacterianos se extrajo como ha sido descrito previamente (Ausubel y col. 1987). El ADN purificado fue digerido con la enzima endonucleasa *EcoRI* y sometido a electroforesis en un gel vertical con agarosa al 1 % utilizando buffer tris-acetatos a 40 voltios por 13-14 horas. Se tiñó con bromuro de etidio y fue fotografiado bajo iluminación de UV. Los gels fueron tratados con una solución de depurinización durante 15 min., repitiendo el procedimiento y posteriormente con una solución de desnaturalización por 45 min. El ADN se transfirió a membranas de nylon mediante el procedimiento de Southern (Southern 1975). Las membranas fueron lavadas con una solución 2X SSC dejándose secar. El ADN fue fijado a la membrana con el uso de luz UV (onda larga) por 5 min. Las membranas se colocaron en tubos hybrid con una solución de prehibridación (Rapidhy Buffer de Amersham no. RPN1635) durante 24 horas a 60⁰ C. La sonda utilizada para la hibridación fueron los genes *nifHDK* de *Rhizobium etli* (Morett y col. 1988). El fragmento fue marcado con ³²P utilizando rediprime DNA (Amersham no. RPN1633) y se adicionó a los tubos con las membranas, hibridando por 12 horas a 60⁰ C. Las membranas fueron lavadas con una solución 2X SSC + 0.1 % SDS a 55⁰ C, 10 min., dos veces; 1X SSC + 0.1 % SDS a temperatura ambiente, 10 min., dos veces; 0.1X SSC + 0.1 % SDS a temperatura ambiente, 10 min. y finalmente 0.1X SSC por 1-2 horas. Las membranas se secaron a 65⁰ C por 10 min. y fueron expuestas a auto-radiografía.

Amplificación del gen ribosomal 16S.

El ADN total de las cepas se extrajo como ha sido descrito previamente (Ausubel y col. 1987). La amplificación del gen ribosomal 16S, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue realizada utilizando 0.5 μ l del DNA total (50 ng/ μ l), 12 μ l de 10X Taq Buffer, 3.6 μ l de 50 mM MgCl₂, 1.2 μ l de 10 mM de los primeros rD1 y rD1 (Weisburg y col. 1991), 1 μ l de 10 mM dNTP's y 0.5 Unidades de la enzima *Taq* polimerasa (Boheringer) en un volumen final de 100 μ l. Cada mezcla de PCR se cubrió con 2-3 gotas de aceite mineral y se incubó en un termociclador (Perkin-Elmer, modelo 480). Las condiciones de temperatura para la reacción de PCR fueron las siguientes: 94^o C, 3 min por un ciclo; 94^o C, 1 min; 57^o C, 1 min; 72^o C, 2 min por 35 ciclos. 72^o C, 5 min por un ciclo. Posteriormente los productos de PCR fueron enfriadas a 4^o C y guardadas a -20^o C hasta su uso.

Secuencia del gen ribosomal 16S.

Secuencia parcial: El ADN del gen 16S ribosomal amplificado fue digerido con la enzima de restricción *Sau3AI*, obteniéndose fragmentos de distintos tamaños menores a 500 pares de bases (pb). La mezcla del ADN digerido fue utilizada para la clonación al azar de los distintos fragmentos en el vehículo pUC19 (Messing 1983). El vehículo fue digerido con la enzima de restricción *BamHI*, la cual es compatible con la enzima *Sau3AI*. Las clonas con los distintos fragmentos de ADN fueron secuenciados utilizando el kit Auto read 1000 Sequencing (Pharmacia Biotech) el cual consta de los iniciadores Universal y Reverso para la secuencia de ambas cadenas de ADN. La secuencia fue determinada utilizando un secuenciador automático, ALF Sequencer (Pharmacia Biotech), perteneciente al CIFN.

Secuencia completa: De la cepa No. 16, identificada previamente como perteneciente al género *Burkholderia* mediante el sistema API 20E, se amplificó el gen ribosomal, 1.5 Kilobases (Kb), y fue clonado en el vehículo pCRII (TA cloning kit, Invitrogen). Teniendo como base esta clona, el gen ribosomal fue subclonado en fragmentos más pequeños (150-750 pb) en el vehículo pUC19, los cuales fueron secuenciados como se describió anteriormente. La clonación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando sitios de restricción conservados

entre especies del género *Burkholderia* y compatibles con el DNA del vehículo. Los sitios de restricción conservados fueron determinados mediante un alineamiento de las secuencias del gen ribosomal 16S de distintas especies de *Burkholderia* utilizando el programa GCG. Los fragmentos mayores a 500 pb fueron a su vez subclonados en fragmentos de menor tamaño con el fin de facilitar la secuenciación de los mismos en el modelo de secuenciador utilizado.

Análisis de las secuencias.

Las secuencias del ADN fueron comparadas con las ya existentes en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) utilizando el programa BLAST-N. Las secuencias de ADN fueron analizadas mediante los programas Pileup y Distances (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group), ClustalW y mostrando el árbol filogenético con el programa TreeView.

Análisis de los patrones de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA).

El gen ribosomal 16S de los aislados bacterianos fue amplificado como se describió anteriormente y fue digerido con las enzimas de restricción *HhaI*, *AluI*, *MspI* y *DdeI*. El DNA digerido fue sometido a electroforesis en un gel horizontal al 3 % de agarosa. Tomando en cuenta todos los patrones de restricción que resultaron con cada una de las enzimas se generó una matriz de datos para cada uno de los aislados de acuerdo a la presencia o ausencia de las bandas comparando entre todos los aislados bacterianos. Se asignaron los números 1, para la banda presente, y 0, para la banda ausente. Con base en los resultados obtenidos de la matriz de datos se construyó un árbol de similaridad utilizando el método de Nei y Li (1979).

Ensayo de colonización endófito.

Las 13 cepas aisladas de plantas de maíz "rojo" que mostraron ARA o señal de hibridación con los genes estructurales de la nitrogenasa se seleccionaron para llevar a cabo la inoculación de las variedades de maíz "rojo" y maíz B-555. Los cultivos de las cepas seleccionadas se propagaron separadamente en 200 ml del medio de cultivo usado para el primo-aislamiento y se incubaron con agitación orbital constante (200 rpm) durante 16 horas a 29^o C. Los paquetes celulares se obtuvieron mediante centrifugación y posteriormente se lavaron con 200 ml de una solución de 10 mM MgSO₄·7H₂O. Nuevamente se centrifugaron y el paquete celular se resuspendió en ADE. Las semillas esterilizadas superficialmente y germinados previamente se sumergieron en la suspensión bacteriana (aproximadamente 1x10⁸ CFU) durante 10 min, se sembraron en matraces de 250 ml conteniendo vermiculita estéril y una solución nutritiva estéril para plantas, pero sin nitrógeno. Los matraces, dos por tratamiento, se incubaron en la oscuridad a 29^o C hasta la emergencia de las plántulas. Estas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación antes señaladas. Transcurridos 15 días, las plantas se dividieron en raíz y parte aérea, se esterilizaron superficialmente con cloramina T al 1 % por 15 min y se maceraron. Los viales con el medio de cultivo (carente de nitrógeno combinado), apropiado para la cepa inoculada, se inocularon por triplicado con alícuotas de 100 µl de las diluciones decimales del macerado. Los viales se incubaron a 29^o C por el tiempo necesario hasta la formación de una película de crecimiento en el medio de cultivo. De los viales que presentaron crecimiento bacteriano se tomaron muestras que se sembraron en placas con el medio de cultivo respectivo, adicionados de una fuente nitrogenada. Las colonias aisladas que presentaron morfología semejante a la cepa inoculada se consideraron en la determinación del número más probable (NMP). Para confirmar la presencia de la cepa inoculada se seleccionaron entre 5 y 6 de las colonias, recobradas de las diluciones más altas, para analizarlas mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) y determinar el perfil de movilidad electroforético de las enzimas.

Efecto de la inoculación de diazótrofos endófitos sobre el crecimiento de plantas de maíz.

Para este estudio se seleccionaron las cepas bacterianas No. 12ch, No. 16, No. 24, debido a que fueron algunas de las cepas encontradas en mayor número en el ensayo de colonización endófito. Las semillas de maíz de las variedades B-555 y "arrocillo" se esterilizaron, germinaron e inocularon con las diferentes cepas como se describió anteriormente. Después se determinó el número de células bacterianas adheridas a la superficie de la semilla pregerminada. Estas fueron sembradas en vermiculita estéril contenida en macetas (dos granos por maceta) y humedecidas con una solución nutritiva para plantas. Se utilizaron tres dosis de nitrógeno, 5 mg para las plantas testigo y 50 y 100 mg por maceta para los dos tratamientos restantes. El nitrógeno fue usado en forma de NH_4NO_3 , aplicándose la cantidad total en dos partes; la primera mitad de cada dosis se adicionó a los 5 días de la emergencia de las plantas y la otra mitad a los 20 días. Las macetas, conteniendo las semillas de maíz, se mantuvieron en el invernadero bajo condiciones de temperatura controlada ($28\text{-}30^\circ\text{C}$) y períodos de iluminación de 16 horas. Transcurridos 33 días se determinó la presencia de la bacteria en el interior de la planta seleccionando al azar cuatro plantas de distintas macetas por cada tratamiento. El tallo de cada una de las plantas se esterilizó superficialmente con cloramina T al 1 % durante 15 min, lavado abundantemente con ADE al final del tratamiento. En condiciones de esterilidad se tomó una pequeña porción (50 a 100 mg) de la base del tallo estéril de cada una de las plantas. La muestra del tallo se maceró con una solución 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y una alícuota de 100 μl de cada una de las diluciones decimales se inocularon en viales con el medio de cultivo apropiado para el crecimiento de la cepa inoculada. Los viales se incubaron por 5-7 días a 29°C . Posteriormente, de los viales que mostraron crecimiento algunas muestras se sembraron en placas con el medio de cultivo apropiado y las colonias con morfología semejante a la cepa inoculada se consideraron en la determinación del NMP. Se comprobó que las cepas seleccionadas correspondieran a la cepa inoculada mediante el análisis de MLEE. Las plantas se seccionaron en raíz y parte aérea y se colocaron en un horno a 65°C hasta peso constante. La parte aérea de las plantas se usó para determinar el contenido de nitrógeno.

Determinación de nitrógeno total.

La parte aérea de las plantas fue molida y 100 mg de cada una de ellas se utilizó para llevar a cabo la determinación del contenido de nitrógeno total mediante el método semimicro-Kjeldahl (Bremmer 1965).

RESULTADOS

Germinación y actividad nitrogenasa (ARA).

Se utilizaron 9 semillas germinadas de los maíces "rojo" y "piedra blanca", previamente esterilizadas superficialmente (tratamiento T-5), para llevar a cabo la determinación de ARA. En ninguna de las semillas analizadas de ambas variedades de maíz se registró ARA, así como tampoco en los cultivos de los macerados de las mismas.

Plantas de maíz y actividad nitrogenasa (ARA).

La actividad nitrogenasa se determinó a 4 plantas de maíz "rojo" con 15 días de desarrollo. Con el tipo de metodología empleado en el experimento ninguna de las cuatro plantas de maíz registró ARA.

Detección y número de bacterias diazótrofes en plantas de maíz.

En la variedad "piedra blanca" se detectó ARA solamente en los cultivos de los macerados de raíz y parte aérea de las plantas con 15 días de crecimiento procedentes del tratamiento T-4. En la variedad "rojo" la ARA se detectó en los tratamientos T-2, T-3 y T-4 (Tabla 1).

En el maíz "rojo" con 15 días de crecimiento el número mayor de diazótrofes se encontró en la parte aérea de las plantas que provenían de granos que fueron inoculados con suelo (T-2 y T-4) y el número menor se encontró en la raíz de las plantas del tratamiento T-2, así como en la parte aérea de las plantas del tratamiento T-3 (Tabla 1).

Las plantas de los tratamientos T-3 y T-4 con 15 días de crecimiento a las que se les aplicó nitrógeno mineral (32.25 mg por planta de maíz "rojo" y 25 mg por planta de maíz "piedra blanca") fueron sujetas a ensayos de ARA. En los macerados de la raíz y la parte aérea de plantas de maíz "rojo" no se detectó ARA, mientras que en el maíz "piedra blanca" los macerados de las plantas del tratamiento T-4 mostraron ARA.

En las plantas de maíz "rojo" y "piedra blanca" con 30 días de crecimiento se detectó ARA en los cultivos de los macerados de la parte aérea del tratamiento T-4. Además, en el maíz "piedra blanca" se detectó ARA en el cultivo del macerado de las raíces de las plantas.

Tabla 1. Actividad reductora de acetileno (ARA) y NMP de diazótrofos endófitos en plantas de maíz "rojo" con 15 días de crecimiento.

Tratamiento ^a	Raíz ^b		Parte aérea ^b	
	ARA	NMP	ARA	NMP
1	ND	ND	ND	ND
2	+	1.8x10 ⁴	+	8.5x10 ⁵
3	+	1.3x10 ⁴	+	5.0x10 ³
4	+	9.0x10 ⁴	+	9.0x10 ⁵

^a T-1, plantas procedentes de granos sin esterilizar superficialmente. T-2, plantas procedentes de granos sin esterilizar superficialmente, inoculadas con suelo. T-3, plantas procedentes de granos esterilizados superficialmente. T-4, plantas procedentes de granos esterilizados superficialmente e inoculados con suelo.

^b Macerados de raíz y parte aérea, esterilizadas superficialmente.

NMP, número más probable de bacterias fijadoras de nitrógeno por gramo de tejido vegetal fresco.

ND, no detectado.

Aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno.

Maíz “rojo”: el aislamiento de los diazótrofos endófitos a partir de esta variedad de maíz se realizó de los viales inoculados con las diluciones más altas de los macerados de las plantas que mostraron ARA. Un total de 23 cepas con morfología colonial distinta, designados con los números 1 a 24, fueron aisladas de plantas con 15 días de crecimiento de los tratamientos T-2, T-3 y T-4; del total de estos aislados, 12 mostraron ARA en medio de cultivo (Tabla 2). Los aislados encontrados en mayor número en la parte aérea de las plantas de maíz fueron el No. 3, No. 4 y No. 16, mientras que en la raíz fueron los aislados No. 19 y No. 3. También se observó que la mayoría de las cepas diazótroficas se encuentran presentes en los tejidos internos de las plantas cuyos granos fueron esterilizados superficialmente e inoculados con suelo (T-4).

Todas las cepas bacterianas aisladas del interior de plantas de maíz “rojo” con 15 días de crecimiento se analizaron mediante ensayos de hibridación con los genes estructurales de la nitrogenasa. Mediante esta metodología se demostró la presencia de los genes *nifHDK* en la mayoría de los aislados que exhibieron ARA (Tabla 2), excepto en la cepa No. 18 la cual no dió señal de hibridación con estos genes. Aún cuando la cepa No. 14 mostró señal de hibridación con los genes *nifHDK*, no fue capaz de reducir el acetileno a etileno en las condiciones de cultivo utilizadas en el laboratorio. Los patrones de restricción de los genes *nifHDK* revelados por autoradiografía (Figura 1) mostraron que las cepas No. 12ch, No. 12g, No. 14 y No. 24 poseen el mismo patrón. Las cepas No. 4 y No. 16 compartieron también un mismo patrón de restricción de los genes *nifHDK*. El resto de las cepas bacterianas mostraron un perfil de restricción diferente.

A partir de la parte aérea de plantas de maíz “rojo”, con 30 días de crecimiento y cuyos granos fueron esterilizados superficialmente e inoculados con suelo (T-4), se logró el aislamiento de 5 cepas con morfología colonial distinta, entre las cuales solamente una mostró ARA.

Tabla 2. Diazótrofos aislados del interior de plantas de maíz "rojo" con 15 días de crecimiento.

