

94



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACION DE Rhizobium etli ENDOFITO DEL MAIZ

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P E R E ESTUDIOS PROFESIONALES
MARIA LUISA GUTIERREZ ZAMORA JIMENEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO

2002
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Caracterización de Rhizobium etli endófito del maíz".

realizado por María Luisa Gutiérrez Zamora Jiménez

con número de cuenta 9650434-1, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Esperanza Martínez Romero

Propietario

Dr. Miguel Lara Flores

Propietario

Biol. Saúl Cano Colín

Suplente

M.enC. Claudia Verónica Silva Romero

Suplente

Q.F.B. Jesús Muñoz Rojas

Consejo Departamental de Biología
FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Dra. Patricia Ramos Morán



DEPARTAMENTO DE BIOLÓGICAS

*El papel en la naturaleza
de lo infinitamente pequeño,
es infinitamente grande.*

L. Pasteur

*Dedico esta tesis a mi padre,
con pasión jarocho.*

A g r a d e c i m i e n t o s

Mi profundo agradecimiento a la Dra. Esperanza Martínez-Romero, quien hizo posible la realización de este trabajo.

A mi padre, por estar siempre conmigo, a mi madre, hermanos y a toda mi familia. Gracias por su apoyo incondicional.

To Wade, for being so close to me, always supporting me, even from the distance.

A Adelaida Casamitjana de Sarukhán, por haberme estimulado siempre para ser parte del mundo de la investigación.

Muchas gracias a todos mis amigos del laboratorio de Ecología Molecular y Microbiana del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Todos son parte de una de las mejores etapas de mi vida.

A Carlos E. por su inagotable fortaleza y compañía durante la última parte de este trabajo.

A mi gran amigo Julio Páez, muchas gracias por todo.

A todos mis maestros, que moldearon a la bióloga que soy ahora. Todo mi respeto, cariño y agradecimiento.

Gracias a mis sinodales, por el interés, conocimiento y apoyo que me brindaron.

Al PAPIIT-DGAPA IN201600 y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por el apoyo a este proyecto.

Índice

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
1. La importancia del maíz en el mundo y en México.....	2
2. La Revolución Verde.....	3
3. La agricultura sostenible.....	4
3.1. Los inoculantes.....	5
3.2. Cultivos mixtos y policultivos.....	7
4. La fijación biológica de nitrógeno.....	9
5. La Rizósfera.....	11
5.1. Generalidades.....	11
5.2. La rizósfera y las bacterias fijadoras de nitrógeno.....	12
III. Antecedentes.....	14
1. Las bacterias endófitas.....	14
2. Bacterias endófitas de gramíneas.....	15
3. Rizobia endófitas de cereales.....	17
IV. Objetivos.....	19
V. Materiales y Métodos.....	21
1. Parte I. Aislamiento e identificación de <i>Rhizobium etli</i> endófito del maíz.....	21
2. Parte II. Caracterización y ensayos de colonización.....	21
2.1. Caracterización.....	21
2.1.1. Curva de crecimiento.....	21
2.1.2. Prueba de nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
2.1.3. Reducción de acetileno en frijol.....	22
2.1.4. Perfil de plásmidos.....	23
2.2. Ensayos de colonización.....	23
2.2.1. Determinación de condiciones estándar de recolonización al maíz.....	23
2.2.2. Aislamiento y estimación del número de bacterias reaisladas.....	27
2.2.2.1. Aislamiento de bacterias rizosféricas y endófitas del maíz.....	27
2.2.2.2. Estimación del número de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas.....	28
2.3. Prueba de especificidad de colonización.....	28
2.4. Correlación entre cepas y capacidad de colonización.....	30
2.5. Ensayo de promoción del crecimiento y actividad reductora de acetileno.....	30
2.6. Colonización del maíz en presencia de <i>Phaseolus vulgaris</i>	31
V. Resultados.....	33
1. Parte I. Aislamiento e identificación de <i>Rhizobium etli</i> en maíz: <i>Natural endophytic association between Rhizobium etli and maize (Zea mays L.)</i>	33
2. Parte II. Caracterización y Ensayos de colonización.....	44
2.1. Caracterización.....	44
2.1.1. Curva de crecimiento.....	44
2.1.2. Prueba de nodulación.....	44
2.1.3. Reducción de acetileno en frijol con cepas M5.....	45
2.1.4. Patrón de plásmidos.....	49

2.2. Colonización.....	50
2.2.1. Determinación de condiciones estándar de reconocimiento al maíz.....	50
2.2.2. Prueba de especificidad de colonización.....	57
2.2.3. Ensayos de promoción de crecimiento y actividad reductora de acetileno (ARA).....	65
2.2.3. Correlación entre cepas y capacidad de colonización.....	67
2.2.4. Colonización del maíz en presencia de <i>Phaseolus vulgaris</i>	75
VI. Discusión.....	81
1. Caracterización.....	81
2. Ensayos de colonización.....	83
VII. Conclusiones.....	93
VIII. Perspectivas.....	96
IX. Anexo 1.....	98
X. Anexo 2.....	105
XI. Referencia citadas.....	106

Resumen

El fenómeno de la Revolución Verde en la agricultura, ocurrido durante los años 70, provocó, entre otras cosas, que los fertilizantes nitrogenados se utilizaran intensivamente a nivel mundial, trayendo como consecuencia un impacto ambiental negativo. La agricultura sostenible se perfila como nuevo paradigma que contrarrestará dichos efectos. Entre las estrategias propuestas, destaca el uso de inoculantes biológicos como potenciales sustitutos de fertilizantes químicos, así como estrategias agrícolas que conserven la biodiversidad.

En México, el maíz y el frijol han sido cultivados en asociación (milpas) desde tiempos prehispánicos. Dado que *Rhizobium etli* es el simbiote principal del frijol en México, existe la posibilidad de que esta bacteria se encuentre asociada también a las raíces de maíz como endófito. Si esta bacteria es endófito del maíz y aporta beneficios a la planta, como fijación de nitrógeno o promoción del crecimiento, constituye un excelente candidato para ser aprovechado como inoculante del maíz o de otros cereales. Bajo esta suposición, se buscó dicha bacteria en maíz asociado a frijol de una parcela tradicional del estado de Puebla. En la primera parte de este trabajo, se aislaron 60 cepas de *Rhizobium* de las raíces de estos maíces esterilizadas superficialmente. Se identificaron como *Rhizobium etli* en función de su patrón de restricción del gen 16S rRNA, patrón de isoenzimas metabólicas y presencia de genes *nif*. De estas cepas se eligieron 10 (cepas M5), de las cuales se determinó su patrón de plásmidos, su tasa de crecimiento y su capacidad de nodular frijol y fijar nitrógeno en asociación con éste. Así mismo, para comprobar su condición de endófitas y caracterizar su comportamiento como tal, se practicaron diversos ensayos de colonización de maíz. De éstos, resultó que la colonización se favorece cuando hay suelo en el sustrato experimental donde crece el maíz y que se recuperan aproximadamente 10^8 UFC por gramo suelo rizosférico y 10^4 UFC por gramo raíz de maíz en todos los casos. Las cepas M5 tienen todas la misma capacidad colonizadora de la rizósfera y la "endósfera" (tejidos internos de la planta) y ésta no está relacionada con su contenido de plásmidos. Tienen una especificidad relativa de asociación al maíz, pues colonizaron la endósfera en 12 de 20 variedades de maíz. Hubo mejor colonización endófito en 2 variedades provenientes de Oaxaca, por lo que se piensa que probablemente la combinación cepa-variedad sea importante en el éxito de esta asociación. Sin embargo, en ninguno de los casos hubo promoción del crecimiento o fijación de nitrógeno dentro del maíz. La colonización endófito se vio favorecida por la presencia del frijol asociado al maíz, lo que sugiere un efecto benéfico en la relación maíz-*Rhizobium*-frijol. A pesar no observarse beneficios netos de para el maíz, es importante caracterizar aspectos fundamentales de la asociación y conocer sus detalles para poder aprovecharla y manipularla, de tal manera que se obtengan beneficios en el futuro. *R. etli* eventualmente podría ser utilizada como biofertilizante del maíz.

Introducción

La importancia del maíz en el mundo y en México

El maíz (*Zea mays* L.) es actualmente el cereal más cultivado del mundo. En el 2001 hubo una producción mundial de 604.2 millones de toneladas, dejando en segundo lugar al trigo con 575.8 millones de toneladas, esto es un 30 % de la producción total de cereales (FAO, 2001). Se cultivaron 137.8 millones de ha en el mundo que corresponde a un 21 % de la superficie mundial cultivada con cereales (FAO, 2001). Esto nos habla de la gran importancia que este cultivo tiene para el ser humano y de la gran cantidad de recursos y energía que se emplea en su producción, en comparación con otros cereales.

EUA y China son los 2 principales productores de maíz en el mundo, con un 39.6% y 18.3% de producción anual, respectivamente, ocupando un 20.3 % y 17 % del área total cultivada con maíz (FAO, 2001). Nuestro país, en el mismo año, ocupó el quinto lugar en producción mundial (18.6 millones de toneladas) y se ubicó en el cuarto lugar de consumo mundial, después de EUA, China y Brasil. En México, del total de cereales cultivados, el 64% de la producción corresponde a este cereal, con un área de cosecha de 7.3 millones de ha y un rendimiento de 250.6 ton / ha (FAO, 2001). Esto pone en evidencia que el maíz no sólo es el cereal más cultivado del mundo, sino que en nuestro país su cultivo es de vital importancia, pues forma parte fundamental de la dieta del mexicano y, por tanto, de nuestra economía. Desde muchos puntos de vista, el maíz está sumamente integrado a la cultura mexicana y a nuestra vida diaria; esto ya, desde tiempos prehispánicos.

En otros países del sur de Asia y África, el maíz también se utiliza fundamentalmente para el consumo humano, no siendo así en países desarrollados donde se aprovecha principalmente en la industria y como alimento para ganado. La distribución global y sus propiedades biológicas lo han llevado a ser aprovechado en múltiples usos industriales, pues es fuente de almidón, etanol y endulzantes. El maíz tiene una excelente capacidad de adaptación a muchos ambientes en el mundo y su fotosíntesis C4 lo ha llevado a tener el más alto potencial en rendimiento de todos los cereales. Todas estas ventajas generan una alta demanda mundial por este cereal. El aumento poblacional global irá paulatinamente elevando la demanda también y, por lo tanto, el impacto ambiental de su cultivo se hará cada vez más agudo. La escasez de

agua y de tierras cultivables aumentará paralelamente. Por ello, resulta crítico que se planeen estrategias más eficientes en la agricultura; que ésta cada vez más se apoye en estudios científicos que permitan que las futuras producciones de maíz sean de la calidad adecuada, en la cantidad adecuada, con un rendimiento bueno y un impacto ambiental negativo minimizado.

La Revolución Verde

La Revolución Verde, gestada en las últimas décadas del siglo pasado, impulsó fuertemente el uso de fertilizantes nitrogenados y la práctica del monocultivo, como motor de una agricultura mucho más productiva. En 1985 se estimó que gracias al uso de fertilizantes nitrogenados, la producción mundial de cereales aumentó en un 50% con respecto a años anteriores (Russell, *et.al.*, 1989). Así mismo, esta nueva agricultura impulsó la creación de variedades mejoradas, así como el cultivo programado y planificado de aquellas variedades con las "mejores" características. Desafortunadamente, el criterio para la elección de estas variedades poco tomó en cuenta las realidades ecológicas y sociales de los países donde la Revolución Verde penetró. Entre muchas otras realidades, no tomó en cuenta que en países en desarrollo, los fertilizantes nitrogenados son un insumo costoso al que no pueden acceder la mayoría de los agricultores o éste no se encuentra disponible en el mercado. A pesar de los sustanciales incrementos en la producción mundial de cereales, debidos al uso de fertilizantes nitrogenados (en la década de los 70 y 80), al cabo de los años se ha observado que cada vez se requiere más cantidad de fertilizante para alcanzar el mismo nivel de productividad (Plucknett y Smith, 1986). Esto significa que la cantidad de nitrógeno que se retiene en el suelo es cada vez menor, provocando que los suelos agrícolas sean cada vez más débiles. Así mismo, implica que para lograr una buena o mejor producción se hace indispensable, cada año, aumentar de la cantidad de fertilizante, con el consecuente impacto ambiental negativo (más agudo cada vez) que esto trae como consecuencia. De esta manera, la selección, por parte de los agrónomos de plantas de maíz de alto rendimiento, en respuesta a la alta fertilización química, ha llevado a contraseleccionar características favorables para un menor impacto ambiental. En pocas palabras, lograron el efecto contrario: buscando la variedad "buena", favorecieron la "mala" (Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996).

La agricultura sostenible

La última mitad del siglo XX se caracterizó por el vertiginoso avance y desarrollo de la tecnología al servicio del hombre y su sociedad. Dentro de los muchos ámbitos que han sido impactados por dichos cambios cabe destacar al agrícola. El desarrollo que la agricultura ha visto en las últimas décadas, sin duda, ha revolucionado la vida cotidiana de millones de personas en una u otra manera, ya sea positiva o negativamente. Ha tenido un efecto directo sobre las costumbres de los pueblos, en su dieta, en su economía y seguramente en sus relaciones sociales también. Es evidente que así como este desarrollo ha tenido influencia decisiva en las sociedades humanas, también la ha tenido en el medio ambiente natural, esto es, en ecosistemas tanto agrícolas como no agrícolas. Una de las consecuencias más graves de la intensificación de la agricultura mundial, sobre todo después de la Revolución Verde, es el impacto ambiental que ha tenido el uso extensivo de los fertilizantes nitrogenados. Los nitritos y nitratos son lavados fácilmente de los suelos y por tanto, rápidamente llegan a los mantos acuíferos donde, en exceso, se convierten en peligrosos contaminantes que afectan nuestra salud. Por ejemplo, el exceso de NO_2^- y NO_3^- en el agua y alimentos puede provocar metahemoglobinemia en infantes; el consumo de nitrosaminas y aminas secundarias puede ser causa de cáncer; algunos nitratos de alquilos y peroxiacilos pueden provocar alteraciones respiratorias. Por otro lado, el nitrógeno orgánico e inorgánico acumulado en aguas superficiales (ríos, lagos y lagunas), llevan a la eutroficación de las mismas; los óxidos de nitrógeno que resultan de procesos como la nitrificación o desnitrificación impactan directamente la capa de ozono, provocando su adelgazamiento. Los niveles altos de nitritos y nitratos en suelos pueden ser tóxicos para las plantas, así como para las comunidades microbianas, mismas que juegan un papel muy importante en los ciclos biogeoquímicos. Cabe destacar también que la producción industrial para la manufactura de fertilizantes nitrogenados es dependiente del petróleo, recurso no renovable. La síntesis industrial de amoníaco (proceso Haber-Bosch), requiere grandes cantidades de hidrógeno, generalmente obtenido a partir de gas natural, así como una gran cantidad de energía que establezca y mantenga la alta temperatura y presión necesarias para que el nitrógeno y el hidrógeno reaccionen entre sí. Esto implica que la producción de fertilizantes estará condicionada al abastecimiento natural de petróleo y, por tanto, la agricultura dependiente de este tipo de

fertilizantes, también. Resulta paradójico pensar en una agricultura que dependa de un recurso no renovable, cuando la producción de alimentos misma se sustenta en recursos renovables. Dicho lo anterior, se vuelve indispensable la búsqueda de alternativas que puedan sustituir, de alguna manera, el uso de este tipo de fertilizantes, pero que a la vez no tengan un impacto negativo en el medio ambiente. Esta necesidad forma parte de un conjunto de cambios sustanciales que deben hacerse dentro de la agricultura y que dan cuerpo a lo que llamamos *agricultura sostenible*. El concepto de desarrollo sostenible ha permeado todos los ámbitos de la actividad económica y la agricultura no es la excepción. *Desarrollo Sostenible* se define como "el adecuado manejo de los recursos que satisfagan las necesidades humanas y, a la vez, que mantenga o mejore la calidad del medio ambiente y los recursos naturales" (CGIAR, 1988). De aquí se desprende que la agricultura sostenible será aquella cuyos rendimientos sean suficientes para satisfacer las necesidades humanas, pero que al mismo tiempo, minimice su impacto sobre el medio ambiente natural y conserve los recursos naturales no renovables, para poder cumplir con su objetivo fundamental a largo plazo. De esta manera, las prácticas agrícolas deberán sufrir, en el corto o mediano plazo, transformaciones sustanciales que nos lleven a una mejor planeación y manejo de los recursos y el medio ambiente. Algunas de las estrategias de esta agricultura alternativa son: el uso de abonos orgánicos y composta, la práctica de cultivos mixtos o policultivos con una adecuada selección de especies cocultivadas, así como la rotación de cultivos adecuados, la sustitución de herbicidas y plaguicidas por técnicas de control biológico y el uso de inoculantes bacterianos. Todas estas estrategias deberán estar sustentadas en cuidadosos estudios de laboratorio que permitan asegurar el éxito en los nuevos programas agrícolas y por tanto, el éxito de la agricultura sostenible como un nuevo paradigma.

Los inoculantes

Un inoculante puede ser definido como una "fórmula" que contiene una o más cepas bacterianas (o especies) en un material acarreador, ya sea orgánico o inorgánico. (Bashan, 1998). El inoculante es el medio por el cual se hacen llegar las bacterias a una planta determinada. El principio fundamental de un inoculante es la utilización de bacterias en un cultivo de interés agrícola de tal manera que traigan beneficios a la planta y, en consecuencia,

a la cosecha completa. Dichos beneficios pueden ser: fijación de nitrógeno, control biológico de patógenos, estimulación de la absorción de nutrientes del suelo y efectos fitoestimulantes (mediante la síntesis de fitoreguladores). Un "biofertilizante" es un tipo de inoculante cuyo beneficio es, generalmente, la fijación biológica de nitrógeno y que puede funcionar como sustituto del fertilizante químico (Bashan, 1998). Es muy común el uso indistinto de los términos *inoculante* y *biofertilizante*, pero es claro que no significan lo mismo. La razón por la cual se utiliza la palabra biofertilizante en lugar de inoculante es porque en algunos países facilita su registro comercial (Bashan, 1998).

Un inoculante puede ser líquido, un polvo o un sustrato granular que contiene a la bacteria y que se dispersa, fundamentalmente, de dos maneras: 1) sobre el suelo directamente en el arado ó 2) sobre la semilla, rociándola (o sumergiéndola) en la suspensión o polvo, previo a su sembrado o en el momento del sembrado (Bashan, 1998).

Durante casi 100 años, se han utilizado bacterias del género *Rhizobium* como inoculantes de leguminosas, obteniendo resultados exitosos en cuanto al rendimiento de la leguminosa (Gaur, *et.al.*, 1980). Algunas cepas de *R. etli* que se han seleccionado como mejores fijadoras en frijol, han sido utilizadas como inoculantes para los campos de cultivo de frijol en México, y se han reportado incrementos en el contenido de nitrógeno de la semilla (Burgos, *et.al.*, 1999). Los efectos más sobresalientes de la inoculación con rizobia se han obtenido en Brasil en los cultivos de soya y frijol (Hungria, *et.al.*, 2000).

Los primeros intentos de inoculación con bacterias no simbióticas rizosféricas en cultivos se hicieron en la década de los 20, principalmente por científicos de la ex Unión Soviética, quienes inocularon bacterias para incrementar los rendimientos de sus cultivos. Utilizando *Azotobacter* y *Bacillus* spp. observaron incrementos en la producción, que se asociaron a la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y solubilización de fosfato, respectivamente (Kostychev, *et.al.*, 1926). Sin embargo, estos resultados nunca fueron reproducidos y, por lo tanto, los efectos positivos se asociaron más bien a interacciones antagónicas en la rizósfera (Rubenchik, 1963). En la década de los 70 se descubre que *Azospirillum* estimula el crecimiento de no leguminosas (Döbereiner y Day, 1976) y esto lo convierte en un buen candidato para inoculante agrícola. A partir de entonces, la tecnología de los inoculantes ha visto un mayor desarrollo. En años recientes se han evaluado otros géneros bacterianos,

Bacillus, *Flavobacterium* y *Acetobacter*, como potenciales inoculantes (Kloepper, 1994; Tang, 1994; Tang y Yang, 1997). Sin embargo, el uso de inoculantes todavía se encuentra en fase experimental. Los inoculantes más utilizados incluyen a bacterias del género *Azospirillum* y *Azotobacter*, pero a la fecha, en general, los resultados en campo han sido inconsistentes. Kennedy y Tchan (1992) resumen los diversos ensayos de inoculación que se han llevado a cabo en campos experimentales en trigo, arroz, maíz, mijo, caña de azúcar y sorgo. El escaso éxito de los inoculantes en el aporte de nitrógeno vía FBN en los cultivos, se puede deber a los altos requerimientos de energía del proceso (para la bacteria), a las condiciones de baja concentración de oxígeno necesarias y al efecto inhibitor que tiene el nitrógeno aplicado como fertilizante. Sin embargo, a pesar de esto, se han reportado casos donde ha habido un gran éxito en el uso de inoculantes bacterianos (Okon y Labandera, 1994) y existen varios países que ya han desarrollado la industria de los inoculantes, como Canadá, EUA, Francia, Finlandia y China (Bashan, 1998). En México se ha utilizado *Azospirillum brasilensis* como inoculante en campos experimentales con resultados muy prometedores (Caballero-Mellado, *et.al.*, 1992 y Dobbelaere, *et.al.*, 2001).

Uno de los objetivos más importantes de la investigación en el área de fijación de nitrógeno es sustituir fertilizantes químicos por inoculantes biológicos. Para lograr esto, es necesario obtener cepas bacterianas que posean esta capacidad, estudiarlas, conocerlas y aprovechar adecuadamente su potencial.

Cultivos mixtos o policultivos

Un cultivo mixto o policultivo se puede definir como cualquier superficie donde dos o más plantas cultivadas crecen juntas, durante una parte o todo su ciclo de vida (Baldy y Stigter, 1993). Existe una razón fundamental por la que se utiliza esta forma de cultivo: se cree que las plantas involucradas son capaces de utilizar los recursos ambientales más eficientemente que los monocultivos (Stigter y Baldy, 1995). En el caso de la luz y el agua, las hojas y raíces de las especies asociadas exploran diferentes volúmenes de aire y suelo o diferentes nichos ecológicos (Vandermeer, 1989). Esto coincide con el bajo nivel de competencia interespecífica, comparado con la competencia intraespecífica que normalmente se reporta (Haynes, 1980). Sin embargo, en cuanto al nitrógeno, que se localiza en su mayoría en la capa

superficial del suelo y, en principio, más sujeto a competencia directa, su mejor aprovechamiento se puede deber a otros factores. La mayoría de los cultivos mixtos son mezclas de cereal-leguminosa, lo que implica que dos diferentes fuentes de nitrógeno pueden ser utilizadas por el cultivo: 1) directo del suelo por parte de ambas plantas y 2) nitrógeno atmosférico fijado simbióticamente por la leguminosa. Se ha reportado que en mezclas cereal-leguminosa, el beneficio para el cereal puede tener un doble origen. En primer lugar, la FBN de la leguminosa hace que la competencia por el N del suelo sea menor y, por lo tanto, que haya una mayor disponibilidad de N en el suelo para el cereal (Vallis, *et.al.*, 1967, Soussana, *et.al.*, 1989, Faurie, 1994). En segundo lugar, podría estar ocurriendo una transferencia de N a nivel de rizósfera de la leguminosa hacia el cereal, ya sea por una vía directa (Virtanen, *et.al.*, 1937; Ta, *et.al.*, 1986) o una vía indirecta (Dubach y Ruselle, 1994). La ventaja correspondiente en cuanto al N para el cereal asociado sería mayor cuando la disponibilidad de este elemento en el suelo fuera baja, por tanto este sistema resulta más ventajoso que sólo el monocultivo.

En México, los cultivos mixtos o policultivos han existido desde hace cientos de años, pues las prácticas agrícolas de los tiempos prehispánicos se llevaban a cabo de esta manera. En una misma superficie se sembraban maíz y frijol, y en ocasiones también incluían calabaza y chile, en lo que posteriormente se denominó "milpa". El sistema de la milpa ha sido heredado de una generación a otra y persiste aún en nuestros días. Sin embargo, esta forma de agricultura tradicional ha sido desacreditada por las prácticas introducidas en México por la Revolución Verde de los años setenta, donde la estrategia fue más bien separar el cultivo del maíz y del frijol como monocultivos independientes, y seleccionar, en presencia de fertilizantes químicos, variedades de alto rendimiento, generando como consecuencia disminución en la variedad genética de los cultivos utilizados. Sin embargo, a pesar de esto, el cultivo en milpa ha sobrevivido en algunas áreas de nuestro país, restringiéndose a agricultura de autoconsumo, pero al mismo tiempo, siendo la mejor opción para el pequeño agricultor y sus familias.

El trabajo realizado en esta tesis se origina en las milpas de los campos mexicanos y sus conclusiones constituyen un factor más que apoya la idea de estimular y continuar con la práctica de cultivos mixtos en la agricultura.

La fijación biológica de nitrógeno

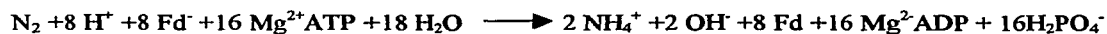
El proceso de la fijación de nitrógeno, de manera general, se puede resumir como la conversión de nitrógeno gaseoso (N_2) en amonio (NH_4) o nitritos y nitratos. Este proceso se lleva a cabo en la naturaleza por medio de dos vías: la fijación de N_2 por medio de relámpagos y la fijación biológica de nitrógeno (FBN). Esta última es de particular interés, ya que es la única vía que se puede manipular y, de alguna manera, dirigir experimentalmente en el intento por hallar soluciones para la agricultura. La FBN la llevan a cabo únicamente algunas bacterias, que en su conjunto se denominan *bacterias diazótrofás* (Tabla 1). Éstas ocupan diversos nichos ecológicos en la naturaleza. Algunas de ellas pueden fijar nitrógeno en vida libre, mientras que otras solamente lo hacen en asociación simbiótica con alguna planta, animal o microorganismo. La cantidad de nitrógeno que fijan las bacterias diazótrofás de vida libre, generalmente es bajo, entre 2 y 25 kg por hectárea por año, mientras que las que lo hacen en asociación pueden fijar mucho más (hasta 100 kg/ha/año). Sin embargo, aunque en las de vida libre las cantidades fijadas sean bajas a nivel individual, casi todos los ambientes presentan algo de fijación de nitrógeno. A nivel global, la cantidad de nitrógeno fijada se considera significativa cuando es de 50 toneladas anualmente (Paul y Clark, 1989).

Las bacterias diazótrofás que se asocian con plantas requieren de un ambiente especializado para llevar a cabo este proceso, pues deben cumplir con ciertas restricciones que el proceso en sí mismo exige (ver más adelante). Las bacterias que se asocian con plantas leguminosas inducen en su planta hospedera la formación de un nódulo en el cual se alojan, se diferencian en bacteroides y se crean las condiciones adecuadas para que se lleve a cabo la FBN. Este proceso de nodulación ocurre cuando se asocian de forma mutualista plantas leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*, denominados en conjunto como "rizobia". Sin embargo, también hay formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas no leguminosas asociadas con actinomicetos (*Frankia*) (Pawłowski y Bisseling, 1996), así como también puede haber fijación del mismo en asociación con plantas, sin necesidad de la formación de un nódulo, como se menciona más adelante.