Aislado tipo ^a	ARA	<i>nifHDK</i> ^b	T-2 ^c	T-3 ^c	T-4 ^c
Cepa 2	+	+	R ND A 4.0x10 ⁴	R 7.5x10 ³ A ND	R ND A 5.0x10 ³
Cepa 3	+	+	R 1.8x10 ³ A 8.1x10 ⁴	R 7.5x10 ³ A 5.0x10 ³	R 9.0x10 ⁴ A 5.0x10 ⁵
Cepa 4	+	+	R 1.8x10 ³ A 4.0x10 ⁵	R 7.5x10 ³ A 5.0x10 ²	R 5.0x10 ² A ND
Cepa 9	+	+	R 8.1x10 ² A 4.0x10 ⁴	R ND A ND	R ND A 5.0x10 ⁴
Cepa 12ch	+	+	R 8.1x10 ² A 4.0x10 ⁴	R 7.5x10 ³ A 9.0x10 ²	R 5.0x10 ³ A 7.5x10 ³
Cepa 12g	+	+	R 8.1x10 ² A 4.0x10 ⁴	R 7.5x10 ³ A 9.0x10 ²	R 5.0x10 ³ A 7.5x10 ³
Cepa 14		+	R ND A 4.0x10 ⁴	R ND A ND	R 5.0x10 ² A 5.0x10 ²
Cepa 15	+	+	R 8.1x10 ² A ND	R ND A ND	R 9.0x10 ³ A ND
Cepa 16	+	+	R 1.8x10 ² A 2.2x10 ⁵	R ND A 9.0x10 ²	R 9.0x10 ³ A 5.0x10 ⁴
Cepa 18	+	-	R ND A ND	R ND A ND	R 9.0x10 ³ A ND
Cepa 19	+	+	R ND A ND	R 7.5x10 ³ A 5.0x10 ³	R 1.9x10 ⁴ A 5.0x10 ²
Cepa 23	+	+	R ND A ND	R ND A 5.0x10 ²	R 5.0x10 ³ A ND
Cepa 24	+	+	R ND A ND	R ND A 5.0x10 ³	R 5.0x10 ² A 5.0x10 ³

^a La agrupación de los aislados en cada uno de los tipos se realizó mediante morfología colonial. ^b Detección de los genes *nifHDK*. ^c Número más probable de bacterias encontrado por gramo de tejido vegetal en los distintos tratamientos. Los tratamientos son como se define en la Tabla 1. ARA, actividad reductora de acetileno. ND, no detectado. R, raíz. A, parte aérea de la planta.



Figura 1. Autoradiografía de "Southern blot" de ADN digerido con la enzima *EcoRI* e hibridado con una sonda que contiene los genes *nifHDK* de *Rhizobium etli*.

Carril 1-12, cepas aisladas del interior de maíz "rojo": Carril 1, cepa No. 2. Carril 2, cepa No. 3. Carril 3, cepa No. 4. Carril 4, cepa No. 15. Carril 5, cepa No. 16. Carril 6, cepa No. 18. Carril 7, cepa No. 23. Carril 8, cepa No. 24. Carril 9, cepa No. 12ch. Carril 10, cepa No. 12g. Carril 11, cepa No. 14. Carril 12, cepa No. 19.

Maíz "piedra blanca": puesto que no se registró ARA en la mayoría de los viales inoculados con los macerados de las plantas y de los granos de maíz, el aislamiento de los diazótrofos endófitos se llevó a cabo a partir de la dilución más baja (10^{-1}). Debido a esto no se determinó el NMP de las distintas cepas. En la Tabla 3 se indica el tratamiento, el órgano y la edad de la planta a partir del cual fueron aisladas las cepas diazótrofes.

La mayoría de los aislados diazótrofes provienen de plantas de maíz con 15 días de crecimiento y del tratamiento donde las plantas se inocularon con suelo (T-4). De los granos de maíz no se obtuvieron cepas fijadoras de nitrógeno.

Tabla 3. Diazótrofos aislados del interior de plantas de maíz "piedra blanca" con 15 días de crecimiento.

Cepa No.	Tratamiento*	Organo de la planta	Edad de la planta
231	2	Parte aérea	15 días
235	3	Parte aérea	15 días
240	4	Raíz	15 días
242	4	Parte aérea	15 días
243	4	Raíz	15 días
249	4	Raíz	15 días
250	4	Raíz	15 días
260	4	Raíz	30 días
262	4	Parte aérea	30 días
263	4	Raíz	30 días
273	4	Raíz	30 días
284	3**	Parte aérea	15 días
293	4**	Parte aérea	15 días
308	4**	Raíz	15 días
312	4**	Parte aérea	15 días

* Los tratamientos son como se define en la tabla 1.

** A las plantas se le adicionó 25 mg de nitrógeno (NH_3PO_4).

Electroforesis de enzimas metabólicas (MLEE).

Un total de 21 cepas aisladas de plantas de maíz "rojo" con 15 días de crecimiento fueron analizadas mediante electroforesis de enzimas metabólicas con la finalidad de agrupar aquellos aislados que presentaran características similares. La relación genética entre los aislados bacterianos se muestra en el dendrograma de la Figura 2. Cada una de las cepas bacterianas analizadas representó un tipo electroforético. Algunos de las cepas formaron grupos bien definidos con distancias genéticas menores o cercanas a 0.5, como se logra observar en las 5 divisiones presentadas en la Figura 2. La mayoría de los aislados fijadores de nitrógeno se encontraron agrupados en alguna de las 5 divisiones, excepto las cepas No. 14 y No. 3. En las divisiones I y IV los diazótrofos se encuentran relacionados con cepas que no expresan ARA en las condiciones ensayadas y con las cuales tampoco se logró detectar la presencia de los genes *nifHDK*.

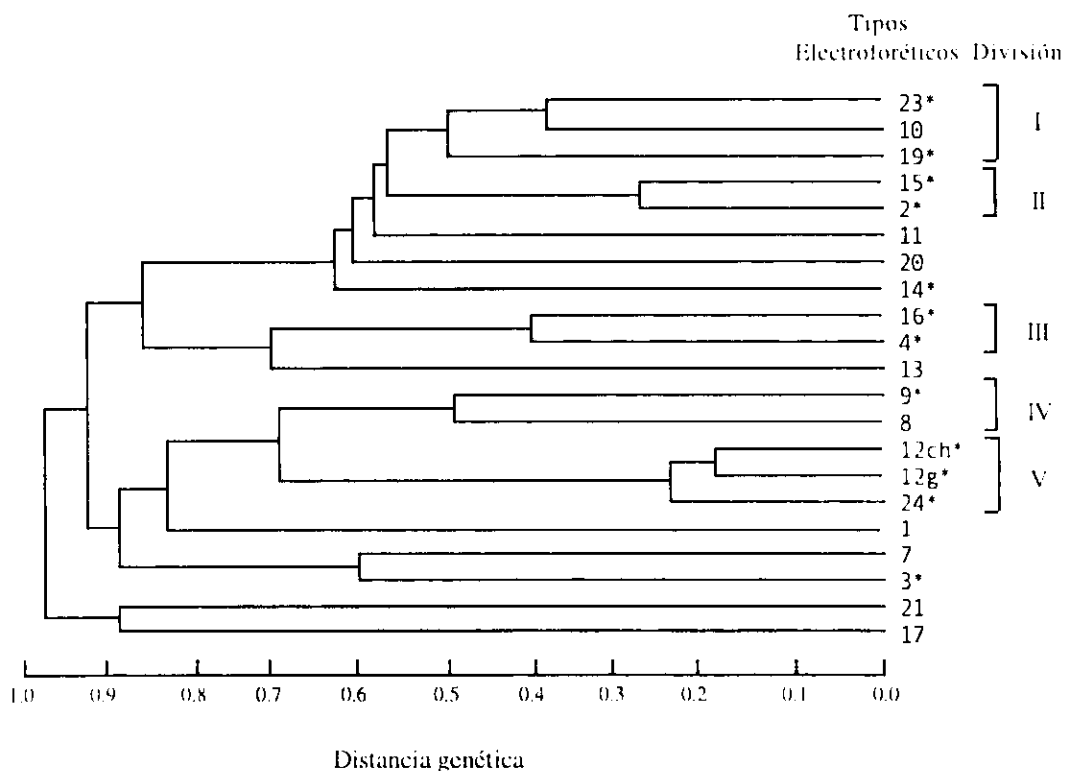


Figura 2. Relación genética de las cepas bacterianas aisladas del interior de plantas de maíz "rojo".

* Aislados diazótrofos.

Análisis fenotípico.

Mediante el uso de diagramas de ramificación (Mac Fadin 1990) y con base en los resultados obtenidos de las pruebas fenotípicas de los aislados diazótrofos de maíz "rojo" (Tabla 4) las cepas No. 12ch, No. 12g y No. 24 quedaron tentativamente ubicadas dentro del género *Enterobacter*, mientras que el aislado No. 3 se identificó como perteneciente al género *Klebsiella*.

Además de los ensayos bioquímicos utilizados, el aislado No. 15 fue analizado mediante distintas pruebas para confirmar su ubicación dentro del género *Azospirillum*. Algunas de éstas fueron crecimiento en el medio de cultivo rojo Congo, utilización de sales orgánicas como malato, succinato y piruvato y observación de la morfología celular mediante microscopía óptica para la determinación de la forma celular vibroide de la bacteria y la presencia de gránulos de polibetahidroxibutirato. Mediante el análisis de patrones de restricción del gen ribosomal 16S con la enzima *AluI*, la cual se ha reportado como una enzima útil en la diferenciación de especies del género *Azospirillum* (Grifoni y col. 1995, Han y New 1997), se confirmó que la cepa No. 15 pertenece a la especie *A. lipoferum* (datos no mostrados).

De acuerdo al análisis de los resultados de las distintas pruebas bioquímicas de la Tabla 4, los aislados No. 4 y No. 16 se identificaron tentativamente como cepas del género *Burkholderia*. La confirmación de estas cepas dentro del género *Burkholderia* fue llevada a cabo mediante el uso de las galerías API 20E (datos no mostrados). Así mismo, la ubicación de las cepas No. 12ch y No. 24 dentro de la especie *Enterobacter cloacae* fue confirmada con el uso de esta metodología.

Tabla 4. Características fenotípicas de los diazótrofos aislados de maíz rojo.

Prueba bioquímica	Cepas																	
	2	3	4	9	12ch	12g	14	15	16	18	19	23	24	Bc. ^a	Bv. ^b	Kp. ^c	Kpl. ^d	Azh. ^e
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	nd	nd	+	+	nd
Rojo metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación de:																		
Glucosa	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-
Sacarosa-Lactosa	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Citrato	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Descarboxilación:																		
Ornitina	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Movilidad	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	nd
Ureasa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Gelatinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

^a *Burkholderia cepacia* ATCC 29352

^b *Burkholderia vietnamiensis* LMG 11347

^c *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

^d *Klebsiella planticola* ATCC 33531

^e *Azospirillum brasilense* Cd ATCC 29710

+, reacción positiva. -, reacción negativa. nd, no determinado

Considerando que algunas cepas aisladas de plantas de maíz “rojo” fueron identificadas como pertenecientes al género *Burkholderia*, pero con características fenotípicas diferentes de la única especie fijadora de nitrógeno incluida en este género y reportada hasta la fecha (*Burkholderia vietnamiensis*), se dirigió la investigación hacia la búsqueda de cepas bacterianas diazotróficas con características similares a las de este género bacteriano. Para llevar a cabo este propósito las cepas diazótroficas aisladas de maíz “piedra blanca” se cultivaron en el medio PCAT con pH 5.7, el cual se reporta (Burbage y col. 1982) como selectivo para especies del género *Burkholderia*. Con la finalidad de buscar diferencias fenotípicas entre los aislados, el medio PCAT fue adicionado con azul de bromotimol. Del total de los 15 aislados se observó el crecimiento de 6 cepas, las cuales mostraron un crecimiento abundante y viraron el color del medio de cultivo de amarillo a un azul intenso. El resto de las cepas crecieron pobremente en el medio de cultivo y no viraron el color del indicador. Los aislados diazótroficos se analizaron mediante distintas pruebas bioquímicas entre las cuales la prueba de tinción de Gram, rojo metilo, indol y producción de H₂S resultaron negativas para todos los aislados, mientras que la prueba de catalasa resultó positiva. El resultado del resto de las pruebas bioquímicas se muestra en la Tabla 5.

En un análisis fenotípico mediante galerías API 20E se seleccionaron algunos de los aislados que expresan ARA, entre ellos las cepas No. 240, No. 262, No. 273 y No. 293 aisladas del maíz “piedra blanca”. Los resultados del análisis mostraron que la cepa No. 240 fue identificada como perteneciente a la especie bacteriana *Enterobacter cloacae*, mientras que el resto de las cepas fueron agrupadas en la especie *Burkholderia cepacia*. El porcentaje de identificación de las cepas analizadas mediante las pruebas API 20E (tanto los aislados provenientes del maíz rojo como los de maíz piedra blanca) fue en el rango de 86.2 a 99.7 % el cual es considerado como aceptable para la identificación del género.

Tabla 5. Características fenotípicas de las cepas diazótrofes endófitas aisladas de maíz "piedra blanca".

Prueba bioquímica	Grupo No. ^a						
	1	2	3	4	5	6	7
Asimilación:							
Sacarosa-Lactosa	-	-	-	-	-	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa:							
Oxidación	+	+	+	+	+	+	+
Fermentación	-	-	+	-	+	+	+
Descarboxilación:							
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	-	+	-	-	-	-	+
Crecimiento en:							
MacConkey	+	+	+	+	+	+	+
PCAT	+	+	+	+	±	±	±
ARA	-	+	+	+	+	+	+

^a **Grupo 1:** *Burkholderia cepacia* ATCC 29352. **Grupo 2:** 231, 249, 262, 273, *Burkholderia vietnamiensis* LMG 11347. **Grupo 3:** 235. **Grupo 4:** 293. **Grupo 5:** 240, 242, 243, 250, 260, 308, 312. **Grupo 6:** 284. **Grupo 7:** 263.

+, prueba positiva. -, prueba negativa. ±, crecimiento pobre de la cepa y sin cambio en el color del medio de cultivo PCAT adicionado con azul de bromotimol.

Secuencia parcial del gen ribosomal 16S.

Las cepas analizadas fueron la No. 4, No. 16 y No. 24 las cuales fueron aisladas del maíz "rojo". La secuencia parcial del gen ribosomal 16S rDNA de cada uno de los aislados bacterianos fue comparada con las ya existentes en la base de datos NCBI. La secuencia parcial del gen ribosomal 16S de las cepas No. 4 y No. 16 fue alineada con aquella de *Burkholderia vietnamiensis*. También se realizó el alineamiento de las secuencias parciales del gen 16S rRNA de las cepas No. 4 y No. 16 con aquella de "*B. brasilensis*", la cual no ha sido oficialmente descrita hasta la fecha, pero existe reportada la secuencia del gen ribosomal 16S en la base de datos NCBI (los números de acceso de las diferentes especies de *Burkholderia* se encuentran en la Tabla 5).

Cepa No. 4: la secuencia parcial del gen ribosomal 16S mostró la mayor similitud con las especies de *Burkholderia cepacia*, *B. vietnamiensis* y *B. multivorans*. En la Figura 3 se muestra el alineamiento de la secuencia parcial perteneciente a la cepa No. 4 con la cepa tipo TVV-75 de *B. vietnamiensis* y con la cepa M130 de "*Burkholderia brasilensis*". La secuencia parcial de la cepa No. 4 corresponde a las bases 1 a 121 de la secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa TVV-75 de *B. vietnamiensis*, entre las cuales existen solo 2 diferencias. El alineamiento con la cepa M130 de "*B. brasilensis*" corresponde a las bases 1 a 132 y muestra 9 diferencias y un "gap" de dos bases en la secuencia de "*B. brasilensis*".

Cepa No. 16: la secuencia parcial del gen ribosomal 16S mostró mayor similitud con las especies de *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia* sp. (C3B1M) y *B. graminis*. En la Figura 4 se muestra el alineamiento de la secuencia parcial de la cepa No. 16 con la cepa TVV-75 de *B. vietnamiensis* y la cepa M130 de *B. brasilensis*. La secuencia parcial de la cepa No. 16 corresponde a las bases 1226 a 1462 de la secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa *B. vietnamiensis* entre las cuales existen 12 diferencias. El alineamiento de la secuencia parcial del gen 16S rDNA de la cepa No. 16 con aquella de la cepa M130 de *B. brasilensis* corresponde a las bases 1237 a 1455 y muestra 9 diferencias entre las dos secuencias.