Tabla 1. Algunas bacterias fijadoras de nitrógeno

De vida libre			En asociación	Ambas
Aerobias	Anaerobias	Anaerobias facultativas		
<i>Anabaena</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Pseudomonas</i>
Bacterias púrpuras	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Azospirillum</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Xanthobacter</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Acetobacter</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Chlorobium</i>	<i>Rhodospirillum</i>	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Burkholderia</i>
<i>Nostoc</i>	<i>Chromium</i>		<i>Azorhizobium</i>	
			<i>Frankia</i>	

La FBN es un proceso catalizado por el complejo enzimático de la nitrogenasa (dinitrogenasa reductasa + dinitrogenasa) y requiere cantidades importantes de energía (16 ATP por N₂ reducido), así como de poder reductor. La energía para llevar a cabo este proceso proviene de la oxidación de fuentes de carbono en el caso de heterótrofos o de la luz en el caso de diazótrofos fotosintéticos. La ecuación química que resume el proceso es la siguiente:



No solamente se requieren de estos elementos, sino que también se requieren condiciones de baja presión parcial de O₂, debido a que, en la mayoría de los casos, la nitrogenasa es altamente sensible a este gas. La mayoría de las bacterias diazótroficas tienen diversos mecanismos para regular esta sensibilidad al O₂. Las estrategias desarrolladas para este fin incluyen, por ejemplo, un excesivo consumo de O₂ en la respiración, la localización celular especial de la nitrogenasa (heterocistos en cianobacterias), la presencia de proteínas "protectoras" asociadas a la nitrogenasa, la producción extracelular de polisacáridos que reducen la libre difusión del oxígeno hacia la célula y la asociación simbiótica con plantas productoras de hemoglobinas y nódulos especializados. Es importante notar, sin embargo, que el O₂ es necesario para estas bacterias pues constituye el último aceptor de electrones y se requiere para la formación de ATP en la fosforilación oxidativa. La sensibilidad al O₂ de la nitrogenasa es uno de los limitantes más importantes para la FBN. Ésta también se ve limitada por la presencia de nitrógeno libre disponible en forma de nitrato o amonio. Es importante

notar que el complejo enzimático puede reducir muchos sustratos, incluyendo N_2 , N_2O , cianida, CO y acetileno. La reducción de acetileno en etileno y la subsecuente medición del etileno producido llevó al desarrollo del ensayo de reducción de acetileno (ARA por sus siglas en inglés) para la actividad de nitrogenasa, que se ha utilizado extensivamente como un indicador de la fijación de nitrógeno (Burris, 1974).

También es importante mencionar que para que la FBN ocurra de manera óptima se requieren temperaturas menores a los 30° C.

La rizósfera

Generalidades

Originalmente el término “rizósfera” fue acuñado por Hiltner en 1904 (Pepper, 2000), para describir la parte del suelo que está influenciada por las raíces de las plantas. Hoy en día, la rizósfera se ha descrito como un microambiente único del suelo que se encuentra en la proximidad cercana de las raíces de las plantas, donde los nutrimentos son más abundantes por la influencia de la planta misma y donde se desarrolla una estrecha interacción suelo-planta-microorganismo (Pepper, 2000). En este microambiente la actividad microbiana y los números poblacionales se elevan como resultado de esta interacción. Así entonces, si se compara el suelo no rizosférico con el rizosférico, la rizósfera es más atractiva para los microorganismos y, por lo tanto, habrá una tendencia a encontrar más de los mismos en la rizósfera que en el suelo no rizosférico. Sin embargo, se sabe que el suelo de la rizósfera tiende a ser más seco que el suelo no rizosférico como resultado de la transpiración de la planta y que la concentración de oxígeno en la rizósfera es generalmente más baja que en suelo no rizosférico, como resultado de su utilización en los metabolismos microbianos de este ambiente.

La rizósfera se puede extender 5 mm o más, formando una serie de gradientes de sustratos orgánicos, pH, O_2 , CO_2 y H_2O . Generalmente se han reconocido dos regiones que componen la rizósfera: 1) el suelo rizosférico y 2) el rizoplano. Este último es el suelo que se encuentra en contacto directo (adherido) con la planta.

Los microorganismos que viven en la rizósfera pueden afectar positiva o negativamente a la planta, aunque también hay que tomar en cuenta que siempre existen relaciones de

competencia entre ellos. Los microorganismos pueden afectar a la planta y su absorción de nutrimentos de manera directa cuando colonizan la raíz y modifican su estructura o bien, indirectamente, cuando modifican el microambiente del suelo que la rodea. Por su parte, la planta libera un conjunto de sustratos orgánicos muy variado que han sido clasificados en (Rovira *et.al.* 1979):

- a) **Exudados:** compuestos de bajo peso molecular que se “filtran” del metabolismo normal de células intactas,
- b) **Secreciones:** compuestos liberados activamente por las células de la raíz,
- c) **Lisados:** Compuestos liberados por la autólisis de células viejas,
- d) **Mucílago de plantas:** polisacáridos de la cofia u otras células de la raíz y
- e) **Mucigel:** mezcla “gelatinosa” de polisacáridos de origen microbiano y vegetal.

El efecto combinado de estos productos y los de origen bacteriano, determinan un microambiente sumamente especializado y variado donde se generan nichos ecológicos diversos. Así entonces, la rizósfera es un ecosistema único en el suelo que provee un suministro constante de sustratos y factores de crecimiento para otros organismos.

Las bacterias son los habitantes más numerosos de la rizósfera, siendo las *Pseudomonas* y otras bacterias gram negativas las más competitivas (capaces de colonizar raíces en crecimiento) (Pepper, 2000). Después de las bacterias, los hongos son los habitantes más abundantes de la rizósfera y pueden ser extremadamente importantes en la salud del ecosistema.

La rizósfera y las bacterias fijadoras de nitrógeno

Los microorganismos pueden influenciar benéficamente el crecimiento de una planta de muchas maneras; sin embargo, los dos mecanismos más importantes son los que involucran el metabolismo del nitrógeno y el fósforo. Las bacterias pueden estimular la asimilación de nitrógeno a través del proceso de fijación biológica de nitrógeno, mientras que los hongos contribuyen en gran manera a la asimilación de fósforo mediante asociaciones micorrícicas.

El nitrógeno es un elemento crítico en el crecimiento de una planta. En la agricultura se aplica artificialmente en forma de fertilizantes orgánicos o inorgánicos. Tanto en los ecosistemas

naturales como en los sistemas agrícolas, existen en el suelo bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno que se encargan de convertir el nitrógeno gaseoso en amonio que se incorpora a la planta posteriormente. Se han reportado aproximadamente 100 especies de diazótrofos de vida libre que podrían contribuir con nitrógeno fijado en la rizósfera y otros ambientes. Es importante notar que las raíces de plantas en cultivo tienden a tener poblaciones rizosféricas más grandes que otros árboles (Dangerfield, *et.al.*, 1978).

Algunas de las bacterias diazótroficas de vida libre han desarrollado la habilidad de asociarse con las raíces de las plantas, ya sea sobre o dentro de la planta, donde tienen fuentes de carbono disponibles provenientes de la planta. A cambio, ellas fijan nitrógeno. Muchas de estas asociaciones no necesitan aparentemente de interacciones genéticas específicas entre la planta y la bacteria, ni tampoco de modificaciones morfológicas en ninguna. Ejemplos de este tipo de asociaciones incluyen a pastos tropicales como *Paspalum notatum* con *Azotobacter paspali*, en la cual la bacteria vive en la rizósfera (Pepper, 2000). *Azospirillum* spp. también se ha encontrado asociada en la rizósfera de un diverso número de plantas de interés agrícola, entre ellas, sorgo, caña de azúcar y centeno. Además de colonizar la rizósfera, algunos diazótrofos colonizan también la epidermis de las raíces y los tejidos internos. Aparentemente, *Gluconacetobacter diazotrophicus* fija nitrógeno desde el interior de las raíces de la caña de azúcar (Kennedy, 1997) y que algunos cultivares de caña asociada a *A. diazotrophicus* fijan de 100 a 150 kg N/ha/año (Boddey, *et.al.*,1995). Es importante notar que este último ejemplo hace referencia a la FBN en un ambiente distinto a la rizósfera, ya que el proceso ocurre en los tejidos internos de la raíz de la planta.

Antecedentes

Las bacterias endófitas

Entre los diversos nichos que ocupan las bacterias fijadoras de N_2 cuando se asocian con plantas se encuentran los nódulos, la rizósfera, y un nicho diferente, descrito recientemente, que se trata del interior de las plantas con las cuales se asocian y que no son nódulos, sino el espacio intersticial de las células vegetales. Para fines prácticos y a lo largo de esta tesis se llamará a este hábitat la “endósfera”, definiendo como tal a aquel sitio del interior de una planta donde habitan bacterias que no causan perjuicio a la planta y que pudieran, incluso, beneficiarla. Dichas bacterias se denominan “endófitas”.

El término de endófito ha sido descrito desde hace una década por varios autores, quienes le han dado significados que varían un poco entre sí (Kloepper, *et.al.*, 1992; Quispel, 1992; Döbereiner, *et.al.*, 1993; Wilson, 1995; Reinhold-Hurek y Hurek, 1998). Pero de manera general, todos coinciden en que se trata de bacterias que viven dentro de plantas sin causarse daño mutuo.

Desde su descubrimiento inicial se han buscado y encontrado bacterias endófitas en una gran diversidad de plantas. Fundamentalmente, se ha dado importancia al hallazgo de bacterias diazótroficas en plantas de importancia agrícola. Esto, dada la repercusión que pueden llegar a tener en el ámbito de la FBN en la agricultura. Es decir, por medio del uso de bacterias endófitas diazótroficas, eventualmente se podría lograr la FBN en plantas de interés agrícola, logrando así disminuir la necesidad de fertilizantes nitrogenados.

En años recientes se han encontrado diversas especies y géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno en distintas plantas. Es importante destacar la diversidad de géneros encontrada en plantas tan importantes como el arroz (Barraquío, *et.al.*, 1997; Rao, *et.al.*, 1998; James, *et.al.*, 2000 y Engelhard, *et.al.*, 2000), la caña de azúcar (Boddey, *et.al.*, 1995 y Baldani *et.al.*, 2000) y el maíz (Chelius y Triplett, 2000a). La tabla 2 enlista otras plantas de interés agrícola en las que se han encontrado bacterias endófitas, ya sea diazótroficas o no diazótroficas. Los géneros encontrados con más frecuencia en éstos son : *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Erwinia* y *Xanthomonas*.

Tabla 2. Plantas de interés agrícola donde se han encontrado bacterias endófitas

Planta	Referencia
Limón	Gardner, <i>et.al.</i> , 1982
Betabel	Jacobs, 1985
Alfalfa	Gagné, <i>et.al.</i> , 1987
Algodón	Mishagi y Donndelinger, 1990
Vid	Bell, 1995
Papa	Sturz, 1995
Piña	Tapia-Hernández, <i>et.al.</i> , 2000
Palmera	Ferreira, <i>et.al.</i> , 1995
Plátano	Weber, <i>et.al.</i> , 1995
Cafeto	Jiménez-Salgado, <i>et.al.</i> , 1997
Pasto Kallar	Reinhold-Hurek, <i>et. al.</i> 1993

Bacterias endófitas de gramíneas

Dado que hay un creciente interés en extender la fijación biológica de nitrógeno de leguminosas a cereales, a través de bacterias endófitas, es importante identificar qué bacterias se han aislado como endófitas de las principales gramíneas cultivadas a nivel mundial. Así entonces, como muestra la tabla 3, los estudios se han centrado en caña de azúcar, maíz y arroz, dado que se trata de las gramíneas de mayor importancia económica a nivel mundial. La misma tabla indica también las endófitas encontrados en cada caso y su referencia.

Tabla 3. Bacterias Endófitas de algunas gramíneas importantes

Cultivo	Bacteria	Referencia
Caña de azúcar	<i>Glucoacetobacter diazotrophicus</i>	Cavalcante y Döbereiner, 1988
	<i>Beijerinckia</i>	Boddey, <i>et.al.</i> , 1995 (revisión)
	<i>Azospirillum</i>	
	<i>Azotobacter</i>	
	<i>Erwinia</i>	
	<i>Derxia</i>	
	<i>Enterobacter</i>	
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Baldani, <i>et.al.</i> , 1992
	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Olivares, <i>et.al.</i> , 1996
Maíz	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Palus, <i>et.al.</i> , 1996
	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Baldani, <i>et.al.</i> , 1986.
	<i>Burkholderia spp.</i>	Estrada de los Santos, 2001
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Chelius y Triplett, 2000a
	<i>Pantoea agglomerans</i>	
	<i>Azospirillum sp.</i>	
	<i>Dyadobacter fermentans</i>	Chelius y Triplett, 2000b
Arroz	<i>Azospirillum sp.</i>	Baldani y Döbereiner, 1980
	<i>Azoarcus sp.</i>	Engelhard, <i>et.al.</i> , 2000
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	You y Zhou, 1989
	<i>Herbaspirillum sp.</i>	Baldani, <i>et.al.</i> 1992, Olivares, <i>et.al.</i> , 1996
Trigo	<i>Azospirillum brasilense</i>	Kennedy, <i>et.al.</i> , 1997.

En varias ocasiones se ha reportado que algunas de las especies diazótroficas que se enlistan son capaces de fijar nitrógeno en asociación con su planta hospedera o bien, estimular el crecimiento de la planta por medio de otros mecanismos (Sevilla, *et.al.*, 1998 y 1999, Baldani, *et.al.*, 1999)

Rizobia endófitas de cereales

Como se mencionó anteriormente, los rizobia son un conjunto de bacterias que se caracterizan por formar asociaciones mutualistas con plantas leguminosas para fijar nitrógeno atmosférico. Este grupo está formado por los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Los rizobia pertenecen a la subdivisión alfa de las Proteobacterias y estos 6 géneros son grupos filogenéticos entremezclados con otros géneros de las alfa Proteobacterias. A la fecha se han descrito 30 especies en estos géneros. Todas ellas son bacterias tipo bacilo gram negativo. Algunas características del género *Rhizobium* son las siguientes: presentan flagelos, tienen un tiempo de duplicación de 2 horas en cultivo, utilizan pentosas, hexosas, mono, di y trisacáridos como fuentes de carbono, poseen una baja resistencia a antibióticos, el tamaño aproximado de su cromosoma es de 3.7 Mb y, en general, poseen plásmidos portadores de genes esenciales para la nodulación y fijación de nitrógeno (plásmido simbiótico). Para los miembros de este género, los plásmidos son elementos genéticos muy importantes en su relación con el hospedero.