Cepa No. 24: la secuencia parcial del gen ribosomal 16S de la cepa No. 24 mostró mayor similitud con *Enterobacter agglomerans*, *Pantoea* sp. y *Enterobacter absuriae*. En la Figura 5 se muestra el alineamiento de la secuencia parcial de la cepa No. 24 y la cepa A47 de *Enterobacter agglomerans* (No. de acceso AF130918). La secuencia de la cepa No. 24 corresponde a las bases 1001 a 1323 de la secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa A47 *Enterobacter agglomerans* entre las cuales existen 10 diferencias.

```

1                                     50
tgcccttacac atg      a      a      gt      g ca      t      Cepa No. 4
tgcccttacac atg      g      g      ..      c gg      c      B. brasiliensis M130
.....             a      a      gt      g ca      t      B. vietnamiensis TVV-75
-----CAAGTCG -ACGGCAGC- CCG--GCTT- --CCTGG-GG      Consenso

51                                     100
                                     g g      t      Cepa No. 4
                                     g a      g      B. brasiliensis M130
                                     a g      t      B. vietnamiensis TVV-75
CGAGTGGCGA ACGGCTGAGT AATACATCGG AAC-T-TCCT G-AGTGGGGG      Consenso

101                                     150
                                     a      ..... Cepa No. 4
                                     g      gctctg aggaggaaag      B. brasiliensis M130
                                     g      gatcta tggatgaaag      B. vietnamiensis TVV-75
ATAGCCCGGC GAAAGCCG-A TTAATACCGC ATAC-----      Consenso

```

Figura 3. Alineamiento de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S rDNA de la cepa No. 4 en comparación con la cepa TVV-75 de *Burkholderia vietnamiensis* y la cepa M130 de *B. brasiliensis*.


```

1241                                     1250
..... a   tg   c   a   Cepa No. 16
gatttgccaac cccgcgagggg gagctaatacc cagaaaac g   gt   t   c   B. vietnamiensis TVV-75
gqtttgcaag cccgcgaggtg gagccaatacc cagaaaac g   gt   t   c   B. brasiliensis M130
-----C- ATC--AG-C- Consenso

1251                                     1300
      c   g           c   g           Cepa No. 16
      t   c           g   a           B. vietnamiensis TVV-75
      t   g           c   a           B. brasiliensis M130
GGAT-GCA-T CTGCAACTCG A-TGC-TGAA GCTGGAATCG CTAGTAATCG Consenso

1301                                     1350
CAGATCAGCA TCCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGTCTTGT ACACACCGCC Consenso

1351                                     1400
                        g           Cepa No. 16
                        a           B. vietnamiensis TVV-75
                        g           B. brasiliensis M130
CGTCACACCA TGGGAGTGGG TTTT-CCAGA AGTGGCTAGT CTAACCGCAA Consenso

1401                                     1450
                        c           a           Cepa No. 16
                        t           g           B. vietnamiensis TVV-75
                        c           g           B. brasiliensis M130
GGATGATGGT CACCAACG-A GGATTCATGA CTGGGT-AA GTCGTAACAA Consenso

1451                                     1500
      g   gta tcggaaggtg cggct..... Consenso
      g   gta tcggaaggtg cggctggatc acctcctttc cagagctttc
      t   .....
GGTA-CC-----

```

Figura 4. Alineamiento de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S rDNA de la cepa 16 en comparación con la cepa TVV-75 de *Burkholderia vietnamiensis* y la cepa M130 de *B. brasiliensis*.

1001		1050					
	t		Cepa No. 24				
	g		<i>E. agglomerans</i> A47				
GGGAAC-CTG	AGACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAGCTC	GTGTTGTGAA	Consenso		
1051		1100					
ATGTTGCGGT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTATCCT	TTGTTGCCAG	Consenso		
1101		1150					
	g	c	c	g	a	t	Cepa No. 24
	a	t	t	a	g	c	<i>E. agglomerans</i> A47
CG-T-CGG-C	GGGAACTCAA	AGG-GACTGC	C-GTGATAAA	C-GGAGGAAG	Consenso		
1151		1200					
GTGGGGATGA	CGTCAAGTCA	TCATGGCCCT	TACGAGTAGG	GCTACACACG	Consenso		
1201		1250					
TGTTACAATG	GCGCATACAA	AGAGAAGCGA	CCTCGCGAGA	GCAAGCGGAC	Consenso		
1251		1300					
	t		t		a	Cepa No. 24	
	c		c		g	<i>E. agglomerans</i> A47	
CTCA-AAAGT	GCGTCGTAGT	CCGGAT-GGA	GTCTGCAACT	CGACTCC-TG	Consenso		
1301		1350					
				Cepa No. 24		
			ggatcag	aatgccacgg	tgaatacgtt	<i>E. agglomerans</i> A47	
AAGTCGGAAT	CGCTAGTAAT	CGT-----	-----	-----	Consenso		

Figura 5. Alineamiento de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S rDNA de la cepa 24 en comparación con la cepa A47 de *Enterobacter agglomerans*.

Secuencia completa del gen ribosomal 16S.

La secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa No. 16 (identificada como *Burkholderia* y aislada de maíz "rojo") se determinó siguiendo la estrategia de clonación mostrada en la Figura 6. Mediante este procedimiento se obtuvieron 7 subclonas, de las cuales, 5 (a, b-1, b-2, c-1 y d) fueron utilizadas para llevar a cabo la secuencia del DNA en doble cadena (hebra codificadora y guía). Las subclonas a, b-1, b-2, c-1 y d cubren el 100 % del gen ribosomal 16S de la cepa No. 16 y poseen el tamaño adecuado para determinar la secuencia en el modelo de secuenciador utilizado.

En la Figura 7 se muestra la secuencia del gen 16S rDNA de la cepa No. 16, en la cual las letras mayúsculas corresponden a la secuencia del DNA en doble cadena en tanto que las letras minúsculas representan a la secuencia nucleotídica en cadena sencilla. El número de nucleótidos que abarcó la secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa No. 16 fue de 1524, de los cuales, 39 corresponden a secuencia nucleotídica en cadena sencilla (2.6 %).

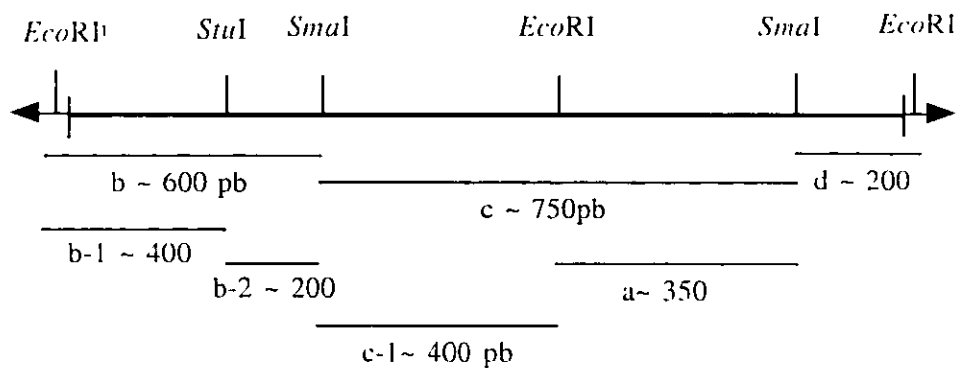


Figura 6. Estrategia de clonación del gen ribosomal 16S de la cepa No. 16 para su secuenciación.

- i Enzimas de restricción utilizadas para la clonación de los distintos fragmentos de DNA .
- Gen ribosomal 16S de la cepa No. 16, ~ 1.6 kb.
- Vehículo de clonación pCRII (Invitrogen).

```

1  GAGTTTGATC CTGGCTCAGA ATTGAACCGT GGGCGATGAT CTTA TATATG
51  CAAGTCGAAC GGCAGCACCG GTGCTTGCACT CTACTTGGTAA GTTAAATGAG
101 GGTGAGTAAT ACATCGGAAC GTGTCCTGTA GTGGGGGATA GCGCCGGCAA
151 AGCCGGATTA ATACCGCATA CGATCTACCG ATGAAAAGCG GCGATCTTGG
201 GACCTCGCGC TATAGCGGCG GCCGATGGCG GATTAGCTAG TTGCTGATGAT
251 AAATKCTCAC CAAGGGGACG ATCCGTACCT GGTCTGATAG GATGACCAAT
301 CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACCGGAGG CAACAGTAAK
351 GAATTTTGGA CAATGGGCGA AAGCCTGATC CAGCAATGCC GCGTGTGTGA
401 AGAAGGCCTT CGGGTGTAA AGCACTTTTG TCCGGAAAGA AATCCCTGAT
451 CCTAATATGG CCGGGGGATG ACCGTACCGG AAGAATAAGC ACCCGCTAAC
501 TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG GTGCAAGCGT TAATCGGAAT
551 TACTGGGCGT AAAGCGTGG CAGGCGGTGA TGTAAGACCG ATGTGAAATC
601 CCCGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCaTTGGTG ACTGCATCGC tTgaGTATG
651 cagAGGGGGG TAGAGTTCCA CGTGTAGCAG TGAAATGCGT AGAGATGTG
701 AGGAATACCG ATGGCGAAGG CAGCCCCCTG GGTCAATACT GACgCTCATG
751 CACGAAAGcG TGGGGAGCAA aCAGGATTAG ATACCCTGCT AGTCCACCGC
801 cTAAACGATG TCAACTGGTT GTCCGGTCTT CATTGACTTG GTAACGTAG
851 TAACgCGTGA AGTTGACCGC CTGGgGAGTA CgGTCCGAAG ATTTAAAACTC
901 AAAGGAATTG ACgGGGACcC GCACAAGCgG TGGATGATGT GGATTAATTG
951 GATGCAACgc GaAAAaCCCT ACCTACCCTT GACATGtaag GAATTCCTCT
1001 GAGAGGTGGA AGTGCCTGAA AGCGACCCGT AACACAGCTG CTGCATGCTT
1051 GTCGTACGCT CGTGTCTGTA GATGTTGGCT TAAGTCCCTC AACGAGCGCA
1101 ACCCTTGTC CTAGTTgcTA CGCAAGAGCA CTCCAGGAG ACTGCCGGTG
1151 ACAAACCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA AGTCCCTCATG GCCTTTATG
1201 GTAGggcTTC ACACGTCATA CAATGGTCCG AACAGAGCAT TGCCAAGCGG
1251 CGAGGTGGAG CCAATCCCAG AAAACCGATC GTAGTCCGA TCGCAGTCTG
1301 CAACTCGACT GCGTGAAGCT GGAATCGCTA GTAATCGCGG ATCAGCATGC
1351 CGcggTGAAT ACGTTCCTCG GTCTTGTA CAACCGCCGT CACACCATGG
1401 GAGTGGGTTT TGCCAGAAGT GGCTAGTCTA ACCGCAAGGA GGACCGTCC
1451 CACCGCAGGA TTCATGACTG GGGTGAAGTC GTAACAAGCT AGCCGTATCG
1501 GAAGGTGCGG ctGGATCACC TCCTT

```

Figura 7. Secuencia del gen ribosomal 16S de la cepa No. 16 (*Burkholderia*). Las letras en mayúsculas representan la secuencia del DNA en doble cadena en tanto que las letras en minúsculas representan cadena sencilla.

Mediante la comparación de la secuencia del gen ribosomal 16S de diferentes cepas del género *Burkholderia* (la lista de cepas de *Burkholderia* utilizadas se encuentra en la Tabla 5) y las cepas No. 16 y 273 se obtuvo una matriz de similitud utilizando el programa Distances (Tabla 6). La secuencia del gen 16SrDNA de la cepa 273 fue determinada por el Dr. Jacques Balandreau (Laboratoire d'Ecologie Microbienne du Sol, UMR5557 CNRS Université Lyon I, France). La similitud entre las cepas No. 16 y 273 corresponde a un 99.9 % y la similitud de estas dos cepas con las secuencias de *Burkholderia* fijadoras de nitrógeno (*B. vietnamiensis* y *B. brasilensis*), reportadas en la base de datos GeneBank, es de aproximadamente 95 % y de igual manera con la especie tipo de este género bacteriano, *B. cepacia*. La cepa No. 16 y 273 mostraron la mayor similitud con la cepa tipo de *B. graminis* (96.3 y 96.2 % respectivamente). En el árbol filogenético de la Figura 8 puede observarse que las cepas No. 16 y 273 están más cercanas a las cepas de *B. brasilensis*, *B. kururiensis*, *B. graminis*, *B. caribiensis* y algunas cepas de *Burkholderia* sp.

Tabla 5. Lista de cepas utilizadas en el análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S.

Bacteria	Fuente (cepa) ^a	EMBL ^b
<i>Burkholderia andropogonis</i>	ATCC23061	X67037
<i>B. brasiliensis</i>	(M130)	AJ238360
<i>B. caribiensis</i>	(MWAP71)	Y18703
<i>B. caryophylli</i>	ATCC25418T	AB021423
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416T	U96927
<i>B. cocovenenans</i>	ATCC33664T	AB021389
<i>B. gladioli pathovar gladioli</i>	ATCC19248T	X67038
<i>B. glathei</i>	ATCC29195T	AB021374
<i>B. gluamae</i>	LMG2196T	U96931
<i>B. graminis-1</i>	(C4D1MT)	U96939
<i>B. graminis-2</i>	(AUS35)	U96941
<i>B. kururiensis</i>		AB024310
<i>B. mallei</i>	(GB8)	AF11018
<i>B. multivorans</i>	LMG13010	Y18703
<i>B. norimbergensis</i>		Y09879
<i>B. phenazinium</i>	LMG2247T	U96936
<i>B. plantarii</i>	LMG9035T	U96933
<i>B. pseudomallei</i>	(1026b)	U91839
<i>B. pyrrocinia</i>	ATCC15958T	AB021369
<i>B. thailandensis</i>	(F264)	BSU91838
<i>B. vandii</i>	LMG16020T	U96932
<i>B. vietnamiensis-1</i>	LMG10929T (TVV75)	U96928
<i>B. vietnamiensis-2</i>	(TVV70)	U96929
<i>B. vietnamiensis-3</i>	(AMMD)	AF043302
<i>Burkholderia</i> sp.	(C3B1M)	U96938
<i>Burkholderia</i> sp.	(CRE7)	U37340
<i>Burkholderia</i> sp.	(JB1)	X92188
<i>Burkholderia</i> sp.	(LB400)	U86373
<i>Burkholderia</i> sp.	(m35b)	U96937
<i>Burkholderia</i> sp.	(N2P5)	U37342
<i>Burkholderia</i> sp.	(SAPII)	AF052387
<i>Burkholderia</i> sp.	(VUN10013)	AF068011

^a. Colección bacteriana en la cual se encuentran registradas cada una de las cepas, y/o nombre de la cepa. ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA; LMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Gent, Belgium.

^b. Número de acceso bajo el cual cada secuencia se encuentra disponible en la base de datos EMBL.

Tabla 6. Matriz de similitud calculada a partir de las distancias (Jukes & Cantor) entre las secuencias del gen ribosomal 16S de distintas cepas de *Burkholderia* y las cepas No. 16 y No. 273.

Bacteria	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. <i>B. brasiliensis</i>	100	95.7	94.4	94.2	94.1	94.5	94.8	99.9	95.1	93.3	94.8	94.3	94.6	94.5	95.3	95.5
2. <i>B. caribiensis</i>		100	94.8	93.6	93.8	94.1	96.9	95.8	94.6	93.4	96.8	94.1	94.2	94.8	95.5	95.6
3. <i>B. cepacia</i>			100	97.8	97.4	97.1	89.5	94.4	97.8	93.5	93.8	94.7	92.0	98.1	95.7	95.7
4. <i>B. cavaenensis</i>				100	98.4	98.4	94.5	94.3	97.8	93.3	95.6	98.1	98.6	97.9	95.0	95.0
5. <i>B. gladioli</i>					100	98.2	94.1	92.8	97.4	93.2	94.3	98.7	98.4	97.7	92.8	93.1
6. <i>B. glumae</i>						100	93.6	94.5	97.7	93.3	94.7	98.7	97.5	97.3	94.9	95.0
7. <i>B. graminis</i> -1							100	94.8	95.6	92.5	96.5	93.4	89.7	92.6	96.3	96.2
8. <i>B. kururienensis</i>								100	95.2	93.4	94.9	94.4	94.6	94.5	94.6	94.8
9. <i>B. mallei</i>									100	93.4	95.6	97.1	97.8	98.0	94.5	94.6
10. <i>B. norimbergensis</i>										100	93.0	93.2	92.5	93.4	94.2	94.2
11. <i>B. phenaczinium</i>											100	94.8	94.3	93.5	95.5	95.5
12. <i>B. plantarii</i>												100	95.6	96.0	95.5	95.5
13. <i>B. vandii</i>													100	96.0	95.0	95.0
14. <i>B. vietnamiensis</i> -1														100	95.4	95.6
15. Cepa No. 16															100	99.9
16. Cepa 273																100

a. La procedencia de cada una de las secuencias utilizadas en el análisis se muestra en la Tabla 5. Cepa No. 16 aislada de maíz "rojo". Cepa 273 aislada de maíz "piedra blanca".