Resulta muy atractivo, desde el punto de vista de la agricultura sostenible, el hecho de que existan rizobia endófitos en los cereales. Dado que los cereales son el tipo de cultivo más importante a nivel mundial y los de mayor consumo humano, la idea de la FBN o promoción de crecimiento vía estos endófitos se hace posible dado que potencialmente se pueden utilizar como inoculantes. Si se lograra que la FBN disminuyera nuestra dependencia de fertilizantes nitrogenados, manteniendo o estimulando el rendimiento de la cosecha, se habrá dado un gran paso en sustentabilidad de los sistemas agrícolas.

Se podría considerar que el primer reporte de rizobia endófitos fue hecho por Allen y Allen (1981), cuando describieron que en leguminosas no nodulantes se encuentran altas poblaciones de rizobia en el interior de las raíces. A partir de entonces se ha encontrado que hay muchas plantas, tanto leguminosas no nodulantes como no leguminosas, que alojan en su interior rizobia endófitos (Pinceno y Lovell, 2000). Ejemplo de algunas asociaciones rizobio-no leguminosa son: *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*-arroz, (Yanni, *et.al.*, 1997), *Azorhizobium caulinodans*-arroz (Gopalswamy, *et.al.*, 2000; Engelhard, *et.al.*, 2000),

Bradyrhizobium-arroz (Tan, *et.al.*, 2001), *Azorizobium caulinodans*-trigo (Sabry, *et.al.*, 1997), *Bradyrhizobium japonicum*-maíz (McInroy y Kloepper, 1995), y en condiciones experimentales incluso *A. caulinodans-Arabidopsis* (Gough, *et.al.*, 1997). Se han encontrado asociaciones rizobio-no leguminosa en distintos países y distintos cereales, lo cual indica que no está limitada a una región geográfica o cereal en particular. Esta asociación natural se ha reportado en trigo, cebada, canola, arroz silvestre, sorgo y mijo en Canadá, Marruecos Senegal, Kenya e India (Biederbeck, *et.al.*, 2000; Chaintreuil, *et.al.*, 2000; Hartmann, *et.al.*, 2000; Hilali, *et.al.*, 2000; Lupway, *et.al.*, 2000; Matiru, *et.al.*, 2000). Es importante notar que la mayoría de estas asociaciones tienen en común que el cereal es cultivado en rotación o asociación (cultivo mixto) con alguna leguminosa.

En México, el maíz y el frijol se han cultivado en estrecha asociación durante cientos de años en forma de "milpa". El frijol es una planta hospedera de *Rhizobium etli*, que es el principal simbionte del frijol en México (Segovia, *et.al.*, 1993). Dada la estrecha relación centenaria que ha permanecido entre el maíz, el frijol y *Rhizobium etli* y las evidencias de la presencia de rizobia endófitos en otros cereales, la posibilidad de que exista *Rhizobium etli* como endófito en el maíz se vuelve muy razonable. Existen evidencias de que las prácticas de rotación de cultivos leguminosa-cereal son favorables para la colonización endófito de rizobos a cereales (Yanni, *et.al.*, 1997). Se sospecha que esta práctica agrícola es la causa por la cual se encuentran estas bacterias dentro de los cereales. Por lo tanto, probablemente también en las milpas de nuestro país se haya estado seleccionando de manera natural la interacción maíz-*Rhizobium*-frijol. Si *Rhizobium* es endófito del maíz y aporta beneficios a la planta, como fijación de nitrógeno o promoción del crecimiento por algún otro mecanismo, constituye un excelente candidato para ser aprovechado como inoculante del maíz o de otros cereales. A partir de esta hipótesis se originan los objetivos y el trabajo que se presenta a continuación.

Objetivos

- **Objetivos generales**

1. Buscar *Rhizobium etli* en tejidos internos del maíz.
2. Caracterizar algunos aspectos fenotípicos y genotípicos de algunas cepas (M5) aisladas del interior de maíz.
3. Evaluar su capacidad de recolonización al maíz y efectos en el crecimiento del mismo en condiciones de laboratorio (invernadero).

- **Objetivos particulares**

1. **Caracterización:**

- 1.1 Determinar si las cepas M5 tienen la capacidad de nodular frijol (*Phaseolus vulgaris*).
- 1.2 Determinar si las cepas M5 tienen la capacidad de reducir acetileno en *P. vulgaris*
- 1.3 Conocer el contenido y patrón de plásmidos de las cepas M5 y sus tasas de crecimiento.

2. **Colonización:**

- 2.1 Determinar si las cepas M5 son capaces de volver a colonizar el maíz y establecer cuáles son las condiciones de laboratorio en las que son capaces de hacerlo de manera óptima.
- 2.2 Determinar el número de bacterias rizosféricas y endófitas de las cepas M5 que recolonizan el maíz y que sobreviven en su interior.
- 2.3 Evaluar si la colonización de maíz por las cepas M5 es diferente en las distintas variedades de maíz.

2.4 Determinar si cada cepa M5 tiene distinta capacidad de colonización individualmente al maíz criollo de Cholula y si existe alguna correlación de esto con su contenido plasmídico.

2.5 Determinar si las cepas M5 tienen la capacidad de promover el crecimiento del maíz y si éste se debe a fijación de nitrógeno.

2.6 Determinar la capacidad colonizadora de las cepas M5 al maíz en presencia de *Phaseolus vulgaris*.

Materiales y Métodos

Parte I. Aislamiento e identificación de *Rhizobium etli* en maíz

Los materiales y métodos llevados a cabo en esta parte están descritos en el artículo correspondiente y que se anexa en el capítulo de los resultados.

Parte II. Caracterización y ensayos de colonización

1. Caracterización

1.1 Curva de crecimiento

Se crecieron las cepas en medio PY nal₂₀ (ácido nalidixico 20 mg/l), estriando de tal forma que se obtuvieran colonias aisladas. Cada colonia aislada, se inoculó en 3 ml del mismo medio líquido y se dejó creciendo 24 horas a 30° C. Se tomó de esta suspensión un volumen dado tal que tuviera una densidad óptica DO = 0.05 al inocular 30 ml del mismo medio líquido. Esta DO es el valor inicial de la curva. Los cultivos se crecieron a 30° C y su densidad óptica se midió cada 2 horas.

1.2 Prueba de nodulación en *Phaseolus vulgaris*

Esta prueba permite saber si las bacterias estudiadas tienen la capacidad de formar nódulos en frijol y, por tanto, indirectamente indica si poseen los genes de nodulación.

Esterilización de la semilla

Se colocaron las semillas en una solución de etanol al 70% durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1.2% durante 15 minutos. Se lavaron las semillas con agua destilada estéril en abundancia hasta dejar de percibir olor a cloro. Después de la esterilización se eligieron aquellas semillas que no presentaron la testa arrugada o maltratada.

Germinación de la semilla

Se colocaron las semillas en caja Petri con agar-agua al 0.75% estéril (15 semillas por placa). Se incubaron a 30° C durante dos días (o hasta que germinara).

Inóculo

Se tomó una asada abundante de cultivo fresco (crecido en medio PY) y se resuspendió en 1 ml de agua estéril, mezclando bien. Se preparó inóculo suficiente de cada una de las 10 cepas y como control positivo la cepa CFN 42.

Inoculación

La semilla germinada se colocó en un matraz con algodón (7 g) previamente esterilizado. Se agregaron 150 ml de solución nutritiva (Anexo 2) y 100 microlitros del inóculo bacteriano. Éste debe distribuirse uniformemente sobre la raíz. Se tapó de nuevo el matraz. Todo en condiciones de esterilidad.

Etiolación y crecimiento

Se colocaron los matraces en la cámara de etiolación hasta que la plántula alcanzó el tapón del matraz (aproximadamente en dos días). Al cabo de esto, se cambiaron los tapones por otros estériles dejando que la planta emerja por un costado. Finalmente se colocó el matraz en una cámara de crecimiento a 25° C y se dejó creciendo, esperando ver nodulación entre 5 y 7 días después de la inoculación.

1.3 Reducción de acetileno en frijol

Con la finalidad de saber si las cepas estudiadas poseen genes activos de la nitrogenasa se evaluó la capacidad de esta enzima de reducir el acetileno a etileno.

Se separó la raíz de las plantas inoculadas y noduladas y se colocaron en un frasco de cierre hermético. Se tapó y con jeringa se sacó no más del 15% del volumen total del aire del frasco para inyectar la misma cantidad de acetileno en este sistema. Se colocó el frasco en incubación a 30° C durante una hora. Al cabo de la incubación, se tomaron con jeringa 400 microlitros del frasco y se inyectaron en el cromatógrafo de gases.

1.4 Perfil de plásmidos

Para determinar el contenido plasmídico de cada cepa, se extrajeron los plásmidos por lisis en gel y se llevó a cabo una electroforesis por medio del método descrito por Hynes, *et.al.* (1990).

2. Ensayos de colonización

2.1 Determinación de condiciones estándares de recolonización al maíz

Con la idea de estandarizar las condiciones para todos los experimentos de colonización llevados a cabo, se elaboró este ensayo, considerando 2 variables que pudieran ser determinantes en la capacidad de colonización de las bacterias estudiadas. Las variables evaluadas fueron:

a) Sustrato: Se utilizaron macetas de 1 litro con tres mezclas de sustrato diferentes. Los sustratos probados son los siguientes:

- 0% suelo, 100 % vermiculita
- 15% suelo, 85% vermiculita
- 30% suelo, 70% vermiculita

El suelo utilizado fue arcilloso color café con un contenido de materia orgánica aproximada de 3.0 %, un contenido de N aproximado de 1.5% y un pH de 6.85.

b) Método de inoculación: Se propusieron dos formas de inoculación de la semilla: una “inoculación directa” y una “inoculación indirecta”.

La variedad de maíz utilizada en este ensayo fue un criollo de la región de Cholula, Puebla, misma variedad de la cual se obtuvieron los primeros aislados.

En todos los casos se inoculó con inóculo múltiple de las 10 cepas M5 de *Rhizobium etli*. Es posible utilizar un inóculo múltiple pues todas las cepas M5 provienen de la misma planta, por lo que se asume que no su capacidad competitiva es similar.

Es importante notar que las semillas utilizadas habían sido tratadas previamente con fungicida CAPTAN para su almacenamiento.

Preparación del inóculo indirecto

Se crecieron en medio PY na_{20} cada una de las cepas (una cepa por placa) bien distribuida por toda la caja. Dejar incubar dos días a 30° C.

Se recogió con espátula estéril o con asa, todas la bacterias crecidas en 3 placas de medio y se resuspendió en 10 ml agua destilada estéril. La cantidad de inóculo se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Volumen inóculo (V}_i\text{)} = 1\% \text{ volumen de la solución nutritiva (V}_{sn}\text{)}$$

$$\text{V}_{sn} = \# \text{ de plantas a inocular} \times 200 \text{ ml}$$

De manera general, por cada 1000 ml de solución nutritiva (esto es, para cada 5 plantas) se crecieron 3 placas con el total de las cepas a inocular.

Preparación del inóculo directo

Se sembraron las cepas en medio sólido PY na_{20} y se incubaron a 30° C durante dos días. Se resuspendieron las bacterias crecidas en este medio en agua destilada estéril de acuerdo a la siguiente relación:

Una asada abundante de cada cepa en cada 10 ml del inóculo. Cada planta se inoculó con 4 ml de esta suspensión, así que el cálculo del volumen del inóculo fue:

$$\text{V}_i = \# \text{ de plantas a inocular} \times 4 \text{ ml}$$

Esterilización de la semilla de maíz

La semillas se enjuagaron una vez con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron en una solución de etanol al 70% durante 10 minutos. Al cabo de éstos se dio un enjuague con

agua destilada estéril y se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos. Finalmente se hicieron al menos 8 enjuagues con agua destilada estéril, tratando de eliminar lo mejor posible las trazas de cloro.

Germinación de la semilla de maíz

Cada semilla estéril se colocó en una caja Petri donde previamente se colocaron 3 hojas de papel filtro Whatmann humedecido con 5ml de agua destilada estéril. Se colocaron 10 semillas por caja y se incuban a 30° C durante 3 a 4 días.

Preparación de las macetas

Cada maceta de 1 litro se llenó hasta el borde superior con la mezcla de suelo-vermiculita que corresponda, perfectamente seca. La vermiculita se lavó y secó previamente por separado. Las macetas preparadas se cubrieron con papel aluminio, se sellaron con cinta y se esterilizaron en autoclave durante 2 horas. La esterilización debe durar dos horas para poder eliminar los hongos que se encuentren inclusive hasta el centro del sustrato.

En el centro de la cubierta de aluminio se colocó cinta (formando un cuadrado) para indicar el lugar que posteriormente se abrió para sembrar la semilla.

Siembra e inoculación de la semilla de maíz

- **Inoculación directa:** se colocó la semilla previamente esterilizada y germinada en una caja Petri que contenía 4 ml de la suspensión bacteriana (inóculo directo). Se incubó a 30° C durante una hora. Al cabo de la incubación, la semilla se colocó en el centro de la maceta, en el sustrato previamente hidratado con 200 ml de solución nutritiva estéril. Se tomaron los 4 ml de inóculo y se agregaron directamente sobre la semilla recién sembrada y ésta se cubrió con el sustrato. Se colocó un tapón de algodón estéril en el orificio central por donde emergió la planta. Todo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.
- **Inoculación indirecta:** la suspensión bacteriana se disolvió en 200 ml de solución nutritiva estéril con la cual se hidrató el sustrato. Una vez hecho esto, se colocó la semilla germinada en el centro de la maceta y se cubrió con el sustrato. Se colocó un

tapón de algodón estéril en el orificio central por donde emergió la planta. Igualmente, todo se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

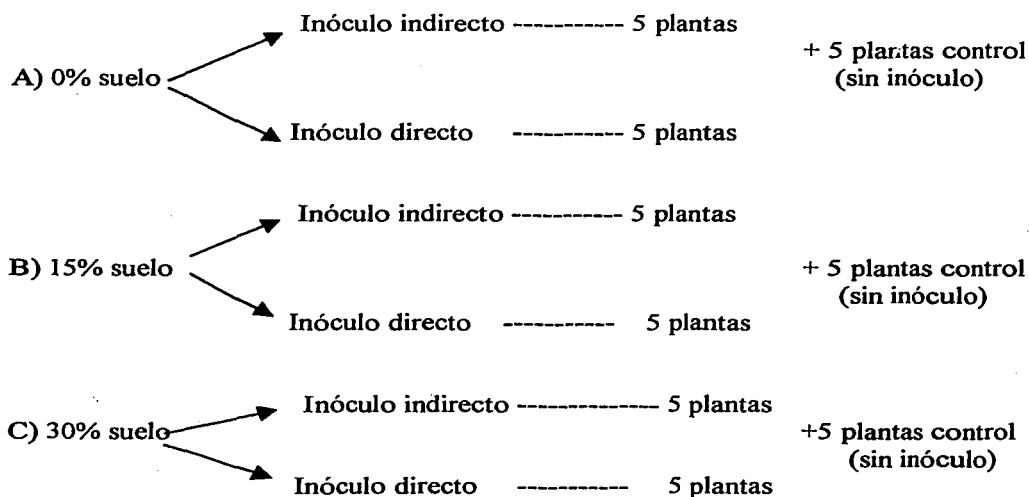
Etiolación y crecimiento

Las plantas recién sembradas se colocaron en la oscuridad para que se elongaran los tallos. Cuando esto ocurrió, se les cambió el tapón de algodón por uno nuevo, limpio y estéril, dejando que la plantulita saliera a través del orificio diseñado para este propósito.