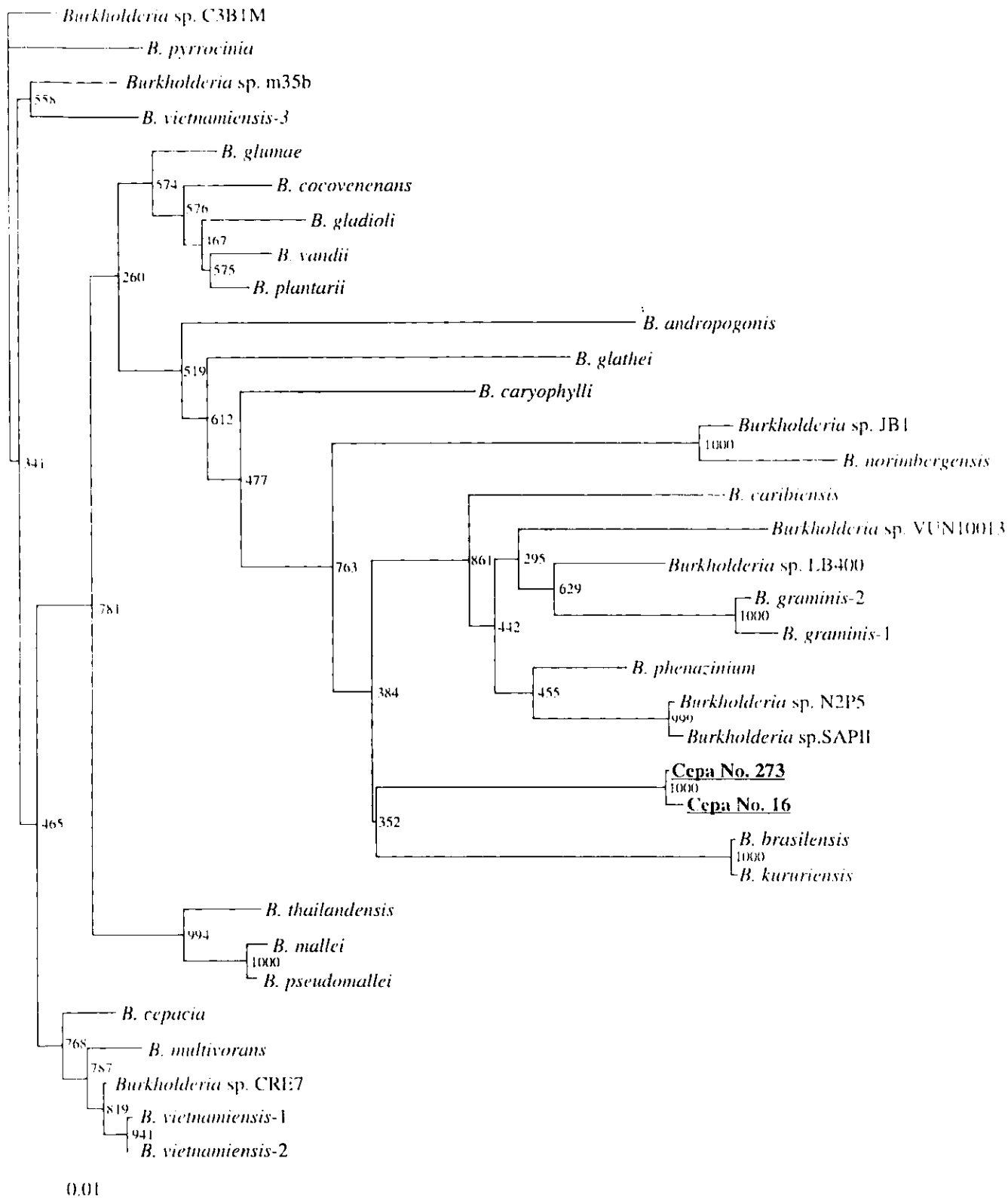


Figura 8. Árbol filogenético basado en el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA de cepas del género *Burkholderia*, la cepa No. 16 y No. 273. El análisis de las secuencias se realizó mediante el programa ClustalW y el árbol se muestra con el programa Treeview. Los números en cada una de las ramificaciones son el análisis mediante Bootstrap realizado con el programa ClustalW. La escala en la barra indica el cambio de un nucleótido por cada 100 pb.

Tabla 7. Patrones de restricción del gen ribosomal 16S rDNA de cepas diazótrofes endófitas de maíz.

Cepa No.	Genotipo ^{vi}	Patrones de restricción del gen 16S rDNA digeridos con:			
		<i>Hha</i> I	<i>Alu</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Dde</i> I
4	1	a	a	a	a
16	1	a	a	a	a
231	1	a	a	a	a
248	1	a	a	a	a
273	1	a	a	a	a
262	1	a	a	a	a
284	3	a	e	a	b
293	5	b	b	b	d
235	7	c	c	c	f
240	7	c	c	c	f
250	7	c	c	c	f
260	7	c	c	c	f
263	7	c	c	c	f
308	7	c	c	c	f
312	7	c	c	c	f
242	8	d	d	d	g
<i>B. cepacia</i> ⁱ	2	a	f	a	a
<i>B. vietnamiensis</i> ⁱⁱⁱ	4	a	e	a	e
<i>R. solanacearum</i> ^{iv}	6	e	g	e	e

ⁱ Las letras en cada columna corresponden a un patrón de restricción para cada una de las enzimas utilizadas. ⁱⁱ ATCC 29352. ⁱⁱⁱ LMG 11347. ^{iv} LMG 2299.

^v Genotipo al que corresponden cada una de las cepas de acuerdo al análisis de patrones de restricción del gen 16S rDNA. nd, no determinado.

En la figura 9 se muestra el agrupamiento de las cepas bacterianas aisladas de maíz. La mayor parte de las cepas quedaron ubicadas en 2 divisiones. En las divisiones I y II se localizan las cepas de referencia de *Burkholderia cepacia* y *B. vietnamiensis*, respectivamente. La similitud entre las cepas del genotipo 1 con respecto a *B. cepacia* en la división I fue del 90 % al igual que la similitud entre la cepa No. 284, del genotipo 3, con respecto a *B. vietnamiensis* en la división II. Las cepas de la división III poseen una similitud del 60 % con respecto a las cepas de referencia de *Burkholderia*.

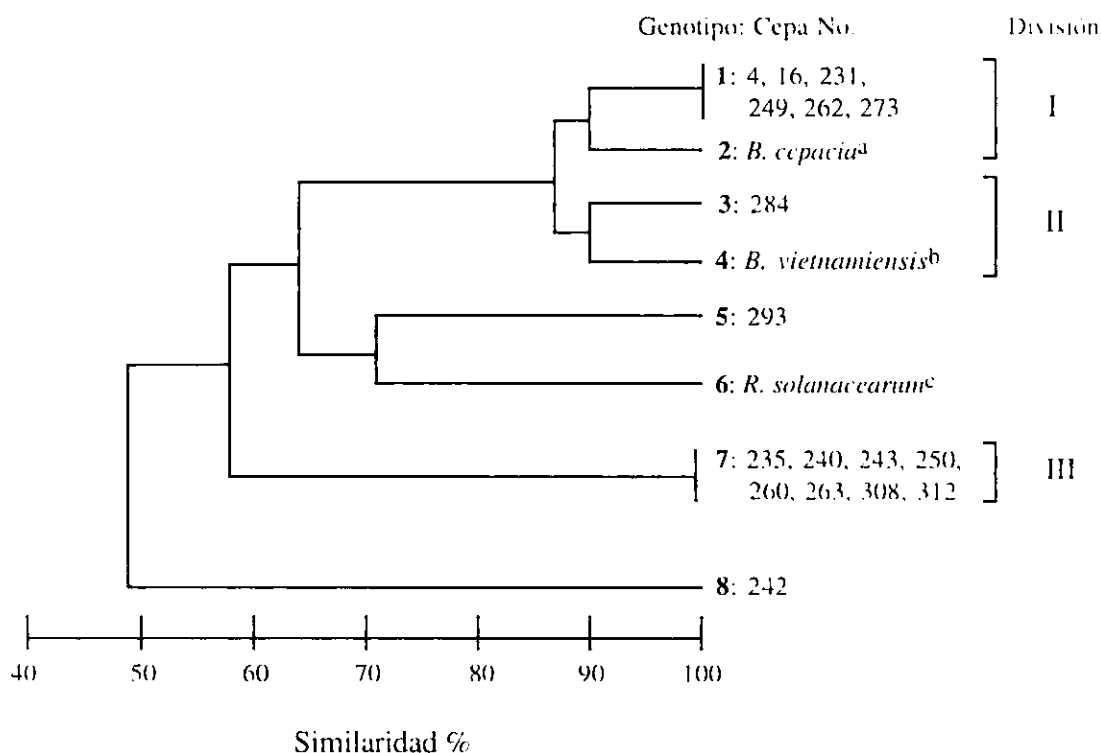


Figura 9. Dendrograma mostrando la agrupación de cepas diazótropas endófitas aisladas de maíz mediante el análisis de patrones de restricción del gen 16S rDNA amplificado por PCR (ARDRA).

^a ATCC29352. ^b LMG11347. ^c LMG2299.



Figura 10. Patrones de restricción del gen 16S rDNA amplificado por PCR.

i. Digestión con la enzima *HhaI*.

ii. Digestión con la enzima *AluI*.

Las cepas correspondientes a cada uno de los patrones se definen en la Tabla 7.

1. *Burkholderia brasiliensis* cepa M130 (BR-11340).

2. *B. vietnamiensis* LMG12862.

3. *Herbaspirillum* Z67.

M. marcador de peso molecular 100pb (GibcoBRL).

Ensayo de colonización endófito.

Las 13 cepas fijadoras de nitrógeno, aisladas de maíz "rojo", fueron probadas en su capacidad para colonizar los tejidos internos de plantas de dos variedades distintas de maíz (Tabla 8). De las 13 cepas ensayadas, 6 fueron capaces de colonizar los tejidos internos de ambas variedades de maíz y otras 3 cepas colonizaron solo una de las variedades. La menor capacidad colonizadora de los tejidos internos de las plantas de maíz se observó con la cepa No. 15, la cual pertenece a la especie *Azospirillum lipoferum*. El número más probable de bacterias en el interior de las raíces varió en el orden de 10^4 a 10^7 UFC por gramo de tejido vegetal fresco y en la parte aérea en el rango de 10^3 a 10^6 , dependiendo de la cepa y de la variedad de maíz.

La inoculación bacteriana no causó síntomas visibles de enfermedad en las plantas de maíz, así como tampoco cambios en la morfología de la raíz.

En el interior de las plantas testigo no se detectó a ninguna de las cepas analizadas en el experimento de colonización y en la mayoría de las plantas inoculadas se recobraron las cepas ensayadas, no observándose contaminación con otras bacterias u hongos.

Tabla 8. Capacidad colonizadora de los tejidos internos de las plantas de maíz por las cepas diazótrofes aisladas del maíz "rojo".

CE:PA	NMP ^a	
	ROJO ^b	B-555 ^b
2	R ND A ND	R 2.5x10 ⁶ A ND
3	R 2.5x10 ⁶ A 9.5x10 ⁵	R 2.5x10 ⁶ A 9.5x10 ⁵
9	R ND A ND	R 2.5x10 ⁶ A 9.5x10 ⁶
12ch	R 2.5x10 ⁶ A 2.5x10 ⁶	R 2.5x10 ⁶ A 2.5x10 ⁶
12g	R 1.5x10 ⁷ A 1.5x10 ⁵	R 2.5x10 ⁶ A 2.5x10 ⁶
15	R <10 A <20	R <10 A ND
16	R 2.5x10 ⁶ A 2.5x10 ⁶	R 2.5x10 ⁶ A 2.5x10 ⁶
19	R 4.5x10 ⁵ A 4.5x10 ⁵	R ND A ND
24	R 2.5x10 ⁶ A 1.5x10 ⁵	R 2.5x10 ⁴ A 1.5x10 ³

^a Número más probable de bacterias endófitas por gramo de tejido vegetal de plantas con 15 días de crecimiento.

^b "Rojo", variedad criolla; "B-555", variedad híbrida. ND, no detectado.

R, raíz; A, parte aérea de la planta.

Efecto de la inoculación de cepas diazótroficas endófitas sobre el crecimiento de plantas de maíz.

La inoculación del maíz "arrocillo" con las cepas No. 12ch, No. 16 y No. 24 no promovió el desarrollo de las plantas cuando crecieron con bajos niveles de nitrógeno, 5 mg por maceta (Tabla 9). Sin embargo, en los tratamientos en donde las plantas de maíz fueron inoculadas con las cepas No. 12 y No. 16 y tratadas con 50 mg de nitrógeno mineral, se observó un incremento en el crecimiento de la raíz y de la parte aérea de las plantas en el rango de 3.5 a 30 %, comparadas con las plantas testigo. Las plantas de maíz inoculadas con la cepa No. 16 y tratadas con la más alta concentración de nitrógeno, 100 mg por maceta, presentaron mayor crecimiento que las plantas testigo y que las plantas inoculadas con las cepas No. 12ch y 24. El incremento en el peso seco de la raíz y de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa No. 16 fue de 44.1 y 13.6 % respectivamente, comparadas con las plantas testigo. El establecimiento de las tres cepas en el interior de las plantas de maíz criollo "arrocillo" fue variable ya que no se logró el reaslamiento en la mayoría de las plantas analizadas. Sin embargo, es posible que las cepas colonizaran la rizosfera, lo cual no fue determinado.

La inoculación de plantas de maíz híbrido B-555 con las cepas No. 12ch y No. 24 y tratadas con la concentración menor de nitrógeno mineral no promovió significativamente el crecimiento de la raíz, pero en los tratamientos con la concentración media y alta de nitrógeno se observó un incremento en el peso seco de la raíz en el rango de 13.5 a 56.3 % comparando con las plantas testigo (Tabla 10). En ambos tratamientos (50 y 100 mg de nitrógeno por maceta) la inoculación de la cepa No. 24 logró el mayor incremento en el crecimiento de la raíz de las plantas. Caso contrario a lo observado con la raíz, la inoculación de plantas de maíz híbrido B-555 con las cepas No. 12ch y No. 24 incrementó hasta en 59.2 % el crecimiento de la parte aérea de las plantas, comparadas con las testigo (Tabla 10). El incremento observado fue estadísticamente significativo al igual que el aumento en el nitrógeno total de las plantas, sin embargo, el porcentaje de nitrógeno fue muy similar entre las plantas inoculadas y las plantas testigo. En la variedad de maíz B-555, las cepas No. 12ch y No. 24 presentaron un establecimiento variable en el interior de las plantas, similar al caso observado con el maíz "arrocillo".

Tabla 9. Efecto de la inoculación de las cepas diazotróficas endófitas, aisladas de maíz "rojo", sobre el crecimiento de plantas de maíz "arrocillo".

TRATAMIENTO	PESO SECO (g) ¹		DIFERENCIA (%) ²	
	RAIZ	P. AEREA	RAIZ	P. AEREA
5 mg N³				
Inoc. cepa 12ch	1.92 ± 0.86 a	1.56 ± 0.44 a, b	-11.5	-15.2
Inoc. cepa 16	2.18 ± 1.09 a	1.52 ± 0.46 a, b	1.0	-17.4
Inoc. cepa 24	1.60 ± 0.32 a	1.23 ± 0.46 b	-23.0	-33.2
Testigo	2.17 ± 0.81 a	1.84 ± 0.52 a	-	-
50 mg N³				
Inoc. cepa 12ch	5.20 ± 2.91 a	5.18 ± 1.65 a	30.7	30.4
Inoc. cepa 16	4.12 ± 1.50 a	4.47 ± 1.34 a	3.5	12.6
Inoc. cepa 24	3.68 ± 1.30 a	3.74 ± 1.29 a	-7.5	-2.26
Testigo	3.98 ± 0.91 a	3.97 ± 1.21 a	-	-
100 mg N³				
Inoc. cepa 12ch	3.72 ± 1.06 a	4.03 ± 1.74 a	-17.4	-20.0
Inoc. cepa 16	6.70 ± 1.33 b	5.83 ± 1.32 b	44.1	13.6
Inoc. cepa 24	4.51 ± 1.82 a, c	4.55 ± 1.45 a, b	-3.0	-11.3
Testigo	4.65 ± 0.94 c	5.13 ± 1.77 a, b	-	-

¹ Los valores son la media de 8 a 12 plantas con 33 días de crecimiento seguida por la desviación estandar. Letras iguales en la misma columna para cada tratamiento indican que no difieren a P=0.05, utilizando la prueba de *t* de "Student".

² Diferencia en porcentaje de peso seco entre las plantas inoculadas y el testigo sin inocular.

³ Miligramos de nitrógeno por maceta, dos plantas por maceta.

Tabla 10. Efecto de la inoculación de cepas diazótrofes endófitas, aisladas de maíz "rojo", sobre el crecimiento del maíz híbrido "B-555".

TRATAMIENTO	PESO SECO (g) ¹		INCREMENTO %		% NITROGENO ¹ P. aérea	NITROGENO ¹ TOTAL (mg/planta)
	Raíz	P. aérea	Raíz	P. aérea		
5 mg N ²						
Inoc. cepa 12ch	1.89 ± 1.09 a	0.86 ± 0.60 b	8.0	59.2	1.07 ± 0.25 a	9.83 ± 9.94 a, b
Inoc. cepa 24	2.02 ± 0.77 a	0.80 ± 0.25 b	15.4	48.1	0.99 ± 0.14 a	8.05 ± 2.99 b
Testigo	1.75 ± 0.63 a	0.54 ± 0.15 a	-	-	1.07 ± 0.36 a	5.81 ± 2.71 a
50 mg N ²						
Inoc. cepa 12ch	3.35 ± 1.51 a, b	1.91 ± 0.92 b	13.5	40.4	1.34 ± 0.37 a	23.9 ± 10.9 b
Inoc. cepa 24	4.07 ± 1.18 b	1.85 ± 0.53 b	37.9	36.0	1.18 ± 0.26 a	22.2 ± 9.00 b
Testigo	2.95 ± 0.74 a	1.36 ± 0.31 a	-	-	1.14 ± 0.23 a	15.5 ± 4.81 a
100 mg N ²						
Inoc. cepa 12ch	4.42 ± 1.55 b	2.52 ± 0.80 a, b	33.1	11.2	1.58 ± 0.42 a	38.9 ± 16.0 a
Inoc. cepa 24	5.19 ± 1.24 b	3.09 ± 0.88 b	56.3	37.3	1.35 ± 0.23 b	40.9 ± 10.8 a
Testigo	3.32 ± 1.09 a	2.25 ± 0.74 a	-	-	1.57 ± 0.30 a	34.8 ± 12.7 a

¹ Los valores son la media de 16 a 20 plantas seguida por la desviación estandar. Letras iguales en la misma columna para cada tratamiento indican que no difieren a P=0.05, utilizando la prueba de *t* de "Students".