Se trasladaron al invernadero para dejarlas crecer durante 15 días a una temperatura promedio aproximada de 28° C y fotoperiodo aproximado de 12 horas.

Esquema del diseño experimental indicando número de plantas

Se colocaron plantas de acuerdo al siguiente esquema:



Total: 45 plantas

2.2 Aislamiento y estimación del número de bacterias reaisladas

2.2.1 Aislamiento de bacterias rizosféricas y endófitas del maíz

En condiciones de esterilidad y con guantes estériles, se sacó la planta de la maceta y se colocó en una charola estéril. Se sacudió bien la tierra y la vermiculita de las raíces.

Se colocó la planta dentro de un frasco de 200 ml estéril y se agregaron 100 ml de solución de $MgSO_4$ - Tween 0.1%, de tal forma que la raíz quedara bien sumergida en dicha solución.

Se agitó con vortex (suavemente) el frasco con la planta, procurando que toda la tierra y vermiculita de la rizósfera se desprendiera de la raíz.

Se sacó la planta y se guardó esta suspensión para estimación de las bacterias rizosféricas. Se tomó una alícuota de 1 ml de dicha suspensión para dilución y sembrado en placa. El resto se colocó en frío toda la noche para dejar que el sustrato rizosférico se asentara en el fondo. Se eliminó todo el sobrenadante y el precipitado se secó en horno. El suelo seco obtenido se pesó para posteriormente hacer los cálculos de bacterias rizosféricas.

La planta se enjuagó con abundante agua corriente para eliminar de la raíz, lo mejor posible, la tierra y vermiculita restante. Se dejó secar bien, se cortó la raíz y se pesó.

En condiciones de esterilidad la raíz se colocó dentro de un vaso limpio de licuadora de 250 ml. Se agregaron 200 ml de etanol al 70% durante 45 segundos y se agitó para enjuagar y desinfectar la raíz. Se vació el etanol, se dio un enjuague con agua destilada estéril y se agregaron 200 ml de solución de hipoclorito de sodio al 1.5 %. Se dejó en agitación suave durante 20 minutos.

Al cabo de este tiempo se enjuagó con abundante agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito de sodio y limpiar perfectamente la raíz (aproximadamente se utilizan 1.2 litros de agua por planta).

En condiciones estériles, la raíz se tomó y se puso en contacto con una placa de PY como prueba de esterilidad superficial. Posteriormente se devolvió la raíz al frasco de la licuadora.

Se agregaron 9 volúmenes de agua destilada estéril con respecto al peso de la raíz, de tal forma que se obtuviera la primera dilución 1:10 del extracto.

Se molió en la licuadora para obtener el macerado de la raíz, donde se encuentran las bacterias endófitas.

2.2.2 Estimación del número de bacterias rizosféricas y endófitas aisladas

1) Rizosféricas

La suspensión rizosférica se diluyó hasta una concentración de 10^{-5} y se sembraron 100 microlitros (10% de la suspensión) en medio PYNal₂₀, de las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} , por duplicado.

Se incubaron las placas a 30° C durante dos días, al cabo de los cuales se contó el número de colonias que crecieron y se calculó el número de bacterias mediante la siguiente ecuación:

$$\text{UFC / g suelo} = (\# \text{ colonias}) (\text{factor de dilución}) (10) (100 / \text{peso de suelo rizosférico})$$

Donde 100 equivale al volumen de suspensión rizosférica analizada y 10 a la décima parte del volumen de suspensión que se toma para sembrar.

2) Endófitas

El macerado de la raíz se diluyó hasta 10^{-4} y se sembraron 100 microlitros (10% de la suspensión) en placas con medio PYNal₂₀, de las diluciones 10^0 hasta 10^{-4} por duplicado.

Se incubaron las placas a 30° C durante dos días y al cabo de éstos se contó el número de colonias y se calculó el número de bacterias (UFC) con la siguiente ecuación:

$$\text{UFC/g de raíz} = (\# \text{ colonias}) (\text{factor de dilución}) (10) (\text{volumen de macerado}) / \text{peso de raíz}$$

2.3 Prueba de especificidad de colonización

La finalidad de este experimento fue la de determinar si las cepas son capaces de colonizar distintas variedades de maíz y, en tal caso, si existe una preferencia por las cepas hacia alguna variedad en particular. Se inocularon 20 variedades de maíz distintas que se enlistan en la tabla 4.

Tabla 4. Variedades de maíz utilizadas en este análisis

No. de identificación CIMMYT	Variedad	Localidad de procedencia
10496	Zamora amarillo	Zamora, Michoacán
15	Zamora amarillo	Zamora, Michoacán
16006	Zamora amarillo	Zamora, Michoacán
9116	Cónico nortefío	La Mesa, Michoacán
1477	Pepitilla	Coyacho, Michoacán
10235	Cónico	Mercado de Toluca, Edo. de México
1209	Cacahuacintle	Toluca, Edo. de México
8521	Olotillo	Chalco, Edo. de México
1408	Olotillo	Huehuetoca, Edo. de México
17912	Bolita	Etla, Oaxaca
O-170	Pinto 1900	Oaxaca
265	Zapalote chico	Reforma, Oaxaca
18020	Bolita	Ejutla de Crespo, Oaxaca
O-153	Blanco 1860	Oaxaca
O-329	Amarillo 2050	Oaxaca
17903	Pepitilla	Etla, Oaxaca
17959	Bolita	Sola de Vega, Oaxaca
O-311	Pinto	Oaxaca
17901	Bolita	Etla, Oaxaca
O-324	Amarillo	Oaxaca

Para cada variedad se hicieron 4 repeticiones y 3 plantas control (sin inocular). Las plantas se dejaron crecer en invernadero en condiciones controladas (28° C) durante 15 días.

La esterilización y germinación de las semillas, así como la preparación de las macetas se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo antes descrito, utilizando en este caso un sustrato compuesto por 30% suelo y 70% vermiculita.

El inóculo fue un "inóculo indirecto" de acuerdo a lo descrito en el protocolo anterior. En este caso también se utilizó un inóculo múltiple de las 10 cepas M5.

Para determinar el número de bacterias en la rizósfera y en la endósfera se siguió el protocolo de aislamiento y estimación descrito para el ensayo anterior.

Para determinar el número de bacterias en el inóculo se tomó una muestra (1 ml) del inóculo antes de agregarlo al medio nutritivo y se hizo un conteo por el método de dilución y sembrado en placa.

2.4 Correlación entre cepas y capacidad de colonización

Para determinar si el contenido de plásmidos de cada cepa o la cepa misma influye en la capacidad de colonización al maíz, se inoculó cada una de las cepas por separado en la variedad de maíz original de la cual se aislaron dichas bacterias (criollo de Cholula).

Para cada cepa se inocularon 4 plantas y como control se crecieron 10 plantas no inoculadas bajo las mismas condiciones experimentales.

La esterilización y germinación de las semillas, así como la preparación de las macetas se llevaron a cabo de la manera descrita para los ensayos anteriores. El sustrato utilizado contenía un 30% de suelo y 70% de vermiculita. Se utilizó un inóculo indirecto. Se colocaron las plantas en invernadero durante 15 días.

El procedimiento de aislamiento y estimación del número de bacterias rizosféricas y endófitas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente. El inóculo se cuantificó por el método de dilución y sembrado en placa.

2.5 Ensayo de promoción de crecimiento y actividad reductora de acetileno (ARA)

Para determinar si las cepas M5 tienen algún efecto positivo (o negativo) en el crecimiento de las distintas variedades de maíz se inocularon 8 plantas, por variedad, y se colocaron en invernadero con sus respectivos controles (8 plantas no inoculadas) durante 15 días. Las variedades utilizadas corresponden a las 20 de la tabla 4.

A cuatro plantas inoculadas por variedad se les hizo un ensayo de reducción de acetileno para establecer una correlación entre el aumento de peso seco y la fijación de nitrógeno, en dado caso de haber aumento.

Se utilizó un inóculo múltiple de las 10 cepas M5, en inóculo indirecto. El sustrato utilizado fue de 30% suelo y 70% vermiculita. La esterilización y germinación de las semillas, así como la preparación de las macetas es la misma que en los ensayos anteriores.

El método utilizado para estimar efectos en el crecimiento fue el siguiente: al cabo de 15 días en el invernadero, las plantas se sacaron cuidadosamente de las macetas, se separó la parte aérea (tallo y hojas) de la raíz y se colocaron en bolsas de papel estraza. Se dejaron secando en horno a 65° C, de dos a tres semanas. Finalmente, se pesan, se tabulan los valores y se comparan. Si existen diferencias significativas entre la planta inoculada y el control, se puede asumir un efecto positivo (o negativo) debido a la inoculación.

Paralelamente y previo a su deshidratación, se tomaron 4 raíces recién cortadas a las cuales se les hizo un ensayo de reducción de acetileno para, en dado caso, relacionar el efecto de promoción de crecimiento con la actividad de la nitrogenasa de la bacteria (y por lo tanto, con aporte de nitrógeno vía FBN). El procedimiento de reducción de acetileno fue el mismo que el utilizado en el caso del frijol, pero en este caso, el tiempo de incubación fue de 24 horas.

2.6 Colonización del maíz en presencia de *Phaseolus vulgaris*

La finalidad de este experimento fue determinar si la presencia del frijol afecta, en términos cuantitativos, la colonización de las cepas M5 al maíz.

La variedad de maíz utilizada fue el criollo de Cholula, misma de la cual se aislaron estas cepas originalmente. La variedad de frijol utilizada fue Negro Xamapa de guía (trepador). Ésta última es un modelo experimental ampliamente utilizado; es una variedad de frijol que se considera buena fijadora de nitrógeno y se encuentra distribuida en todo el país.

El procedimiento de esterilización y germinación de la semilla de maíz corresponde a lo realizado en los ensayos anteriores. En el caso de la semilla de frijol, se siguió el protocolo utilizado en la prueba de nodulación. El sustrato utilizado en las macetas fue, igualmente, una mezcla de 30% de suelo y 70% de vermiculita, siguiendo el mismo protocolo de preparación de las macetas que en los casos anteriores.

Una vez germinadas ambas semillas se colocaron una de maíz y una de frijol en el centro de la misma maceta, en esterilidad, y con el sustrato previamente humedecido con la solución nutritiva. Esta última incluía también el inóculo, pues se trataba de un inóculo indirecto.

Para este ensayo se utilizaron 10 parejas de plantas inoculadas y 10 parejas sin inocular (control). Como otro control se inocularon plantas de maíz solas, es decir, sin frijol, en la misma maceta y plantas de maíz solas sin inocular.

Se colocaron en invernadero en condiciones controladas (28° C) durante 15 días. Al cabo de éstos, las plantas de maíz se sometieron al mismo procedimiento de extracción, aislamiento y se determinación del número de bacterias, descrito anteriormente.

Resultados

Parte I. Aislamiento e identificación de *Rhizobium etli* en maíz

Los resultados de la primera parte de este trabajo se presentan en el artículo que a continuación se anexa.

En resumen, se refieren al aislamiento original e identificación de cepas de *Rhizobium etli* a partir de tejidos de raíz de maíz. El maíz utilizado en este aislamiento fue un criollo de Cholula, Puebla proveniente de una parcela donde se practicaba el cultivo mixto de maíz y frijol. Se colectaron 5 plantas de maíz, así como del frijol asociado a éstas, y se procesaron en el laboratorio para el aislamiento de *Rhizobium* spp. De cada una de estas plantas se obtuvieron aproximadamente 10 cepas de *Rhizobium etli*, que fueron identificadas como tales mediante las siguientes técnicas: patrón de restricción del gen 16S rRNA, patrón de electroforesis de enzimas metabólicas e hibridación tipo Southern con sonda de genes *nifH* para determinar la organización de sus genes *nif*.

De esta colección de cepas aisladas e identificadas como *Rhizobium etli*, se eligieron 10, denominadas aquí como cepas M5 (CFNEM5 en el artículo) para proseguir con análisis más detallados sobre su capacidad colonizadora, así como algunas otras características fenotípicas y genotípicas. Estos análisis se presentan como la segunda parte de este trabajo.

Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.)