² Miligramos de nitrógeno por maceta, dos plantas por maceta.

La inoculación del maíz híbrido B-555 con la cepa No. 16 (identificada como *Burkholderia*) y tratadas con la concentración menor de nitrógeno mineral no incrementó de manera significativa el desarrollo de la raíz y de la parte aérea de las plantas, comparando con el testigo. Sin embargo con la dosis media y alta de nitrógeno, 50 y 100 mg respectivamente, hubo un incremento en el desarrollo de las plantas, tanto de la raíz como de la parte aérea (Tabla 11). El incremento del peso seco en la parte aérea de las plantas varió de 16.4 a 28.3 % con respecto a las plantas testigo. Sin embargo, se pudo observar que las plantas tratadas con la dosis de nitrógeno menor (5 mg por maceta) e inoculadas con la cepa No. 16 quedaron por debajo del peso seco de las plantas testigo. Se determinó la presencia de la cepa No. 16 en la rizosfera e interior de tallo y hojas de las plantas de maíz, encontrándose a la bacteria solamente en la rizosfera de las plantas.

Tabla 11. Efecto de la inoculación de la cepa No. 16 sobre el crecimiento de plantas de maíz híbrido B-555.

TRATAMIENTO	PESO SECO (g) ¹		DIFERENCIA ² (%)	
	RAIZ	P. AEREA	RAIZ	P. AEREA
5 mg N ³				
Inoc. cepa 16	0.96 ± 0.27 a	0.33 ± 0.08 a	3.2	-5.7
Testigo	0.93 ± 0.26 a	0.35 ± 0.12 a	-	-
50 mg N				
Inoc. cepa 16	2.15 ± 0.58 a	0.78 ± 0.28 a	27.2	16.4
Testigo	1.69 ± 0.34 b	0.67 ± 0.18 a	-	-
100 mg N				
Inoc. cepa 16	3.08 ± 1.10 a	1.27 ± 0.36 a	32.8	28.3
Testigo	2.32 ± 0.60 b	0.99 ± 0.30 b	-	-

¹ Los valores son la media de 16 a 19 plantas de 33 días de crecimiento seguida por la desviación estandar. Letras iguales en la misma columna para cada tratamiento indican que no difieren a P= 0.05, utilizando la prueba de *t* de "Student".

² Diferencia en porcentaje de peso seco entre las plantas inoculadas y el testigo sin inocular.

³ Miligramos de nitrógeno por maceta, dos plantas por maceta.

Determinación de ácido indol acético (AIA).

Se evaluó en medio de cultivo la producción de indoles totales y AIA desarrollados por las cepas No. 3, No. 12ch, No. 16 y No. 24, aisladas de plantas de maíz "rojo", para tratar de explicar si la promoción en el crecimiento de las plantas de maíz se debió a la producción de estos compuestos. La producción de indoles totales por las cepas No. 3, No. 12ch y No. 24 varió en el rango de 26.5 a 32.5 $\mu\text{g/ml}$ determinado mediante la prueba de Salkowsky (Tabla 12). La cepa No. 16 produjo indoles totales en cantidad mínima. Mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se determinó la concentración de AIA producido por las cepas diazótrofes (Tabla 12, Figuras 11). La cepa 16 no produjo AIA, mientras que en las cepas No. 3 y No. 24 la concentración fue de 13.8 y 14.3 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La cepa No. 12ch produjo ácido indol láctico (Figura 12).

Tabla 12. Producción de indoles totales, AIA y AIL por las cepas diazótrofes aisladas de maíz "rojo".

Cepa No.	Indoles totales ^a ($\mu\text{g/ml}$)	AIA ^b ($\mu\text{g/ml}$)	AIL ^c
3	26.5	13.8 \pm 2.5	ND
12ch	32.5	ND	+
16	<1.0	ND	ND
24	32.0	14.3 \pm 0.4	ND

^a Los valores son la media de 3 repeticiones.

^b Los valores son la media de 3 repeticiones seguida por la desviación estándar.

^c La concentración de AIL no se determinó.

AIA, ácido indol acético. AIL, ácido indol láctico.

ND, no detectado. +, producción del compuesto.

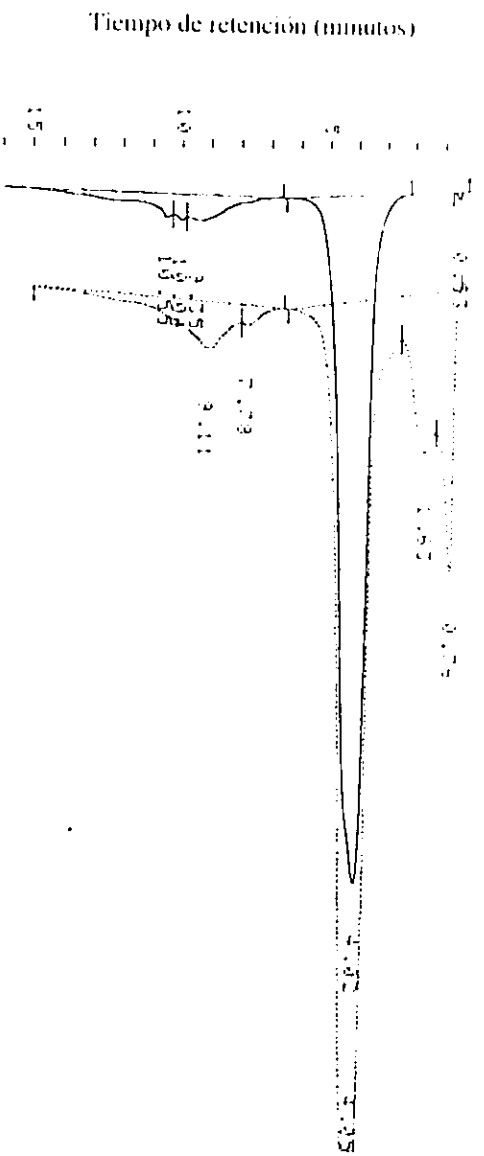


Figura 11. Separación de ácido indol acético (ALA) mediante HPLC a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos.

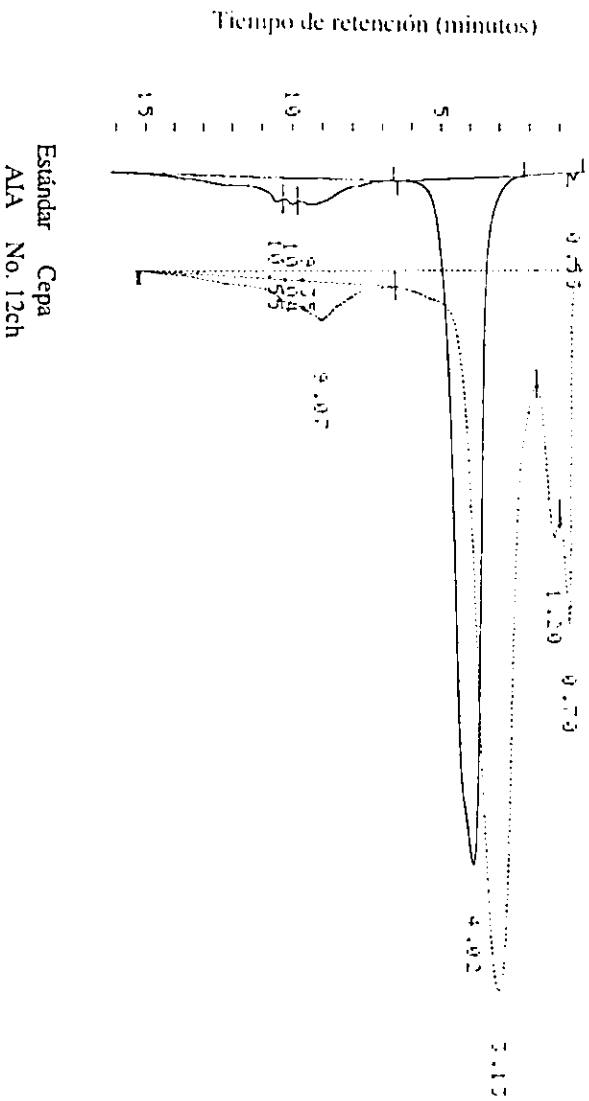


Figura 12. Separación de ácido indol láctico (ALL) mediante HPLC a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos.

DISCUSION

En la actualidad se reconoce la presencia de bacterias que habitan los tejidos internos de las plantas sin causarles daño y se ha propuesto que los endófitos parecen ser organismos antiguamente relacionados con las plantas (Pirozynski and Dalpé 1989).

En el presente estudio se llevó a cabo la búsqueda, aislamiento y caracterización de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno asociadas con dos variedades de maíz, "rojo" y "piedra blanca", las cuales han sido cultivadas tradicionalmente sin la aplicación de fertilizantes ni otros agroquímicos en la región indígena Mixe del estado de Oaxaca.

Como primer paso se realizaron ensayos para la detección de actividad nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA) en semillas germinadas de maíz, en los cultivos de los macerados de las semillas y posteriormente en plantas completas y en el cultivo del macerado de las mismas. Es así como en las semillas de maíz "rojo" y "piedra blanca", esterilizadas superficialmente y germinadas, no se observó ARA, no obstante, se logró el aislamiento de bacterias no diazotróficas, al menos en el caso del maíz "piedra blanca" (datos no mostrados). Este hecho parece ser algo bastante común en el maíz puesto que resultados similares fueron obtenidos al analizar las semillas de otras variedades, tanto criollas como híbridas (datos no mostrados). La presencia bacteriana en el interior de las semillas de maíz esterilizadas superficialmente sugiere que las bacterias pueden entrar a la semilla a través del sistema vascular de la planta y translocarse hasta alcanzar el tubo de germinación del de polen y posteriormente establecerse en el interior de la semilla durante el llenado de la misma (Mundt y Hinkle 1976).

Al igual que en las semillas de maíz, la actividad nitrogenasa no se detectó en plantas completas de maíz "rojo". Es posible que la metodología empleada (plantas encerradas en matraces) haya sido un factor determinante en la detección de la actividad (J. Balandreau, com. pers.). Sin embargo, se ha observado que pocas líneas de maíz muestran ARA y se sugiere que la asociación planta-bacteria, en este caso fijadores de nitrógeno, puede depender del genoma de la planta hospedera (Ela y col. 1982, Smith y col. 1999).

En los cultivos de los macerados de plantas de maíz "rojo" de 15 y 30 días de crecimiento se detectó ARA, mientras que en los cultivos de los macerados de maíz "piedra blanca" no se logró detectar dicha actividad. Como se mencionó anteriormente, la detección de

ARA parece depender de la variedad del maíz. Por otro lado, la detección de ARA en los cultivos de los macerados de plantas de maíz "rojo", provenientes de germinación aséptica y manejadas en condiciones de esterilidad (T-3), sugiere la existencia de bacterias diazótroficas en el interior de la semilla pero que no expresan dicha actividad, ya que no se detectó ARA en la semilla. Es posible que la expresión de ARA por las bacterias diazótroficas en el interior de las semillas de maíz se encuentre determinada por la forma de reproducción que posee el maíz, ya que en plantas propagadas vegetativamente, por ejemplo la caña de azúcar, se ha detectado ARA cuando se inicia la emergencia de las raíces nuevas (Rennie y col. 1982). Este hecho puede estar directamente relacionado con el número de diazótroficos en el interior de las semillas de maíz y en los tallos de caña de azúcar. Probablemente la semilla de maíz al encontrarse en estado de latencia no permite la proliferación bacteriana, por lo que el tiempo de 5 días (después de la germinación de la semilla), fue insuficiente para que las bacterias diazótroficas se multiplicaran y alcanzaran números elevados que permitieran detectar la ARA. En contraste, el tallo de caña de azúcar, al ser un tejido activo permite el crecimiento bacteriano y la consecuente detección de la ARA. Otra posibilidad es que las poblaciones de fijadores de nitrógeno se encuentren en estado de latencia o con una actividad metabólica tan baja que la ARA no es detectada en el interior de la semilla al iniciarse la germinación.

En el caso del maíz "piedra blanca" se logró solamente el aislamiento de bacterias no fijadoras de nitrógeno a partir de las semillas esterilizadas superficialmente y germinadas. No obstante, en plantas de esta variedad con 15 y 30 días de crecimiento se aislaron algunas cepas que expresaron ARA. La presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de maíz "piedra blanca", y su ausencia en las semillas, podría deberse a la transmisión aérea cuando se trata de plantas que provienen de granos esterilizados superficialmente (T-3), lo cual se ha sugerido ocurre en otras plantas (Ruppel y col. 1992, Olivares y col. 1997), o mediante un proceso de infección y colonización bacteriana de la raíces y posteriormente su translocación a la parte aérea de las plantas, cuando éstas provenían de las semillas inoculadas con suelo (T-2 y T-4). Se conoce que algunas bacterias habitantes del suelo tienen la capacidad para colonizar el interior de las raíces y posteriormente invadir los tejidos aéreos (Gagne y col. 1987, van Peer y col. 1992, James y col. 1994). Este mecanismo explicaría la presencia endófitica en la parte aérea de las plantas de maíz "piedra blanca" que fueron inoculadas con suelo (Tratamientos T-2 y T-4).

En general, el número de endófitos en la parte aérea de las plantas de maíz "rojo" fue mayor al encontrado en la raíz (Tabla 1). Se ha observado que el número de bacterias varía dependiendo tanto de la especie de la planta como del órgano analizado (Fisher y col. 1992), así como también del método utilizado para la extracción de los endófitos (Bell y col. 1997). Probablemente la parte aérea de la plantas sea un microambiente más favorable para los endófitos fijadores de nitrógeno debido a la mayor accesibilidad de nutrientes (Barraquio y col. 1997). Por ejemplo, los fotosintatos al ser transportados por el floema alcanzan en primer lugar la parte aérea y posteriormente la raíz de la planta. La capacidad de las bacterias para translocarse en el interior de las plantas parece estar relacionada a la capacidad de sobrevivencia de algunos endófitos como *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. y *Azoarcus* spp. (James y col. 1997, Reinhold-Hurek y Hurek 1998b).

En plantas de maíz "piedra blanca" con 15 días de crecimiento se pudo observar que existe un número mayor de endófitos en comparación con las plantas con 30 días de crecimiento, Tablas 4 y 6. De acuerdo con estos resultados la fluctuación de endófitos parece depender no solo del órgano de la planta que es analizado, sino también de la edad de la planta. Este fenómeno se ha observado en otras variedades de maíz, así como en plantas de algodón (McInroy y Kloepper 1995b) y caña de azúcar (Muñoz-Rojas y Caballero-Mellado com. pers.). También es posible que la fluctuación en el número de endófitos se deba a cambios que la planta experimenta como respuesta a los factores ambientales (Ellis y col. 1999). Es conocido que la calidad y cantidad de los exudados radicales varía grandemente dependiendo, entre otros factores, del estado de crecimiento de la planta, de la intensidad luminosa, de la temperatura y de los nutrientes minerales del suelo disponibles para la planta provocando cambios cualitativos y cuantitativos en la comunidad microbiana de la rizosfera (Curl and Truelove 1986). Estos cambios observados en el ambiente rizosférico son el producto de cambios fisiológicos que experimentan las plantas en respuesta al medio ambiente. Los cambios en la fisiología de las plantas también podrían explicar la fluctuación de los endófitos que registramos en nuestro estudio.

En la actualidad la aplicación de fertilizantes minerales a los cultivos agrícolas es algo muy común. Sin embargo, se conoce muy poco del efecto que los fertilizantes causan sobre la comunidad microbiana asociada con los tejidos internos de las plantas. En este sentido, los resultados obtenidos al aplicar nitrógeno al maíz "piedra blanca" revelaron que la actividad

actividad nitrogenasa en los cultivos de los macerados de plantas con 15 días de crecimiento se vió drásticamente abatida, lo cual fue confirmado por el número bajo de aislados que mostraron la capacidad de reducir acetileno (Tabla 4 y 5). En los macerados de maíz "piedra blanca" se logró detectar ARA en las plantas provenientes de granos esterilizados superficialmente y adicionados con suelo, tratamiento T-4. Es posible que la diferencia de ARA en plantas de maíz "rojo" y "piedra blanca" se deba a la concentración de nitrógeno aplicada en el experimento, 32.25 mg por planta de maíz "rojo" y 25 mg por planta de maíz "piedra blanca". No obstante, el efecto del nitrógeno mineral observado en el maíz "rojo" concuerda con los datos existentes en la literatura acerca de la influencia negativa del fertilizante nitrogenado sobre las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno (Fuentes-Ramírez y col. 1993, Kirchhof y col. 1997, Caballero-Mellado y Martínez-Romero 1999, Fuentes-Ramírez y col. 1999, Muthukumurasamy y col. 1999).

De acuerdo con nuestros resultados y los reportes en la literatura, nos parece importante llevar a cabo análisis para evaluar el efecto que el nitrógeno ejerce sobre la comunidad bacteriana endófitas. Probablemente el nitrógeno aplicado como fertilizante influya sobre las asociaciones endófitas en forma diferente, dependiendo de las características de cada especie bacteriana. De hecho, se conoce que la asociación de *Herbaspirillum* spp. con la caña de azúcar no es afectada por la fertilización nitrogenada (Muthukumurasamy y col. 1999). Resultados similares observamos en nuestro estudio con las cepas No. 12ch y No. 24, las cuales presentan un patrón de colonización variable en el maíz híbrido B-555 (datos no mostrados). En este caso, ambas cepas no lograron colonizar los tejidos internos de las plantas fertilizadas con la dosis de nitrógeno menor, en tanto que en los tratamientos con las mayores dosis de fertilización se presentó un mayor éxito en la colonización de las plantas.

Es conocido que la aplicación de nitrógeno mineral cambia la arquitectura de la raíz (Zhang y Forde 1999) y las condiciones fisiológicas de las plantas (Fernandes y Pereyra-Rossiello 1995), lo cual posteriormente podría influir diferencialmente sobre la comunidad endófitas. Por ejemplo, la aplicación de nitratos a la caña de azúcar (Peláez y col. 1994), y probablemente en otras plantas C4 (e.g., maíz), provoca una activación del enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa y por tanto una elevada tasa de fijación de CO₂ lo que consecuentemente resulta en un aumento en el flujo de malato. De esta manera, la elevación en

la concentración de malato en el interior de los tejidos de las plantas favorecería la proliferación de bacterias endófitas que usan eficientemente este ácido dicarboxílico (e.g., *Azospirillum*, *Herbaspirillum*) pero no la multiplicación de los endófitos que no usen o usen pobremente este ácido como fuente de carbono (e.g., *Acetobacter diazotrophicus*).

Los conocimientos sobre la interacción planta-bacteria endófitas son incipientes y se desconoce completamente las interacciones entre las comunidades endófitas. En la actualidad se sugiere que los endófitos, además de aportar algunos nutrientes a las plantas, e.g. nitrógeno (Boddey y col. 1995), parecen influir en el crecimiento de las mismas a través de la producción de fitohormonas tales como el ácido indol acético (Okon y Labandera 1994) y citoquininas (Holland 1997), así como por la remoción de productos de desecho, e.g., el metanol producido por la planta es consumido por las bacterias denominadas como PPFMs, Pink-Pigmented Facultative Methylophilic bacteria (Holland y Polacco 1992, Holland 1997). ¿Podría la acumulación de metanol en la planta, por cambios en la población de PPFMs, disminuir la población de otros endófitos? El panorama parece complicado y seguramente las interacciones múltiples. El estudio sistemático de las interacciones podrá dar la información necesaria para una mejor comprensión de las asociaciones planta-endófitos.

La estrategia de caracterización de los endófitos de maíz "rojo" consistió en evaluar a todas las cepas aisladas en su capacidad de reducir el acetileno a etileno y determinar la presencia de los genes estructurales de la nitrogenasa mediante ensayos de hibridación. Los resultados mostraron que aproximadamente el 50 % de las cepas aisladas con morfología colonial distinta poseen la habilidad de reducir el acetileno a etileno y muestran señal de hibridación con los genes *nifHDK*. Algunas de estas bacterias, por ejemplo los aislados No. 4 y No. 16, se encontraron en números superiores a 10^5 por gramo de tejido vegetal (Tabla 2), y el conjunto de la comunidad de diazótrofos cultivables por arriba de 10^6 por gramo de tejido vegetal. Por supuesto, la presencia de los diazótrofos en los tejidos internos de las plantas de maíz no indica que la fijación de nitrógeno se lleve a cabo en los mismos, pero el conocer de su presencia encausa la posibilidad de usarlos para que lleven a cabo este proceso en asociación con la planta.

Como fue mencionado en párrafos anteriores, los conocimientos sobre la comunidad de diazótrofos endófitos es aún incipiente, lo que es particularmente cierto para la comunidad

fijadora de nitrógeno asociada al maíz. Aún cuando en el presente trabajo se logró aislar y caracterizar algunos de los aislados (ver más adelante), algunos aspectos merecen consideración para lograr un mayor conocimiento de los diazótrofos que se encuentran en asociación endófitica con el maíz. Por ejemplo, en el aislado No. 14 aislado de plantas de maíz "rojo" se detectaron los genes *nifHDK* pero no la capacidad de reducir acetileno, mientras que la cepa No. 18 también aislada del maíz "rojo" que expresó ARA no mostró señal de hibridación. La falta de expresión de actividad reductora de acetileno por la cepa No. 14 puede significar que el medio de cultivo o las condiciones (e.g. concentración de oxígeno) para la detección de ARA no fueron las adecuadas para que se llevara a cabo esta actividad. En el caso de la cepa No. 18, la señal de hibridación negativa presume que la secuencia nucleotídica de la nitrogenasa de este microorganismo difiere grandemente de la nitrogenasa del microorganismo, *Rhizobium etli*, utilizado como sonda en el experimento. Este hecho resulta interesante debido a que señala la importancia de utilizar estrategias diferentes para la búsqueda y selección de fijadores de nitrógeno. Es muy probable que basándose solamente en una estrategia como ensayos de ARA o hibridación con los genes *nifHDK* se pierda la posibilidad de reconocer una cantidad considerable de bacterias diazótroficas. La detección de diazótrofos no cultivables se ha logrado a partir de raíces de arroz utilizando la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) y como blanco a los genes estructurales de la nitrogenasa (Ueda y col. 1995a, b), demostrándose una gran diversidad de diazótrofos asociados a la raíz. Sin embargo, aún utilizando estas estrategias no existe garantía para detectar algunos diazótrofos. Por ejemplo, *Streptomyces thermoautotrophicus* es una bacteria diazótropa que posee un sistema de fijación de nitrógeno poco usual y distinto al sistema de los diazótrofos descritos en la actualidad. La nitrogenasa de esta bacteria, una superóxido óxido reductasa (Ribbe y col. 1997), no reduce el acetileno a etileno y no muestra señal de hibridación con los genes *nifHDK* de *Klebsiella pneumoniae* (Gadkary y col. 1992).

Sobre la base de estas consideraciones nos parece necesario recurrir a procedimientos complementarios que permitan aislar y reconocer el mayor número de diazótrofos posibles. El uso de técnicas que involucran $^{15}\text{N}_2$ parece ser un método apropiado para reconocer diazótrofos cultivables. El empleo de medios "selectivos" que inhiban el crecimiento de bacterias de rápida multiplicación, e.g. enterobacterias, contribuiría seguramente al aislamiento

de diazótrofos de multiplicación mas lenta. La incorporación de diferentes estrategias permitirá en un futuro contar con un inventario mas completo de los diazótrofos asociados al maíz, así como tener mayores y mejores oportunidades para su uso en la agricultura.

Generalmente se acepta que el "inventario" actual de las especies bacterianas, incluyendo las fijadoras de nitrógeno, está incompleto. Se reconoce que muchas especies de bacterias no son cultivables bajo condiciones de laboratorio (Hugenholz y col. 1998, Dunbar y col. 1999) y que el uso de estrategias y medios de cultivos pueden favorecer el sobrecrecimiento de algunas especies que enmascaran o inhiben el crecimiento de otras. También se reconocen las limitaciones de la taxonomía clásica para la diferenciación de especies bacterianas, lo cual en los últimos años se ha superado con la incorporación de estrategias de biología molecular, mostrándose la existencia de mas de una especie dentro de especies "bien definidas" en el pasado. Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tipo I fue reclasificado en la especie bacteriana *Rhizobium etli* mediante el uso de herramientas moleculares (Segovia y col. 1993). También ha sido posible redefinir cepas que pertenecen a una misma especie bacteriana, las cuales no pueden ser diferenciadas a través de características fenotípicas pero que difieren a nivel genotípico, los denominados genomovares (Ursing y col. 1995). Por ejemplo, la definición de multiples genomovares dentro del complejo *Burkholderia cepacia* fue posible mediante el uso de distintos ensayos moleculares, además, entre estos genomovares se ha propuesto a *B. multivorans* como especie nueva (Vandamme y col. 1997). Las herramientas moleculares han servido no solo para redefinir especies dentro de una "especie ya existente", ya que hay casos en donde las especies de un género bacteriano pueden pasar a formar un género nuevo. Por ejemplo, *Pseudomonas cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli* y *P. gladioli* fueron transferidas al género *Burkholderia*, utilizando herramientas de biología molecular como homología ADN-ADN y análisis de la secuencia del gen ribosomal 16S (Yabuuchi y col. 1992).

Con el objetivo de identificar los endófitos fijadores de nitrógeno aislados de maíz "rojo" se eligió el uso de electroforesis de enzimas metabólicas para la agrupación y diferenciación de los endófitos (Figura 2). Algunos grupos incluyeron tanto cepas fijadoras como no fijadoras de nitrógeno. De acuerdo con las distancias genéticas entre los aislados diazótrofos del maíz "rojo" se puede observar la existencia de al menos 6 grupos bacterianos distintos, tomando en cuenta que los coeficientes de distancia genética mayores de 0.5 son considerados como el

límite para la separación de especies (Selander y col. 1985). Cabe mencionar que a distancias mayores de 0.5 no es posible distinguir claramente cuando se trata de especies o géneros distintos. La relación estrecha entre bacterias fijadoras y no fijadoras de nitrógeno que se muestra en la Figura 2 se ha observado también en otros géneros bacterianos como en el caso del género *Rhizobium*, fijador de nitrógeno, que mediante la comparación de la secuencia del gen ribosomal 16S se relaciona con bacterias del género *Agrobacterium* y *Brucella*, las cuales no poseen la capacidad intrínseca para fijar el nitrógeno atmosférico (Ludwig y col. 1998).

Diversas hipótesis han surgido para explicar la estrecha relación genética entre organismos fijadores y no fijadores de nitrógeno. Una de éstas es la transferencia lateral de información genética entre distintas bacterias. En diferentes experimentos se ha demostrado la transferencia artificial de los genes *nif* entre especies o géneros poco relacionados (Martínez-Romero y col. 1987), no obstante, es difícil probar que este evento haya jugando un papel determinante en la distribución de los genes *nif* existente en la actualidad (Young 1992). Se podría suponer que la fijación de nitrógeno es un atributo normal entre las bacterias, el cual fue perdido en el curso de la evolución en algunas especies que colonizaron ambientes con abundancia de nitrógeno fácilmente asimilable. Se piensa así simplemente porque la mayoría de las bacterias no han sido examinadas en este aspecto. Además, la actividad nitrogenasa no es una prueba que se realice rutinariamente al describir una nueva especie bacteriana (Young 1992), ni tampoco lo es el buscar las condiciones adecuadas en el laboratorio para que esta actividad se lleve a cabo. Por ejemplo, en la descripción reciente de la especie *Burkholderia kururiensis* no fue evaluada la capacidad de fijación de nitrógeno y consecuentemente no es considerada como diazótrofo (Zhang y col. 2000). En contraste la especie *B. brasilensis*, no reportada oficialmente, es considerada como fijadora de nitrógeno (Baldani y col. 1999). Sin embargo, de acuerdo con el análisis de la secuencia del gene ribosomal 16S DNA (Tabla 6, Figura 8), estas dos "especies" presentan un 99.9 % de similitud, lo que indica, a reserva de compararse con otros métodos, que se trata de la misma "especie". Esto habla de la falta de evaluación rutinaria para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno entre los taxos bacterianos.

Mediante distintas pruebas bioquímicas se determinaron los grupos bacterianos al que pertenecen la mayoría de las cepas fijadoras de nitrógeno aisladas del maíz "rojo". Los grupos identificados fueron *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* spp., *Azospirillum lipoferum* y

Burkholderia cepacia. Con el uso de pruebas genotípicas, entre éstas la comparación de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S, se determinó que las cepa No. 4 y No. 16 pertenecen al género *Burkholderia* en tanto que la cepa No. 24 al género *Enterobacter*. Como fue señalado anteriormente, con frecuencia el uso de pruebas fenotípicas no permite una clara diferenciación de cepas pertenecientes a especies distintas y claro ejemplo son las cepas No. 4 y No. 16 que fueron identificadas por estos métodos como *Burkholderia cepacia*. Aún cuando se ha reportado que *B. cepacia* tienen la capacidad de reducir acetileno (Bevivino y col. 1994), en general es reconocido que esta especie bacteriana no posee la habilidad de fijar nitrógeno (Gillis y col. 1995), sin embargo, se encuentra estrechamente relacionada con *B. vietnamiensis*, la cual es fijadora de nitrógeno (Gillis y col. 1995).

El aislamiento de cepas de los géneros *Enterobacter*, *Azospirillum* y *Klebsiella* no es sorprendente, considerando que se les ha encontrado asociadas con otras plantas de cultivo o silvestres (Gardner y col 1982, Reinhold y col. 1986, Mascarúa-Esparza y col. 1988, Bell y col. 1995). Sin embargo, el aislamiento de cepas del género *Burkholderia* reviste gran interés debido a su capacidad de fijar nitrógeno, así como por ser un grupo importante en la biodegradación de pesticidas (Haugland y col. 1990, Daubaras y col. 1996), por actuar como agentes de biocontrol (McLoughlin y col 1992, Hebbar y col. 1998) y por tratarse de aislados, según la secuencia parcial de los genes 16S rDNA (Figura 5), diferentes a *Burkholderia vietnamiensis*. Conociendo la gran diversidad de especies dentro del género *Burkholderia*, alrededor de 22 (Yabuuchi y col. 1992, Urakami y col. 1994, Gillis y col. 1995, Vandamme y col. 1997), y a la existencia de una sola especie fijadora en este género, las cepas aisladas del maíz "piedra blanca" se analizaron mediante distintas pruebas bioquímicas y análisis de patrones de restricción del gen ribosomal 16S (ARDRA) para la búsqueda de cepas de *Burkholderia* diazótrofes. Los resultados de las pruebas bioquímicas mostraron que los aislados diazótrofes pertenecen a *Burkholderia*. Una relación mas fina de estos aislados se obtuvo a través del uso de ARDRA. Tomando en cuenta la similitud observada entre las cepas de referencia de *B. cepacia* y *B. vietnamiensis* con las cepas diazótrofes endófitas del maíz "piedra blanca" se podría suponer que éstas representan especies nuevas de diazótrofes del género *Burkholderia*. Las cepas No. 4 y No. 16, aisladas de plantas de maíz "rojo", y las cepas No. 231, No. 249, No. 262 y No. 273 parecen constituir una especie nueva, en tanto que la cepa No. 293 constituiría otra diferente. Sin

embargo, para definir la posición taxonómica correcta de estas cepas como especies nuevas de bacterias diazotrofas dentro del género *Burkholderia* se requiere de un análisis más amplio, en el cual se deben incluir ensayos de homología ADN-ADN, utilizando cepas tipo de este género bacteriano para su comparación. No obstante la importancia de realizar ensayos de homología ADN-ADN es posible anticipar que las cepas No. 16 y No. 273 representan una nueva especie dentro del género *Burkholderia*, diferente a las fijadoras de nitrógeno, *B. vietnamiensis* y *B. brasilensis* sobre la bases del análisis comparativo de la secuencia total del gen ribosomal 16S (Figura 8). Niveles de similitud menores al 97 % (Stackebrandt and Goebel 1994) son evidencia suficiente para definir nuevas especies bacterianas. En el análisis comparativo ninguna de las especies reconocidas de *Burkholderia* presenta una similitud mayor al 97 % con las cepas No. 16 y 273, observándose que la mayor similitud (96.3 %) de estas cepas se presenta con *B. graminis* (Tabla 6). La detección de nuevas especies de bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia* contribuye en gran medida al conocimiento sobre la diversidad de diazotrofos en este género bacteriano. Además, el aislamiento de estas cepas resulta de gran interés, ya que podrían ser útiles a nivel agrícola debido a que se ha descrito que algunas cepas del género *Burkholderia* son capaces de promover el crecimiento vegetal (McLoughlin y col. 1992, Hebbar y col. 1998) o degradar compuestos complejos del tipo de los herbicidas (Haugland y col. 1990, Daubaras y col. 1996) los cuales pueden persistir por períodos muy largos en el suelo. Resultaría interesante analizar si los aislados No. 16 y No. 273 poseen la capacidad para degradar algún compuesto complejo, ya que estos aislados, como se puede observar en el árbol filogenético de la Figura 8, se encuentran relacionados con algunas cepas (e.g. *Burkholderia* sp. N2P5) que poseen la capacidad de degradar compuestos tóxicos (Mueller y col. 1997).