M.L. Gutiérrez-Zamora, E. Martínez-Romero *

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Ap.P. 565A, 62251 Cuernavaca, Mexico

Received 19 September 2000; received in revised form 16 January 2001; accepted 2 February 2001

Abstract

Maize (*Zea mays*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) have been traditionally grown in association for thousands of years in Mesoamerica. From surface sterilized maize roots, we have isolated over 60 *Rhizobium* strains that correspond to *Rhizobium etli* bv. phaseoli (the main symbiont of bean) on the basis of 16S rRNA gene restriction patterns, metabolic enzyme electrophoretotypes, organization of *nif* genes, and the ability to nodulate beans. The colonization capacity of some of the isolates was tested with an unimproved maize cultivar and with 30 maize land races. Increases in plant dry weight upon *R. etli* inoculation were recorded with some of the land races, and these increases may be related to plant growth promotion effects. Additionally, from within maize grown in monoculture we have also recovered *R. etli* isolates recognizable by their 16S rRNA gene types, which lack *nif* genes and are incapable of nodulating bean. These strains are presumed to correspond to the earlier described non-symbiotic *R. etli* obtained from bean rhizosphere. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Rhizobium*; Endophytes; Maize; Land races; Nitrogen fixation

1. Introduction

Cereals such as maize have high N fertilization requirements for optimal yield. It would therefore be a noteworthy achievement if cereals could profit from biological nitrogen fixation and thereby decrease their requirements for N-chemical fertilization (Triplett, 1996). This goal could be attained by improving N₂ fixation by plant associated bacteria (Reinhold-Hurek and Hurek,

1998; James, 2000). In both sugar cane and rice, bacterial nitrogen fixation can contribute a substantial proportion of N to the plant (App et al., 1986; Boddey et al., 1991; Urquiaga et al., 1992; Watanabe et al., 1987). Multiple diazotrophic species and genera have been encountered inside rice plants (reviewed in Barraquio et al., 1997; Rao et al., 1998; James et al., 2000; Engelhard et al., 2000) and sugarcane (reviewed in Boddey et al., 1995; Baldani et al., 2000).

A review on the endophytic and rhizospheric bacteria of maize has been recently published (Chelius and Triplett, 2000b). Bacteria that have been identified as occurring inside surface steril-

* Corresponding author. Fax: +52-73-17-5581.
E-mail address: emartine@cifn.unam.mx (E. Martínez-Romero).

ized roots or stems include *Klebsiella pneumoniae* (Palus et al., 1996; Chelius and Triplett, 2000a), *Herbaspirillum seropedicae* (Olivares et al., 1996), *Burkholderia* spp. (Estrada-de los Santos et al., 2001), and *Arthrobacter globiformis* (Chelius and Triplett, 2000b). *A. globiformis* was identified as an endophyte in maize by a bacterial culture-independent approach. Endophytic colonization has been documented for *K. pneumoniae* (Chelius and Triplett, 2000a). The promotion of plant growth by *K. pneumoniae* does not appear to be related to nitrogen fixation (E. Triplett, personal communication). Similarly, the stimulation of maize growth by inoculation with rhizobia was found to be unrelated to N₂ fixation (Höflich et al., 1995). Acetylene reduction activity from maize plants and ¹⁵N incorporation has been documented (Von Bülow and Döbereiner, 1975; Rennie, 1980; Alexander and Zuberer, 1989) but the bacteria responsible for this nitrogen fixing activity have not been identified as is also the case in sugarcane (Baldani et al., 2000).

Rhizobium spp. form nodules in legumes, providing fixed nitrogen to their hosts. Rhizobia have also been found to be capable of colonizing roots of non-legumes as efficiently as they colonize their legume hosts (Chabot et al., 1996 and references therein). In some cases, rhizobia have been shown to colonize non-legumes as endophytes. *Rhizobium*-non legume colonization may have been promoted by the ancient practice of legume-non legume crop rotation and in this context *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii was found to be a natural rice endophyte probably as a result of a 700-year-old tradition in Egypt of growing rice in rotation with berseem clover (Yanni et al., 1997). Moreover, *R. leguminosarum* bv. trifolii was found to promote the growth of rice plants (Yanni et al., 2000). More recent data show that even recently established legume-cereal rotation crops promote the endophytic rhizobium colonization of the wheat (Biederbeck et al., 2000) barley and canola (Lupwayi et al., 2000). *Azorhizobium caulinodans* colonizes the xylem of its host *S. rostrata* (O'Callaghan et al., 1999) as well as wheat (Sabry et al., 1997) and has been found to be a

natural endophyte of modern rice cultivars (Engelhard et al., 2000). *A. caulinodans* survives in the soils and rhizosphere of wetland rice under *Sesbania rostrata*-rice rotation (Ladha et al., 1989). Penetration of rhizobia in non-legumes such as wheat, *Brassica*, and *Arabidopsis thaliana* does not require the *Rhizobium* nodulation genes which are involved in the infection and nodulation of legume roots (Gough et al., 1997; O'Callaghan et al., 1999), however, non-legume colonization by rhizobia is stimulated by flavonoids (Gough et al., 1997; Webster et al., 1998; O'Callaghan et al., 2000).

Maize and bean were domesticated in Mexico about 4000 years ago (Delgado et al., 1988; Gentry, 1969; Kaplan and Lynch, 1999). Traditionally, maize and bean have been grown in associations, called 'milpas' in Mexico, with the bean climbing over maize plants. In this system, the bean plant seems to enrich the soil N thus promoting the growth of maize. The advantages of bean-maize associations or intercrops have been recognized (Pineda et al., 1994; Souza et al., 1997). Nevertheless, the strategy that drove the Green Revolution was to grow both of the crops as monocultures and to select, in the presence of chemical fertilizer, high yielding varieties, that exhibit only a limited genetic diversity (Brush, 1986). However, 'milpas' subsisted in large areas of low income farming where they remain the best option for crop production. Due to the intimate bean-maize association in milpas, one might therefore expect to find *Rhizobium* strains as endophytes in maize. The aim of this study was to search for the presence of *Rhizobium* within maize roots. The *Rhizobium* strains obtained were characterized by a number of taxonomic criteria, which defined them as *Rhizobium etli*. Some of these isolates were subsequently examined for their endophytic re-colonization of maize.

In Mexico, *R. etli* bv. phaseoli is the main rhizobial species which effectively nodulates bean (Segovia et al., 1993). This species includes a large group of diverse bacteria, which contain a symbiotic plasmid with multiple copies of the *nif* genes (Martínez et al., 1985; Piñero et al., 1988).

2. Materials and methods

2.1. Strain isolation

Maize roots were washed with excess sterile distilled water after being surface sterilized with sodium hypochlorite (1.5%) for 15 min. Root-surface sterilization tests were performed by plating external root washings on plates with PY medium (0.3% yeast extract, 0.5% peptone, 0.07% CaCl_2 1^{-1}) or on YM medium (Vincent, 1970). To recover rhizobia from inside maize plants, roots were macerated and dilutions were plated on PY or YM media. Colonies appearing after 3 days were picked and streaked on PY Nal (nalidixic acid, 20 mg 1^{-1}). Pearly, gummy bacteria that did not grow in LB (Luria–Bertani medium: 1% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) were selected for further analysis. Otherwise, bean plants were used as traps to obtain rhizobia growing endophytically within maize and also to test if there were rhizobia at the maize surface after the sterilization procedure. Additionally, nodules from *Phaseolus* plants associated with maize were collected and rhizobia were recovered from these nodules as described by Martínez-Romero and Rosenblueth (1990). These rhizobia were designated bean rhizobia and all those coming originally from maize either directly on media or through bean selection were designated maize borne rhizobia.

Surface sterilized root macerates of maize were used as inocula for rootlets from pre-germinated bean seeds earlier surface sterilized as described (Martínez-Romero and Rosenblueth, 1990). Three bean plantlets were inoculated per maize root with 400 μl or aliquots of the macerate. Plants were maintained in growth chambers (28 °C). Ten days after inoculation, nodules on bean were counted, surface sterilized and crushed on plates. Ten nodules (large and small) per plant were streaked on PY media. Isolated colonies were further purified and maintained in YM stabs.

2.2. Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)

Extracts were prepared from each isolate grown on 30 ml PY liquid medium cultures, lysates and

enzymatic activities were detected as reported by Selander et al. (1986). Gel electrophoresis was carried out in starch gels. The following metabolic enzymes were analyzed: hexokinase, phosphoglucosyltransferase, isocitrate, malate, glutamate, and glucose-6-phosphate dehydrogenases, indophenol oxidase, and phosphoglucose isomerase. The different alleles (mobility variants) were designated according to mobility and electrophoretic types (ETs) were grouped from a pairwise matrix of genetic distances using the method described by Nei and Li (1979).

2.3. SSU rRNA gene typing

Almost complete 16S rRNA genes were synthesized with primers fD1 and rD1 (Weisburg et al., 1991). The PCR fragments were digested with *Msp*1, *Sau*3A1, *Hinf*1, and *Hha*1 and visualized in agarose gels as described (Laguerre et al., 1994). Patterns from maize borne rhizobia were compared with the type strains of bean-nodulating bacteria.

2.4. Plant growth promotion assays and colonization assays

Seeds of maize Puebla 162 (CIMMYT accession 19651, race Cacahu) or 'criollo' from Puebla were surface sterilized with ethanol 70% for 5 min and with sodium hypochlorite 3% for 10 min prior to germination for 3 days on Whatmann filters with water. Individual seedlings were placed in tubes with 2 ml Fahraeus solution (Fahraeus, 1957) or in flasks with vermiculite moistened with Fahraeus solution and inoculated with 10^3 – 10^6 bacteria per plant in 0.1 ml of sterilized water. After 3 days in the dark at 28 °C, root and shoot weight and length were recorded from plants in tubes. Non-inoculated controls were treated only with the same amount of water and maintained under the same conditions. To evaluate endophytic colonization, 12-day-old plants in vermiculite flasks were surfaced sterilized as described before and macerates were diluted and plated in PY Nal plates. Endophytes were recovered and identified by their electrophoretic types. Colonization was also estimated from maize plants grown

in pots using the plant growth promotion assay as follows. In longer term experiments, seedlings sterilized from 30 maize races as described above were inoculated with 0.1 ml (per root) of bacterial suspensions in sterilized water containing around 10^6 bacteria per ml and then placed in 5 l pots, four plants per pot, containing sterilized vermiculite and soil (brown clay soil, pH 6.85) in a 3:1 ratio and maintained for 45 days in the greenhouse. The maize races used were Mich GP9 accession 10 race Connor, Mich GP13 accession 15 race Zamoam, Oaxa 48 accession 265 race Zapch19, Mexi 7 accession 1209 race Cacahu9, Mexi 48 accession 1398 race Chalqu9, Mexi 40 accession 1408 race Elotco, Mich 112 accession 1477 race Pepiti, Mexi 3 accession 2232 race Conico9, Mexi 526 accession 8521 race Elotco, Mich 115 accession 9116 race Connor, Mich 412 accession 9188 race Pepiti, Mexi 23 accession 10235 race Conico9, Mexi 35 accession 10432 race Chalqu9, Mich 5 accession 10496 race Zamoam, Mexi 319 accession 15777 race Connor, Mich 74 accession 16006 race Zamoam, Oaxa 684 accession 17901 race Bolita, Oaxa 686 accession 17903 race Bolita, Oaxa 695 accession 17912 race Bolita, Oaxa 704 accession 17921 race Bolita, Oaxa 742 accession 17959 race Bolita, Oaxa 803 accession 18020 race Bolita, Puebla 162 accession 19651 race Cacahu, Oaxa 331 race Blanco 2050, Oaxa 324 race Amaillo, Oaxa 153 race Blanco 1860, Oaxa 329 race Amaillo 2050, Oaxa 311 race Pinto, Oaxa 170 race Pinto 1900, Oaxa 323 race Negro.

2.5. *nifH* gene organization

DNA was isolated and digested with *Bam*HI from representative maize borne isolates and reference *R. etli* strains. *nifH* fingerprint patterns were visualized by hybridization with a pEM15 300 bp internal *nifH* fragment from *R. etli* CFN42 as described (Wang et al., 1999).

3. Results

3.1. Bacterial isolation

Maize plants (\approx 3-months-old) were collected in 1998 from a criollo maize in a traditional farmer's

plot in Puebla, where maize was grown in association with bean and also in 1999 from Morelos, where maize was grown in monoculture. Isolates were also obtained from nodules of *Phaseolus vulgaris* (bean) grown in association with maize in 1998.

Endophytes are the microorganisms isolated from surface-sterilized plant tissues that do not cause any harm to the plant. It is difficult to be sure if an organism is a real endophyte or an outside survivor of an incomplete or inadequate surface disinfection procedure. We verified that rhizobia were not survivors in the external rhizosphere either by using the external root washing as inocula for beans or by placing the sterilized root on YM media for either 20 min or 24 h, we did not obtain any nodules, nor any bacterial growth similar to *R. etli*, indicating no *R. etli* surface contaminants.

After surface sterilization of maize roots, using the macerates from maize roots and *Phaseolus vulgaris* bean as a plant trap, we isolated *Rhizobium* from the roots of all the five maize plants grown in association with bean but only from one of the five maize plants grown in monoculture. Around ten isolates per plant were retained. In the cases where no bean nodulation was recorded when using the maize root extract as the inocula (with the macerates from maize in monoculture), bacteria were recovered from the bean rhizosphere as earlier described (Segovia et al., 1991) and putative non-symbiotic *R. etli* were selected. In addition to *Rhizobium* we also encountered many other endophytic bacteria, which grow on PY or LB plates inoculated with maize root extract, however, the characterization of these bacteria was not pursued.

3.2. Bacterial identification

Rhizobium isolates were identified as *R. etli* strains by their ability to nodulate *P. vulgaris*, by their ribotypes, by the mobility of their metabolic enzymes in MLEE and by their organization of *nif* genes. All 63 maize rhizobia isolates formed red well-developed nodules in *P. vulgaris* (bean). All 63 isolates had identical ribotypes with pattern DBEC encountered also in *R. etli* strains CFN42, Bra5 (Piñero et al., 1988), CNPAF512 (Michiels et al., 1991), F8 (Wang et al., 1999) and Viking 1. This

pattern is different from those obtained with all the other reported *Rhizobium* species. Using MLEE, 12 maize borne strains were compared with 22 bean isolates from nodules obtained from bean associated with maize in the same agricultural field. MLEE analysis indicated that maize borne *R. etli* isolates were closely related to *R. etli* reference strains and to bean rhizobia (Fig. 1). From a single maize plant different ETs were recovered; for example, maize borne isolates CFNEM5-4, CFNEM5-9, and CFNEM5-3 from maize plant 5 (in association with maize) corresponded to ET3, ET4, and ET9, respectively, indicating the existence of different strains in a single plant. The *nifH* gene organization was determined using 12 maize borne strains. They had reiterated *nifH* patterns characteristic of *R. etli* bv. phaseoli.