Durante la última década ha existido un interés creciente en el estudio de las bacterias endófitas (Fuentes-Ramírez y col. 1993, Reinhold-Hurek y col. 1993a, Palus y col. 1996), y su interacción con las plantas hospederas (Egener y col. 1998, Fuentes-Ramírez y col. 1999). Se ha considerado que si las bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno llevan a cabo esta actividad en la planta, entonces el nitrógeno fijado sería excretado directamente en el interior de la misma, con el consecuente aprovechamiento del nitrógeno y sin la competencia por este nutriente como ocurre en el ambiente rizosférico (Boddey y Dobereiner 1995). Otras actividades de la comunidad bacteriana endófitas, e.g., la síntesis de fitohormonas, podrían

ejercer efectos favorables en la promoción del crecimiento de las plantas. Sin embargo, el uso de cepas bacterianas como inoculantes que promuevan el desarrollo vegetal requiere de mayores conocimientos sobre la interacción planta-microorganismo, ya que la capacidad de una cepa particular para colonizar las raíces de las plantas es uno de los factores limitantes en este tipo de aplicaciones (Weller 1988).

Con el objetivo de evaluar el papel que ejercen los endófitos fijadores de nitrógeno se analizó la capacidad de las 13 cepas, aisladas del maíz "rojo", para establecerse en los tejidos internos de dos variedades de maíz (una criolla y otra híbrida), así como la capacidad para promover el crecimiento de las plantas.

Los resultados revelaron que las cepas difieren en su capacidad para colonizar el ambiente endófito, siendo esta capacidad dependiente de la variedad de la planta (Tabla 8). Estos resultados son similares a los descritos en la interacción trigo-*Azospirillum brasilense* (Assmus y col. 1995), observándose diferencias en la capacidad colonizadora de la superficie y los tejidos internos de la raíz, dependiendo de la cepa inoculada. Es importante mencionar que la capacidad de colonización por una cepa particular no es una característica única que prediga efectos benéficos sobre el crecimiento de las plantas, pero es un punto de inicio fundamental para llevar a cabo ensayos dirigidos a la selección de cepas bacterianas con capacidad para promover el crecimiento vegetal o como agentes de biocontrol de los microorganismos causantes de enfermedades de la raíz (Scher 1983).

Con base en la capacidad de las cepas para colonizar el interior de las plantas de maíz (Tabla 8), fueron seleccionadas las cepas fijadoras de nitrógeno No. 12ch (*Enterobacter cloacae*), No. 16 (*Burkholderia* sp) y No. 24 (*Enterobacter cloacae*) para evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de dos variedades, el criollo "arrocillo" y el híbrido B-555. La respuesta a la inoculación bacteriana resultó variable dependiendo de la cepa, la variedad de maíz y la adición de nitrógeno mineral (Tablas 9, 10 y 11). Es importante destacar que las plantas de maíz "arrocillo" disminuyeron su crecimiento en la mayoría de los tratamientos, respecto a las testigo, al ser inoculadas con las cepas No. 12ch y No. 24, pero no con la cepa No. 16, excepto en el tratamiento con bajo nitrógeno. La mejor respuesta a la inoculación se observó con el maíz B-555, siendo el crecimiento de las plantas, en lo general, estimulado significativamente por las tres cepas evaluadas. Estos resultados evidencian que la capacidad de colonización de una cepa particular no es requisito único para seleccionar cepas que

promuevan el crecimiento de las plantas. También reflejan la necesidad de llevar a cabo la selección de cepas como se ha observado en las asociaciones *Rhizobium*-leguminosas (Kremer y Peterson 1982, Halliday 1984) y *Azospirillum*-gramíneas (Paredes-Cardona y col. 1988, Caballero-Mellado y col. 1992).

Tomando en cuenta que no existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de nitrógeno entre las plantas de maíz B-555 inoculadas con las cepas fijadoras de nitrógeno y las plantas testigo, y que el incremento en el peso seco de las plantas inoculadas sólo se presenta con dosis de mediana y alta fertilización, respecto a las testigo, consideramos que el mecanismo responsable del efecto observado no es la fijación de nitrógeno. Este resultado confirma que la capacidad de un diazótrofo para colonizar los tejidos de las plantas no significa que la fijación de nitrógeno sea expresada en los mismos. Considerando que las cepas No. 12ch y No. 24 producen compuestos indólicos en medio de cultivo (Tabla 12, Figuras 11 y 12), podría sugerirse la síntesis de auxinas como el mecanismo responsable de la mayor proliferación de las raíces en las plantas de maíz inoculadas con estas cepas y como consecuencia un crecimiento mayor de la parte aérea (Tabla 16). Esta propuesta ha sido ampliamente analizada para explicar los incrementos en el crecimiento y rendimientos de muy diversas plantas inoculadas con *Azospirillum* (Caballero-Mellado y col. 1992, Okon y Labandera 1994). Sin embargo, debido a que la cepa No. 16 de *Burkholderia* sp. no es capaz de sintetizar compuestos auxínicos en medios de cultivo, consideramos que el mayor crecimiento de las plantas inoculadas con esta cepa es debido al efecto producido por algún otro tipo de molécula excretada por esta bacteria. Entre otras posibilidades, el lumicromo producido por la cepa No. 16 (D. Phillips y E. Martínez-Romero, com. pers.) podría ser la molécula responsable del mayor crecimiento observado en las plantas inoculadas, ya que se ha observado que *Sinorhizobium meliloti* mediante la producción de este compuesto promueve el crecimiento de plantas de alfalfa (Phillips y col. 1999).

Los incrementos observados en el peso seco de las plantas de maíz debido a la inoculación con las cepas No. 12ch, No. 16 y No. 24, muestran que las bacterias poseen mecanismos muy diversos mediante los cuales pueden favorecer el crecimiento de una planta. En este trabajo se demostró indirectamente que el incremento en el crecimiento de las plantas de maíz no se debió a la fijación biológica de nitrógeno y por tanto la síntesis de auxinas y particularmente la producción de lumicromo parecen resultar de gran interés desde el punto de

vista agrícola.

La búsqueda de bacterias fijadoras de nitrógeno endófitas que promuevan el desarrollo de las plantas no leguminosas a través de este mecanismo es un trabajo arduo en el cual se obtienen frecuentemente resultados infructuosos. No obstante, durante el desarrollo de este proyecto se logró obtener información importante sobre las bacterias endófitas asociadas con el maíz, lo cual, puede ser de gran utilidad para estudios futuros.

CONCLUSIONES

La detección de la actividad nitrogenasa y el aislamiento de bacterias diazótrofas endófitas depende fuertemente del estado de crecimiento de la planta de maíz. Además, el establecimiento de las bacterias diazótrofas en el interior de la planta y consecuentemente su aislamiento, depende de la bacteria, la variedad de maíz y la presencia de nitrógeno mineral.

La identificación de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Azospirillum* y *Burkholderia*, muestra que las bacterias pueden encontrarse en diferentes habitats, incluyendo el ambiente endofítico, pero también demuestra que las estrategias para el aislamiento bacteriano son importantes para el reconocimiento tanto de las bacterias conocidas como de nuevas especies, como lo fue el caso de las cepas diazótrofas de *Burkholderia*. Aunado a lo anterior, la estrategia para la detección de cepas diazótrofas es también un punto de vital importancia para lograr el reconocimiento de un número mayor o menor de bacterias diazótrofas.

La identificación de nuevas especies de bacterias dentro de *Burkholderia* demuestra la importancia de incluir estrategias moleculares para llevar a cabo la caracterización adecuada de un aislado bacteriano. Es probable que basándose solamente en la caracterización fenotípica el hallazgo de especies nuevas de *Burkholderia* diazótrofas no hubiera sido posible.

La asociación de bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* y fijadoras de nitrógeno con el maíz resulta de interesante puesto que se ha descrito que cepas no fijadoras de nitrógeno pertenecientes a este género promueven el desarrollo de las plantas, poseen la habilidad para degradar pesticidas y son útiles en el control biológico de agentes fitopatógenos.

Los ensayos de inoculación de maíz con algunas de las cepas aisladas, de los géneros *Enterobacter* y *Burkholderia*, promovieron el desarrollo de las plantas, el cual no puede atribuirse a la fijación biológica de nitrógeno. La producción de compuestos auxínicos o la síntesis de lumicromo pudieran ser los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento observado. Los mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden promover el crecimiento vegetal son muy diversos, lo cual se ha demostrado una vez más con este trabajo.

Indudablemente, el estudio de bacterias diazótrofas del maíz no implica solamente la identificación de géneros conocidos o la descripción de nuevas especies, implica también el contar con estrategias alternativas al uso de agroquímicos que dañan el medio ambiente y la salud y también el utilizar a los microorganismos como una fuente de recursos renovables.

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

Considerando que la validación taxonómica de una especie bacteriana requiere de un análisis fenotípico y genotípico de un número importante de cepas, será esencial llevar a cabo el aislamiento de un mayor número de cepas para definir la posición taxonómica del grupo de fijadoras de nitrógeno de *Burkholderia* asociadas al maíz.

Considerando que las características de cultivo definen el aislamiento de ciertos grupos o especies bacterianas, será de gran valor el desarrollar estrategias que permitan aislar selectivamente cepas fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia*, con el fin de conocer la diversidad de especies, así como la diversidad genética intraespecie y su distribución entre plantas estrechamente relacionadas, e.g. teocintle, y entre algunas de interés agrícola.

Considerando que el grupo de cepas fijadoras de nitrógeno del género *Burkholderia* asociadas con el maíz se encuentran relacionadas filogenéticamente con cepas de *Burkholderia* conocidas como agentes de biocontrol y con cepas degradadoras de pesticidas, será de interés evaluar si estas capacidades son expresadas por el grupo endófito fijador de nitrógeno detectado en este estudio.

Considerando que la única cepa analizada del grupo fijador de nitrógeno del género *Burkholderia* es capaz de promover el crecimiento de plantas de maíz fertilizadas con nitrógeno mineral, resulta de interés evaluar si ésta es una capacidad intrínseca de la especie. También será interesante elucidar el mecanismo responsable de la promoción del crecimiento de las plantas y evaluar el papel del nitrógeno en la expresión de tal mecanismo.

Considerando el habitat endofítico de las cepas del género *Burkholderia* aisladas en este trabajo sería interesante conocer su perfil de distribución en el interior de la planta utilizando para este fin cepas modificadas genéticamente, es decir, haciendo uso de genes reporteros.

ANEXO

Medios de cultivo

LB: Peptona caseína 10g, extracto de levadura 5g, NaCl 10g, agua 1l.

LGI: Azúcar 20g, K_2HPO_4 0.2g, KH_2PO_4 0.6g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 20mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10g, azul de bromotimol 25mg, verde bromocresol 25mg, extracto de levadura 50mg, agua 1l, pH 6.5. Para placas se utilizaron 13g de agar y para viales 2.3g.

NFb: Ac. málico 5g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 10mg, NaCl 0.1g, $CaCl_2$ 20mg, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 4mg, azul de bromotimol 25mg, KOH 4.8g, agua 1l, pH 6.8. Para placas se utilizaron 13g de agar y para viales 2.3g.

Medio A: Dextrosa 5g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 20mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 40mg, K_2HPO_4 0.5g, azul de bromotimol 25mg, $CaCl_2$ 10mg, agua 1l, pH 7. Para placas se utilizaron 1g de agar y para viales 2.3g.

Rojo Congo: Ac. málico 5g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, extracto de levadura 0.5g, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 15mg, KOH 4.8g, rojo congo 40mg, pH 6.8, agar 13g.

MESMA: Extracto de levadura 2.7g, dextrosa 2.7g, manitol 1.8g, MES 4.4g, K_2HPO_4 4.81g, KH_2PO_4 0.65g, azul de bromotimol 25mg, agua 1l, pH 6.6, agar 13g.

Medio de cultivo para extracción de compuestos indólicos: Ac. succínico 2.5g, NaCl 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, $CaCl_2$ 2mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10mg, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 2mg, NH_4Cl 1g, K_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 4g, triptofano 0.1g, fructosa 5g, pH 6.

Medios de cultivo para pruebas bioquímicas

Citrato de Simmons: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, NaCl 5g, K_2HPO_4 1g, citrato de sodio 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, azul de bromotimol 80mg, agua 1l, pH 6.9, agar 13g.

Caldo triptona: Triptona 10g, agua 1l.

Medio gelatina nutritiva: Extracto de levadura 3g, peptona 5g, gelatina 120 g, agua 1l, pH 6.8

Caldo Rojo Metilo / Voges Proskauer: Peptona 7g, dextrosa 5g, K_2HPO_4 5g, agua 1l, pH 6.9

Reactivos para pruebas bioquímicas

Indicador Rojo Metilo: Rojo metilo 0.1g, etanol 95 % 300ml, agua 200ml.

Solución alfa naftol: Alfa naftol 5g, agua 100ml.

Tinción de Gram (método modificado de Hucker): a) Solución A: Cristal violeta 2g, etanol 95% 20ml. Solución B: Oxalato de amonio 0.8g, agua 80ml, mezclar A y B. b) Colorante de contraste: Safranina O 0.25g, etanol 95% 20ml, agua cbp 100ml. c) Lugol: Yoduro de potasio 10%, yodo 5%.

Solución nutritiva para plantas (mg/l)

K_2HPO_4 54, KH_2PO_4 109, NaCl 12, CaCl_2 344, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 185, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, H_3BO_3 1, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1, Na_2MoO_4 0.03.

Reactivos para biología molecular

Buffer tris-acetatos: Tris base 4.84g, ácido acético glacial 1.142ml, EDTA 0.5 M 2ml, agua 1l, pH 8.

Solución de depurinización: HCl 0.25 M.

Solución de desnaturalización: NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M.

Solución 2 x SSC: NaCl 0.3 M, citrato de sodio 0.03 M, pH 7

Fórmula para actividad reductora de acetileno (ARA)

$\text{nM Etileno} = \text{U. área} \times 2 \times 1.76 \times 10^{-4} \times \text{Vol. de gas inyectado al cromatógrafo} \times \text{Vol. gas en el vial} / \text{horas de incubación con acetileno.}$

U. área = área bajo la curva. 2 = factor de atenuación. 1.76×10^{-4} = factor del cromatógrafo.

Número más probable (NMP)

El análisis se llevó a cabo mediante el uso de las tablas de McCrady (Dobereiner y col. 1995).

Cuenta por plaqueo de diluciones seriadas

Para cultivo: $\text{Conteo de células en la placa} \times \text{factor de dilución} \times 10 = \text{UFC /ml}$

Para células adheridas al : $\text{Conteo de células en la placa} \times \text{factor de dilución} \times 10 / 5 = \text{UFC /ml}$

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Amann, R., W. Ludwig and S. Karl-Heinz. 1994. Identification of uncultured bacteria: A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60: 360-365.
- Ashbolt, N.J. and P.A. Inkerman. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealbug, *Saccharococcus sacchari* and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 701-712.
- Assmus, B., P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence and A. Hartmann. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotides probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1013-1019.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and sons, inc., New York.
- Balandreau, J. 1980. Microbiology of the association. *Can. J. Microbiol.* 29:851-859.
- Baldani, J.I., V.M. Reis, V.L.D. Baldani and J. Dobreiner. 1999. Biological Nitrogen Fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs. *International Congress on Nitrogen Fixation, Brasil, Abs. L014.*
- Barraquio, W.L., L. Revilla and J.K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil* 194: 15-24.
- Beadle, G.W. 1980. El origen del maíz. *Investigación y Ciencia* 41: 84-92.
- Bell, C.R., G.A. Dickie, W.L.G. Harvey and J.W.Y.F. Chan. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41: 46-53.
- Bevivino, A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M.V. Carusi, M. del Gallo and P. Visca. 1994. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiol.* 140: 1069-1077.
- Boddey, R.M. and J. Dobreiner. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil* 108: 53-65.
- Boddey, R.M., O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. de Olivares, V.L.D. Baldani and J. Dobreiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil.* 174: 195-209.
- Bremner, J.M. 1965. Total nitrogen. In C.A. Black (ed.). *Methods of soil analysis. Part 2.* Agronomy 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, pp. 1149-1178.

- Bull. A.T., M Goodfellow and J.H. Slater. 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Ann. Rev. Microbiol.* 46: 219-252.
- Burbage, D.A., M. Sasser and R.D. Lumsden. 1982. A medium selective for *Pseudomonas cepacia*. *Phytopathol.* pp. 706.
- Caballero-Mellado, J., M.G. Carcaño-Montiel and M.A. Marcarúa-Esparza. 1992. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. *Symbiosis* 13: 243-253.
- Caballero-Mellado, J., L.E. Fuentes-Ramírez, V.M. Reis and E. Martínez-Romero. 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3008-3013.
- Caballero-Mellado, J.M., E. Martínez-Romero, P. Estrada de los Santos and L.E Fuentes-Ramírez. 1998. Maize colonization by *Acetobacter diazotrophicus*. En C. Elerich et al. (eds.) *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 381-382.
- Caballero-Mellado, J. and E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26: 111-121.
- Caesar, A.J. and T.J. Burr. 1987. Growth promotion of apple seedlings and rootstocks by specific strains of bacteria. *Phytopathol.* 77: 1583-1588.
- Cavalcante, V.A. and J. Dobreiner. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108:23-31.
- Christiansen-Weniger, C. 1998. Edophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 55-76.
- Costacurta, A. and J. Vanderleyden. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 21: 1-18.
- Crozier, A., P. Arruda, J.M. Jasmin, A.M. Monteiro and G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2833-2837.
- Curl, E.A. and B. Truelove. 1986. *The rhizosphere*. Springer-Verlag (Ed.), Berlin Heidelberg, Germany.
- Daubaras, D.L., C.E. Danganan, A. Hubner, R.W. Ye, W. Hendrickson and A.M. Chakrabarty. 1996. Biodegradation of 2,4-trichlorophenoxyacetic acid by *Burkholderia cepacia* strain AC1100: evolutionary insight. *Gene* 179: 1-8.
- Devender, K.J. and D.G. Patriquin. 1984. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. *Can. J. Microbiol.* 31: 206-210.

- DiCello, F., A. Bevivino, L. Chiarini, R. Fani, D. Paffetti, S. Tabacchini and C. Dalmastri. 1997. Biodiversity of *Burkholderia cepacia* populations isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4485-4493.
- Dixon, R., Q. Cheng, G.F. Sheng, A. Day and M. Dowson-Day. 1997. *Nif* gene transfer and expression in chloroplasts: Prospects and problems. *Plant and Soil* 194:193-203.
- Dobereiner, J. 1980. Forage grasses and grain crops. En F.J. Bergersen (ed.), *Methods for evaluating biological nitrogen fixation*. John Willey and Sons, Chichester, United Kindom, pp. 535-555.
- Dobereiner, J., V.M. Reis, M.A. Paula and F. Olivares. 1993. Endophytic bacteria in sugar cane, cereals and tuber plants. En R. Palacios et al. (eds.) *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 671-676.
- Dobereiner, J., V.L.D. Baldani e J.I. Baldani. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA, Brasil.
- Dunbar, J., S. Takala, S.M. Barns, J.A. Davis and Ch.R. Kuske. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1662-1669.
- Dyhuizen, D.E. 1998. Santa Rosalia revisited: Why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 25-33.
- Ela, S.W., M.A. Anderson and W.J. Brill. 1982. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 70: 1564-1567.
- Egener, T., T. Hurek and B. Reinhold-Hurek. 1998. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotrophicus, on rice roots. *Mol. Plant Microb. Interact.* 11: 71-75.
- Ellis, R.J., I.P. Thompson and M.J. Bailey. 1999. Temporal fluctuations in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 345-356.
- Falik, E., Y. Okon, E. Epstein, A. Goldman and M Fischer. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilensis*-inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21: 147-153.
- Fernandes, M.S. and R.O. Pereyra-Rossiello. 1995. Mineral nutrition in plant physiology and plant nutrition. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 111-148.

- Ferreira, A.C., K. Cozzolino, A.R.V. Carvalho and J. Dobereiner. 1995. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. International symposium on sustainable agriculture for the tropics the role of biological nitrogen fixation. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. Libro de resúmenes pp. 210-211.
- FIRA. Fideicomisos instituidos en relación con la agricultura en el Banco de México. 1998. Boletín informativo. 30: 1-87.
- Fisher, P.J., O. Petrini and H.M. Lappin Scott. 1992. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). New Phytologist 122: 299-305.
- Fuentes-Ramírez, L.E., T. Jiménez-Salgado, I.R. Abarca-Ocampo and J. Caballero-Mellado. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. Plant and Soil 154: 145-150.
- Fuentes-Ramírez, L.E., J. Caballero-Mellado, Jorge Sepulveda and E. Martínez-Romero. 1999. Colonization of sugar cane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. FEMS Microbiol. Ecol. 29: 117-128.
- Gadkary, D., G. Mörsdorf and O. Meyer. 1992. Chemolithoautotrophic assimilation of dinitrogen by *Streptomyces thermoautotrophicus* UBT1: Identification of an unusual N₂-fixing system. J. Bacteriol 174: 6840-6843.
- Gagné, S., C.R. Richard, H. Rosseau and H. Antoun. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. Can. J. Microbiol. 33: 996-1000.
- Gardner, J.M., A.W. Feldman and R.M. Zablotowicz. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1335-1342.
- Gillis, M., T. Van Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbar, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin and M.P. Fernández. 1995. Poliphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 274-289.
- Graham, J.H. 1986. Citrus mycorrhizae: potential benefits and interactions. HortScience 21: 1302-1306.
- Graham, P.H., J. Bale, D. Baker, M. Fried, J. Roskoski, K.T. Mackay and E. Craswell. 1988. The contribution of biological nitrogen fixation to plant production: an overview of the symposium and its implications. Plant and Soil 108: 1-6.

- Gritoni, A., M. Bazzicalupo, C. Di Serio, S. Fancelli, R. Fani. 1995. Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length polymorphism of the 16S rDNA and of the histidine operon. FEMS Microbiol. Lett. 127: 85-91.
- Halliday, J. 1984. Principles of *Rhizobium* strain selection. En Biological Nitrogen Fixation. Ed. Martin Alexander. Plenum Publishing Corporation. pp. 155-171.
- Han, S.O. and P.B. New. 1998. Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. Microbiol. Ecol. 36: 193-201.
- Haughland, R., D.J. Schlemm, R.P. Lyons III, P.R. Sferri and M. Chakrabarty. 1990. Degradation of chlorinated phenoxyacetic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1357-1362.
- Hebbar, K.P., M.H. Martel and T. Heulin. 1998. Suppression of pre- and postemergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. Eur. J. Plant Pathol. 104: 29-36.
- Holland, M.A. and J.P. Polacco. 1994. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45:197-209.
- Holland, M.A. 1997. Occam's razor applied to hormonology. Plant. Physiol. 115: 865-868.
- Hugenholtz, P., B.M. Goebel and N.R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. J. Bacteriol. 180: 4765-4774.
- Hurek, T., B. Reinhold-Hurek, M. Van Montagu and E. Kellenberger. 1994. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. J. Bacteriol. 176: 1913-1923.
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 1998. Censo Agropecuario.
- Isopi, R., P. Fabbri, M. del Gallo and G. Puppi. 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench ssp *bicolor* with vesicular arbuscular mycorrhizas and *Acetobacter diazotrophicus*. Symbiosis 18: 43-55.
- Jacobs, M.J., W.M. Bugbee and D.A. Gabrielson. 1985. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. Can. J. Bot. 63: 1262-1265.
- James, E.K., V.M. Reis, F.L. Olivares, J.I. Baldani and J. Dobereiner. 1994. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Bot. 45: 757-766.
- James, E.K. and F.L. Olivares. 1997. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 77-119.

- Jimenez-Saigado, T., L.E. Fuentes-Ramirez, A. Tapia-Hernandez, M.A. Mascarúa-Esparza, E. Martínez-Romero and J. Caballero-Mellado. 1997. *Coffe arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3676-3683.
- Kado, I. 1992. Plant pathogenic bacteria. En A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.H. Schleifer (ed.), *The prokariotes. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications*, vol. I. Spriger-Verlag, New York, N.Y. pp. 660-662.
- Kirchhof, G., V.M. Reis, J.I. Baldani, B. Eckert, J. Dobereiner and A. Hartmann. 1997. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. *Plant and Soil* 194: 45-55.
- Kloepper, J.W., B. Schippers and P.A.H.M. Bakker. 1992. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathol.* 82: 726-727.
- Kremer, R.J. and H.L. Peterson. 1982. Isolation, selection and evaluation of *Rhizobium* under controlled conditions. *Soil Sci. Plant Anal.* 13: 749-774.
- Ludwig, W., R. Amann, E. Martínez-Romero, W. Schönhuber, S. Bauer, A. Neef and K.H. Schleifer. 1998. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant and Soil* 204:1-19.
- MacFadin, J.F. 1990. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana, México.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. *Biology of Microorganisms*. Ed. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Martínez-Romero, E., R. Palacios and F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* 169: 2828.
- Mascarúa-Esparza, M.A., R. Villa-González and J. Caballero-Mellado. 1988. Acetylene reduction and indole acetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceus plantas. *Plant and Soil* 106: 91-95.
- Mateos, P.F., J.I. Jiménez-Zurdo, J. Chen, A.S. Squartini, S.K. Haack, E. Martínez-Molina, D.H. Hubbell and F.B. Dazzo. 1992. Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1816-1822.
- Mavingui, P., G. Laguerre, O. Berge and T. Heulin. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymixa* in soil and in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1984-1903.
- McInroy, J.A. and J.W. Kloepper. 1995a. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342.

- McInroy, J.A. and J.W. Kloepper. 1995b. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Can. J. Microbiol.* 41: 895-901.
- McLoughlin, T.J., J.P. Quinn, A. Betterman and R. Bookland. 1992. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1760-1763.
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* 101: 20.
- Mishagi, I.J. and C.R. Donndelinger. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathol.* 80: 808-811.
- Morett, E., S. Moreno, G. Espín. 1988. Transcription analysis of the three *nifH* genes of *Rhizobium phaseoli* with gene fusions. *Mol. Gen. Genet.* 213: 499-504.
- Mueller, J.G., R. Devereux, D.L. Santavy, S.E. Lantz, S.G. Willis and P.H. Pritchard. 1997. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie van Leeuwenhoek.* 71: 329-343.
- Mundt, J.O. and N.F. Hinkle. 1976. Bacteria within ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694-698.
- Muthukumarasamy, R. 1999. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biol. Fertil. Soils* 29: 157-164.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 76: 5269-5273.
- Okon, Y. and C.A. Labandera. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26: 1591-1601.
- Oliver, J.D., L. Nilsson and S. Kjelleberg. 1991. Formation of noculture *Vibrio vulnificus* cells and its relationships to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2640- 2644.
- Olivares, F.L., V.L. D. Baldani, V.M. Reis, J.I. Baldani and J. Dobereiner. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biol. Fertil. Soils* 21: 197-200.
- Olivares, F.L., E.K. James, J.I. Baldani and J. Dobereiner. 1997. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* 135: 723-737.
- Palus, J.A., J. Borneman, P.W. Ludden and E.W. Triplett. 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Ittis and Doebley. *Plant and Soil* 186: 135-142.

- Paredes-Cardona, E., M. Carcaño-Montiel, M.A. Mascarua-Esparza and J. Caballero-Mellado. 1994. Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30: 351-355.
- Pelaez-Abellan, I., R. de Armas-Urguiza, M.H. Valadier and M.L. Champigny. 1994. Short-term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugar cane cultivars differing in their biomass production. Phytochem. 36: 819-823.
- People, M.B., D.F. Herridge and J.K. Ladha. 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen fixation for sustainable agricultural production? Plant and soil 174: 3-28.
- Phillips, D.A., C.M. Joseph, G.P. Yang, E. Martínez-Romero, J.R. Sanborn and H. Volpin. 1999. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. Proc. Nat. Ac. Sci. 96: 12275-12280.
- Pimentel, J.P., F. Olivares, R.M. Pitard, S. Urquiaga, F. Akiba and J. Dobereiner. 1991. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropediense*. Plant and Soil 137:61-65.
- Pirozynski K.A. and Y. Daplé. 1989. Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. Symbiosis 7: 1-36.
- Quispel, A. 1992. A search of signals in endohytic microorganisms. In Molecular signals in plant-molecular communications. Verma, D.P.S. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 471-492.
- Reinhold, B., T. Hurek, E.G. Niemann and I. Fendrik. 1986. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different roots zones of kallar grass. Appl. Environ. Microbiol. 52: 520-526.
- Reinhold, B. and T. Hurek. 1988. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to kallar grass association. Plant and Soil 110: 259-268.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters and J. de Ley. 1993a. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth], and description of two species, *Azoarcus inidigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 43: 574-584.
- Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Claeysens and M. van Montagu. 1993b. Cloning, expression in *Escherichia coli* and characterization of cellulolytic enzymes of *Azoarcus* sp., a root-invading diazotrophs. J. Bacteriol. 175: 7056-7065.
- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998a. Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends in Microbiology. 6: 139-144.

- Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek. 1998b. Interactions of gramineous plant with *Azospirillum* spp. and their identification, localization and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 29-54.
- Rennie, R.J., J.R. Freitas, P. Ruschel and P.B. Vose. 1982. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane (*Sacharum* sp.) *Can. J. Microbiol.* 28: 462-467.
- Ribbe, M., D. Gaskary and O. Meyers. 1997. N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272: 26627-26633.
- Rodríguez-Cáceres, E.A. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 990-991.
- Ruppel, S., Ch. Hecht-Buchholz, R. Remus, U. Ortmann and R. Schmelzer. 1992. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy. *Plant and Soil.* 145: 261-273.
- Scher, F.M., J.S. Ziegler and J.W. Kloepper. 1983. A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can. J. Microbiol.* 30: 151-157.
- Schultze, M., E. Kondorosi, P. Ratet, M. Buiré and A. Kondorosi. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. of Cytol.* 156: 1-175.
- Schultze, M. and A. Kondorosi. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Ann. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Segonds, Ch., T. Heulin, N. Marty and G. Chabanon. 1999. Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2201-2208.
- Segovia, L., J.P.W. Young and E. Martinez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 374-377.
- Selander, R.K., R.M. McKinney, T.S. Whittam, W.F. Bibb, D.J. Brenner, F.S. Nolte and P.E. Pattison. 1985. Genetics structure of populations of *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 163: 1021-1037.
- Selander, R.K., D.A. Caugant, H. Ochman, J.M. Musser, M.N. Gilmour and T.S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial populations genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873-884.

- Smith, K.P., J. Handelsman and R.M. Goodman. 1999. Genetic basis in plants for interactions with disease suppressive bacteria. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 96: 4786-4790.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Stackebrandt, E. and B.M. Goebel. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 816-849.
- Sturz, A.V. 1995. The role of endophytic bacteria during seed decay and potato tuberization. *Plant and Soil* 175: 257-263.
- Tang, R.W. and J. Bonner. 1947. The enzymatic inactivation of indol acetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* 13: 11-25.
- Tapia-Hernández, T., M.R. Bustillos-Cristales, T. Jiménez-Salgado, J. Caballero-Mellado and L.E. Fuentes-Ramírez. 2000. Natural edophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial. Ecology*. En prensa.
- Torsvik, V., J. Goksoyr and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782-787.
- Triplett, E.W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant and Soil.* 186: 29-38.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguchi. 1995a. Remarkable N₂-fixing bacteria diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* 177: 1414-1417.
- Ueda, T., Y. Suga, N. Yahiro and T. Matsuguchi. 1995b. Genetic diversity of N₂-fixing bacteria associated with rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifD* library. *Can. J. Microbiol.* 41: 235-240.
- Urakami, T., Ch. Ito-Yoshida, H. Araky, T. Kijima, K.I. Suzuki and K. Komogata. 1994. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 235-245.
- Ursing, J.B., R.A. Rosselló-Mora, E. García-Valdés and J. Lalucat. 1995. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 604.

- Vandamme, P., B. Hoimes, M. Vandanneyt, T. Chenye, B. H. Ste. R. Corman, H. Renets, S. Lauwers, M. Gillis, K. Kersters and J.R.W. Govan. 1997. Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal for *Burkholderia multivorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 1188-1200.
- van Peetr, R., H.L.M. Punte, L.A. de Weger and B. Schippers. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere Pseudomonads in relation to their colonization of roots. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2462-2470.
- Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer and K.H. Schleifer. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1520-1525.
- Weber, O.B., K.R.S. Teixeira, G. Kirchhof, J.I. Baldani and J. Döbereiner. 1995. Occurrence of endophytic diazotrophic bacteria in pineapple (*Ananas* sp.) and banana (*Musa* sp.). International Symposium on Sustainable Agriculture for the tropics the role of Biological Nitrogen Fixation Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. Libro de resúmenes pp. 238-239.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26:379-407.
- Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplifications for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- White, S. and J. Doebley. 1998. Of genes and genomes and the origin of maize. Trends in Genetics. 14: 327-332.
- Wilson, D. 1993. Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind. Oikos 68: 379-384.
- Wilson, D. 1995. Endophyte: the evolution of a term and clarification of its use and definition. Oikos 73: 274-276.
- Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 36: 1251-1275.
- Yanni, Y.G., R.Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Phillip-Hollingsworth, G. Orgamibide, F. Bruijn, J. Stoltzufs, D. Buckley, T.M. Schimdt, P.F. Mateos, F.K. Ladha and F.B. Dazzo. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. Plant and Soil 194: 99-114.

- Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacy (eds.) Biological Nitrogen Fixation. Chapman & Hall, New York, USA. pp. 43-86.
- Zhang, H. and B.G. Forde. 1999. An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279: 407-409.