Ten putative non symbiotic isolates were assayed independently for bean nodule formation and from the analysis of their 16S rRNA patterns they were found to correspond to *R. etli* although their genomic DNA did not hybridize to *nif* gene probes (not shown). We presume therefore that these strains corresponded to the earlier described non-nodulating *R. etli* recovered from bean rhizosphere (Segovia et al., 1991).

3.3. Bacterial colonization

With 'criollo' maize at 12 days post-inoculation larger numbers (10^3 – 10^4 per root) of maize endophytic bacteria (CFNEM1-8, CFNEM5-1, CFNEM5-2, CFNEM5-3, CFNEM5-4, CFNEM5-5) were obtained compared with 10^1 – 10^2 bacteria per root for the *R. etli* reference collection strains, CFN42 and Bra5. Under these colonization conditions (flasks with vermiculite) there were around 1000-fold more bacteria of CFNEM1-8 on the root surface than inside.

A multi-strain inoculum consisting of the *R. etli* isolated from within roots of maize number 5 (from Puebla, isolates CFNEM5-1–CFNEM5-10) was used to inoculate plantlets derived from surface sterilized maize seeds; in this experiment, 30 maize native races were used. Plants which were maintained in a greenhouse were grown in pots with a mixture of sterile vermiculite and soil and

were tested for the presence of *R. etli* within the roots 45 days after inoculation. Colony forming units of bacteria recovered as maize endophytes ranged from 10^2 to 10^6 per g root but in half of the races tested we found no *R. etli* colonization. No *R. etli* strains were found inside the non-inoculated maize plants used as controls. *R. etli* was found in the rhizosphere of most of the inoculated maize cultivars but was not quantified. We have identified some maize races (accession numbers 2232, 1398, 1408, 16006, 17901, 17912, 17921, 17959, 19651, Oaxa 170, Oaxa 329, Oaxa 331)

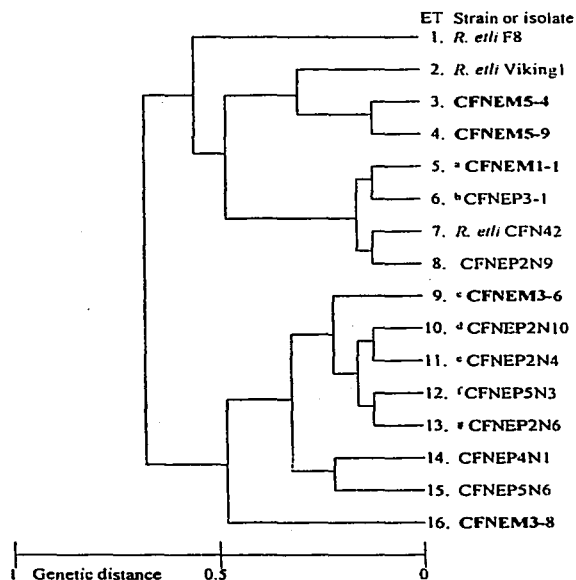


Fig. 1. Dendrogram of genetic distances deduced from metabolic enzyme electrophoretic patterns of *R. etli* reference strains, maize borne endophytic rhizobia and bean nodule isolates. All isolates from maize are bold. Other strains included per ET are: (a) CFNEM1-10, CFNEM4A-2, CFNEM4B-1, CFNEM5-5, CFNEM4-1, Bra5, CFNEM1N1, CFNEM2N5, CFNEM2N8, CFNEM4N2, CFNEM4N6, CFNEM4N9, CFNEM5N10; (b) CFNEM3-1N3, CFNEM3-1N4, CFNEM3-2N4; (c) CFNEM5-3, CFNEM4A-1; (d) CFNEM5N5; (e) CFNEM4N8; (f) CFNEM5N9; (g) CFNEM5N4.

Table 1
Maize Puebla 162 (3 days post inoculation) in tubes with Fahraues

Strain	Average per plant		
	Root weight (g)	Shoot weight (g)	Shoot length (cm)
CFNEM5-1	0.152 ± 0.013	0.380 ± 0.018	8.7 ± 0.27
CFNEM5-8	0.153 ± 0.012	0.328 ± 0.018	7.7 ± 0.37
CFNEM5-1 to CFNEM5-10	0.190 ± 0.016	0.390 ± 0.010	8.7 ± 0.20
CFN42	0.137 ± 0.009	0.360 ± 0.010	8.5 ± 0.22
CFNX249	0.140 ± 0.012	0.360 ± 0.030	8.7 ± 0.90
CNPAF512	0.110 ± 0.011	0.280 ± 0.035	6.4 ± 0.50
Non-inoculated control	0.110 ± 0.020	0.290 ± 0.031	6.5 ± 0.50

Three independent assays performed. One experiment is presented. Clear increases were obtained upon inoculation with *R. etli* borne isolates in all cases.

that show in all the plants tested increases of 10–100% over non inoculated controls with regard to plant dry weight upon inoculation with *R. etli* maize borne strains at 45 days after inoculation. Acetylene reduction assays were performed on whole maize roots but no activity was detected. We chose Puebla 162 for further analysis since it was the best responding maize race to *R. etli* inoculation. Net plant growth promotion effects on maize were observed upon *R. etli* inoculation in tubes (Table 1). The largest increases in root weight were recorded with the maize borne isolates. Positive effects on shoot weight and length were recorded with CFN42 and CFNX249 (Fix' mutant, M. de L. Girard, unpublished) as well, but not with *R. etli* reference strain CNPAF512.

4. Discussion

In Mexico, soils with low nutrient availability are commonly used for maize production because production of high-value crops has displaced maize to marginal areas. N-fertilization rates in these areas are suboptimal since N fertilization constitutes a substantial cost to farmers. Following the rationale of Yanni et al. (1997), we surmised that rhizobia occurring inside maize could be more easily encountered in places where bean and maize have been associatively grown for thousands of years. In Tehuacan, Puebla, vestiges

of 4000-years-old bean have been recorded (Kaplan and Lynch, 1999). We describe here that maize in milpas in Puebla normally harbor *R. etli*, the bacteria that form nitrogen fixing nodules in bean, and that these bacteria are naturally occurring maize endophytes. *R. etli* strains were encountered in all maize plants grown in association with bean but were found in only one out of five plants grown in monoculture. Maize borne *R. etli* showed the same *nifH* gene organization, the same restriction pattern of PCR-synthesized ribosomal genes and the same MLEE patterns as the isolates from *P. vulgaris* bean nodules. These findings imply that there is a common pool of *R. etli* chromosomal types in bean nodules and in maize. Plasmid borne traits may determine adaptation of *R. etli* to one niche or the other. Since *nod* genes are not required for non-legume colonization (Gough et al., 1997; O'Callaghan et al., 1999) and *R. etli* readily lose the *nod-nif* symbiotic plasmid (Segovia et al., 1991), it is not surprising that some *R. etli* strains recovered from within maize plants are non-symbiotic, these isolates do not possess *nif* genes and do not nodulate beans. The finding that symbiotic *R. etli* are more frequently obtained from maize grown in association with bean probably reflects the fact that symbiotic *R. etli* populations are promoted and enriched by the bean plants thereby constituting the source of inocula for maize plants.

Traditional agriculture has preserved land races. The maize races used in this study were

from diverse geographical regions in Mexico. It is worth noting that the best race responding to *R. etli* originates from the same geographical region where the strains were originally isolated, suggesting the existence of a local adaptation of maize plants and *R. etli*. The beneficial effects of *R. etli* on maize plant seem to be mediated by growth promotion as has been described earlier for *Rhizobium* (Chabot et al., 1996). *R. leguminosarum* bv. *trifolii* isolates from rice produce auxins and gibberellins (Yanni et al., 2000). The production of the bacterial mutualistic signal lumichrome that enhances root respiration, plant photosynthesis and growth has been reported (Phillips et al., 1999, 2000). We have detected that maize borne *R. etli* isolates CFNEM1-1, CFNEM5-1 and CFNEM5-8 produce lumichrome (E. Martínez, unpublished). However, it remains to be established if some beneficial effects may be derived from nitrogen fixation. An *R. etli* CFNX249 mutant with interposons in each of the *nifH* genes of the two *nif* operons has a Fix⁻ phenotype in bean (M. de L. Girard, unpublished). CFNX249 has been used as a *nif*⁻ reference strain of *R. etli* in other cases (Michiels et al., 1998; Brito et al., 1997; Cermola et al., 2000). We are testing *R. etli* mutant CFNX249 in long term plant assays.

It is notable that, as in other endophytic associations (Yanni et al., 1997; Sabry et al., 1997; Fuentes-Ramírez et al., 1999), *R. etli* bacterial cell numbers (maximum 10⁶ per gram recovered from the inoculation experiments using all of the land races) were not as high as those encountered in nodule-based nitrogen fixing symbiosis (reviewed in James, 2000).

From the accumulated data on the different systems studied, the following common features of the plant-endophytic diazotroph relationship seem to emerge: (i) the inside of roots is not an exclusive niche for a single bacterial species (in contrast to rhizobia nodules in legumes); (ii) the presence of endophytes and probably their role depend on the plant cultivar (Boddey et al., 1995) or domestication status of the species (Engelhard et al., 2000) as well as on the environmental conditions (Boddey et al., 1995; Chelius and Triplett, 2000a). (iii) Only a few plant cultivars from a given species seem to be favorable to

support bacterial endophytic nitrogen fixation (Watanabe et al., 1987; Urquiaga et al., 1989; Boddey et al., 1995). (iv) Plant growth promotion may be due to mechanisms other than nitrogen fixation, such as hormone production (Sevilla and Kennedy, 2000; Yanni et al., 2000) or pathogen suppression.

Rhizobium as a model endophyte has the advantage in that it has been safely used as a plant inoculant in agriculture over a period of more than 100 years and it is readily amenable to genetic manipulation. We plan to pursue the analysis of the *R. etli* genes involved in the maize endophytic interaction with a view to enhancing the *R. etli*-maize mutualism. In addendum, we have found *R. etli* strains inside surface sterilized maize stems from field plants grown in association with beans.

Acknowledgements

To Jesús Caballero-Mellado for encouraging discussions, Julio Martínez, Marco Antonio Rogel, Rocio Bustillos, and Ivonne Toledo for technical help and Isela Alemán for starting this project during her Verano de la Investigación, to María de Lourdes Girard for CFNX249, to Paulina Estrada for providing some root samples, to Ernesto Fuentes for advice and providing seeds and samples, to CONACyT 25075-B, to DGAPA-PAPIIT IN-201600, to Les Barran for critically reading the manuscript, to PRONASE (Productora Nacional de Semillas) for providing seeds of cultivar Negro Jamapa, and to Dr Ganesan Srinivasan and Shivaji Pandey from International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) for providing maize seeds.

References

- Alexander, D.B., Zuberer, D.A., 1989. ¹⁵N₂ fixation by bacteria associated with maize roots at a low partial O₂ pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1748–1753.
- App, A.A., Watanabe, I., Ventura, T.S., Bravo, M., Jurey, C.D., 1986. The effect of cultivated and wild rice varieties on the nitrogen balance of flooded soil. *Soil Sci.* 141, 448–452.

- Baldani, J.I., Oliveira, A.L.M., Guimaraes, S.L., Baldani, V.L.D., Reis, F.B. Jr, Silva, L.G., Reis, V.M., Teixeira, K.R.S., Döbereiner, J., 2000. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. In: Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, G., Newton, W.E. (Eds.). *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 397–400.
- Barraquio, W.L., Revilla, L., Ladha, J.K., 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194, 15–24.
- Biederbeck, V.O., Lupwayi, N.Z., Hanson, K.G., Rice, W.A., Zentner, R.P., 2000. Effect of long-term rotation with lentils on rhizosphere ecology and on endophytic rhizobia in wheat. In 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation. Université de Laval, Quebec, p. 80.
- Boddey, R.M., Urquiaga, S., Reis, V., Döbereiner, J., 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil* 137, 111–117.
- Boddey, R.M., de Oliveira, O.C., Urquiaga, S., Reis, V.M., de Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Döbereiner, J., 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174, 195–209.
- Brito, B., Martínez, M., Fernández, D., Rey, L., Cabrera, E., Palacios, J.M., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., 1997. Hydrogenase genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* are controlled by the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6019–6024.
- Brush, S.B., 1986. Genetic diversity and conservation in traditional farming systems. *J. Ethnobiol.* 6, 151–167.
- Cermola, M., Federova, E., Taté, R., Riccio, A., Favre, R., Patriarca, E.J., 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 733–741.
- Chabot, R., Antoun, H., Kloeppe, J.W., Beauchamp, C.J., 1996. Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2767–2772.
- Chelious, M.K., Triplett, E.W., 2000a. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783–787.
- Chelious, M.K., Triplett, E.W., 2000b. Diazotrophic endophytes associated with maize. In: Triplett, E.W. (Ed.), *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 779–791.
- Delgado, A., Bonet, A., Gepts, P., 1988. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in middle America. In: Gepts, P. (Ed.), *Genetic Resources of Phaseolus Beans*. Kluwer Academic Press, The Netherlands, pp. 163–184.
- Engelhard, M., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2000. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2, 131–141.
- Estrada-de los Santos, P., Bustillos-Cristales, R., Caballero-Mellado, J., 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2790–2798.
- Fahraeus, G., 1957. The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381.
- Fuentes-Ramírez, L.E., Caballero-Mellado, J., Sepúlveda, J., Martínez-Romero, E., 1999. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 117–128.
- Gentry, P., 1969. Origin of the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Econ. Bot.* 23, 55–69.
- Gough, C., Vasse, J., Galera, C., Webster, G., Cocking, E., Dénarié, J., 1997. Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Soil* 194, 123–130.
- Höflich, G., Wiehe, W., Hecht-Buchholz, C., 1995. Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res.* 150, 139–147.
- James, E.K., 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.* 65, 197–209.
- James, E.K., Gyaneshwar, P., Barraquio, W.L., Mathan, N., Ladha, J.K., 2000. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: Ladha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. IRRI, Makati City, Philippines, pp. 119–140.
- Kaplan, L., Lynch, T.F., 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance for pre-Cambrian agriculture. *Economic Bot.* 53, 261–272.
- Ladha, J.K., Garcia, M., Miyan, S., Padre, A., Watanabe, I., 1989. Survival of *Azorhizobium caulinodans* in the soils and rhizosphere of wetland rice under *Sesbania rostrata*-rice rotation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 454–460.
- Laguette, G., Allard, M.-R., Revoy, F., Amarger, N., 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 56–63.
- Lupwayi, N.Z., Rice, W.A., Clayton, G.W., 2000. Endophytic rhizobia in barley and canola in rotation with field peas. In 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Program and Abstracts. Université Laval, Quebec, pp. 80.
- Martínez, E., Pardo, M.A., Palacios, R., Cevallos, M.A., 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* 131, 1779–1786.
- Martínez-Romero, E., Rosenblueth, M., 1990. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2384–2388.

- Michiels, J., Vande Broek, A., Vanderleyden, J., 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the *Rhizobium phaseoli* *recA* gene. *Mol. Gen. Genet.* 228, 486–490.
- Michiels, J., Dombrecht, B., Vermeiren, N., Xi, C., Luyten, E., Vanderleyden, J., 1998. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 193–205.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5269–5273.
- O'Callaghan, K.J., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1999. Xylem colonization of *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. In: Martínez, E., Hernández, G. (Eds.), *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 145–147.
- O'Callaghan, K.J., Stone, P.J., Hu, X., Griffiths, D.W., Davey, M.R., Cocking, E.C., 2000. Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2185–2191.
- Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J., 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Bio. Fertil. Soil* 21, 197–200.
- Palus, J.A., Borneman, J., Ludden, P.W., Triplett, E.W., 1996. A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L., and *Zea luxurians* Itlis and Doebley. *Plant Soil* 186, 135–142.
- Phillips, D.A., Joseph, C.M., Yang, G.-P., Martínez-Romero, E., Sanborn, J.R., Volpin, H., 1999. Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12275–12280.
- Phillips, D.A., Martínez-Romero, E., Yang, G., Joseph, C.M., 2000. Release of nitrogen: a key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation. In: Ladha, J.K., Reddy, P.M. (Eds.), *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice*. IRRRI, Makati City, Philippines, pp. 205–217.
- Pineda, J.A., Kipe-Nolt, J.A., Rojas, E., 1994. *Rhizobium* inoculation increases of bean and maize yields in intercrops on farms in the Peruvian sierra. *Exp. Agric.* 30, 311–318.
- Piñero, D., Martínez, E., Selander, R.K., 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2825–2832.
- Rao, V.R., Ramakrishnan, B., Adhya, T.K., Kanungo, P.K., Nayak, D.N., 1998. Review: current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 621–633.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T., 1998. Interactions of graminaceous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 29–54.
- Rennie, R.J., 1980. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by *Azospirillum brasilense* associated with maize. *Can. J. Bot.* 58, 21–24.
- Sabry, S.R.S., Saleh, S.A., Batchelor, C.A., Jones, J., Jotham, J., Webster, G., Kothari, S.L., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1997. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. *Proc. R. Soc. London B.* 264, 341–346.
- Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R., Martínez-Romero, E., 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 426–433.
- Segovia, L., Young, J.P.W., Martínez-Romero, E., 1993. Re-classification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 374–377.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S., 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873–884.
- Sevilla, M., Kennedy, C., 2000. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: Triplett, E.W. (Ed.), *Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process*. Horizon Scientific Press, Wymondham, England, pp. 737–760.
- Souza, V., Bain, J., Silva, C., Bouchet, V., Valera, A., Marquez, E., Eguiarte, L.E., 1997. Ethnomicrobiology: do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*? *J. Ethnobiol.* 17, 249–266.
- Triplett, E.W., 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil* 186, 29–38.
- Urquiaga, S., Botteon, P.B.L., Boddey, R.M., 1989. Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ¹⁵N-labelled soil. In: Skinner, A. (Ed.), *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 311–319.
- Urquiaga, S., Cruz, K.H.S., Boddey, R.M., 1992. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 105–114.
- Vincent, J.M., 1970. *A Manual for Practical Study of Root Nodule Bacteria*. IBP Handbook No. 15. Blackwell, Oxford.
- Von Bülow, C.F.W., Döbereiner, J., 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2389–2393.
- Wang, E.T., Rogel, M.A., García-de los Santos, A., Martínez-Romero, J., Cevallos, M.A., Martínez-Romero, E., 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1479–1491.
- Watanabe, I., Yoneyama, T., Padre, B., Ladha, J.K., 1987. Difference in natural abundance of ¹⁵N in several rice

- (*Oryza sativa* L.) varieties: applications for evaluating N₂ fixation. *Soil Sci. Plant Nutr.* 33, 407–415.
- Webster, G., Jain, V., Davey, M.R., Gough, C., Vasse, J., Dénarié, J., Cocking, E.C., 1998. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. *Plant Cell Environ.* 21, 373–383.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, A., Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., De Bruijn, F., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194, 99–114.
- Yanni, Y., Rizk, R., Maya-Flores, J., Dazzo, F., 2000. Potential of the rice root occupant *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii as plant growth-promoting biofertilizer for rice. In 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Program and Abstracts. Université Laval, Quebec, pp. 79.

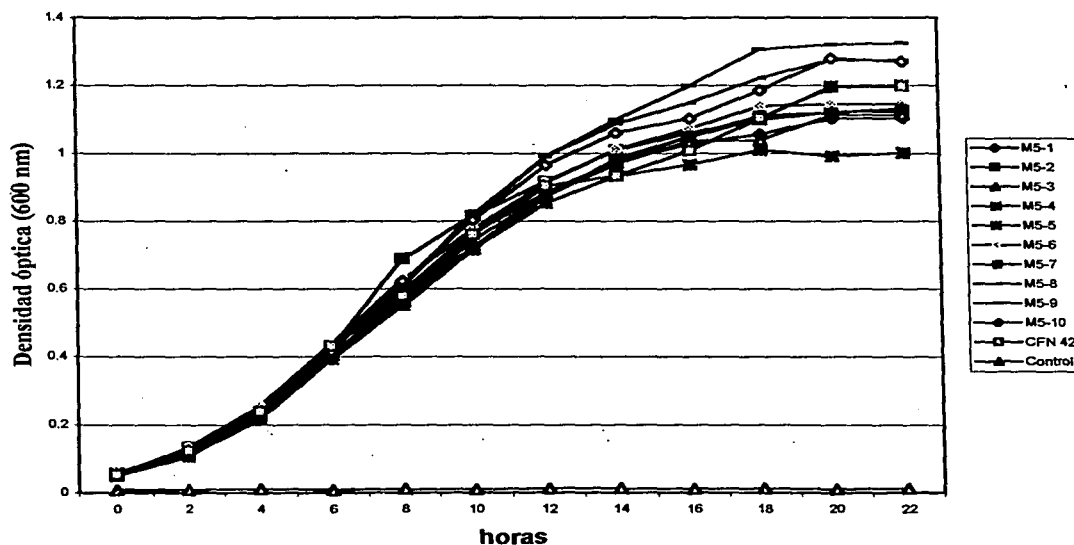
Parte II. Caracterización y Ensayos de Colonización

1. Caracterización

1.1 Curva de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento para las 10 cepas M5 con la finalidad de determinar si su cinética de crecimiento corresponde a la de la cepa tipo de *R. etli* CFN 42. La densidad óptica de las cepas se midió cada 2 horas durante 22 horas. La figura siguiente muestra las curvas de crecimiento obtenidas para las 10 cepas. El tiempo de duplicación fue de aproximadamente dos horas para todas las cepas.

Figura 1. Curvas de crecimiento de cepas M5



1.2 Prueba de nodulación

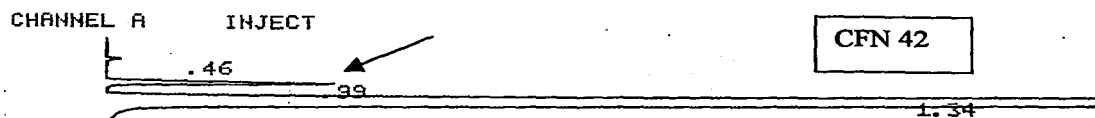
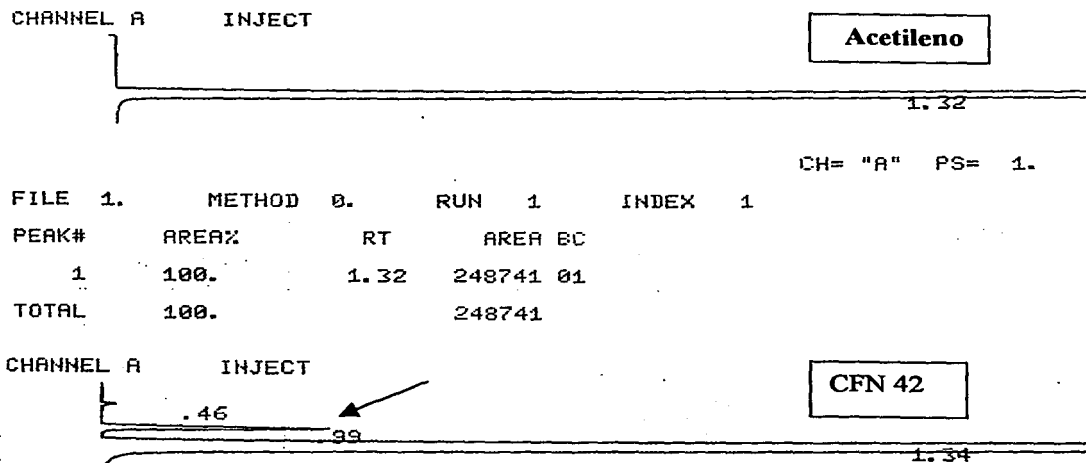
Para esta prueba se inocularon plantas de frijol con las 10 cepas M5 individualmente, teniendo 3 réplicas por cepa. Después de 7 días de haber sido colocadas en la cámara de crecimiento se observaron nódulos en todas las plantas inoculadas. Todos los nódulos tenían apariencia muy

similar a la de los nódulos de la cepa tipo CFN 42, utilizada como control positivo. Como control negativo se colocaron 3 plantas sin inocular, que no nodularon.

1.3 Reducción de acetileno en frijol inoculado con cepas M5

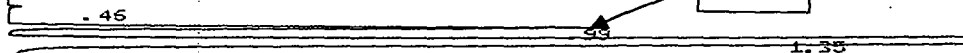
La figura 2 presenta los resultados de la cromatografía de gases de las muestras inyectadas con acetileno. Se utilizan como control negativo el acetileno inyectado y como control positivo la cepa CFN 42.

Figura 2. Gráficas de reducción de acetileno



Las flechas en la curva señalan el pico que corresponde al etileno y en los datos señala la cantidad de etileno producida (área bajo la curva).

CHANNEL A INJECT

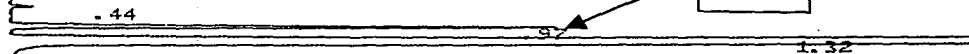


MS-1

CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	16	INDEX	16
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.011		0.46		112	01
2		0.774		0.99		8032	01
3		99.215		1.35		1029249	01
TOTAL		100.				1037393	

CHANNEL A INJECT

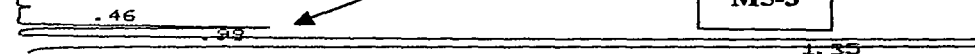


MS-2

CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	17	INDEX	17
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.019		0.44		188	01
2		0.719		0.97		7200	01
3		99.262		1.32		994274	01
TOTAL		100.				1001662	

CHANNEL A INJECT

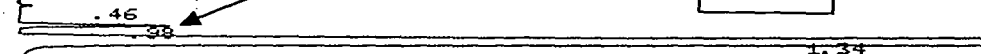


MS-3

CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	18	INDEX	18
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.011		0.46		112	01
2		0.34		0.98		3459	01
3		99.649		1.35		1013962	01
TOTAL		100.				1017533	

CHANNEL A INJECT



MS-4

CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	19	INDEX	19
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.01		0.46		112	01
2		0.125		0.98		2029	01
3		99.804		1.34		1092302	01
TOTAL		100.				1094444	

CHANNEL A INJECT

M5-5

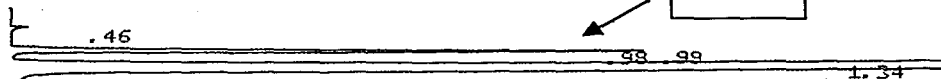


CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	20	INDEX	20
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.008		0.46		87	01
2		0.737		0.99		7390	01
3		99.255		1.35		1076745	01
TOTAL		100.				1084822	

CHANNEL A INJECT

M5-6



CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	10	INDEX	10
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.013		0.46		117	01
2		0.475		0.98		4322	02
3		0.484		0.99		4407	03
4		99.029		1.34		901902	01
TOTAL		100.				910748	

CHANNEL A INJECT

M5-7

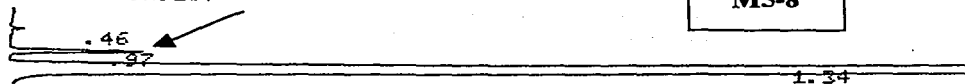


CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	11	INDEX	11
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.026		0.47		259	01
2		0.066		0.98		665	01
3		99.908		1.34		1002291	01
TOTAL		100.				1003215	

CHANNEL A INJECT

M5-8



CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	12	INDEX	12
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.01		0.46		100	01
2		0.186		0.97		1810	01
3		99.803		1.34		969101	01
TOTAL		100.				971011	

CHANNEL A INJECT

M5-9

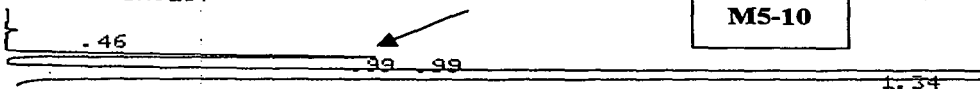


CH= "A" PS= 1.

FILE	1.	METHOD	0.	RUN	13	INDEX	13
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.008		0.45		83	01
2		0.291		0.98		3149	01
3		99.701		1.34		1077845	01
TOTAL		100.				1081077	

CHANNEL A INJECT

M5-10



CH= "A" PS= 1.

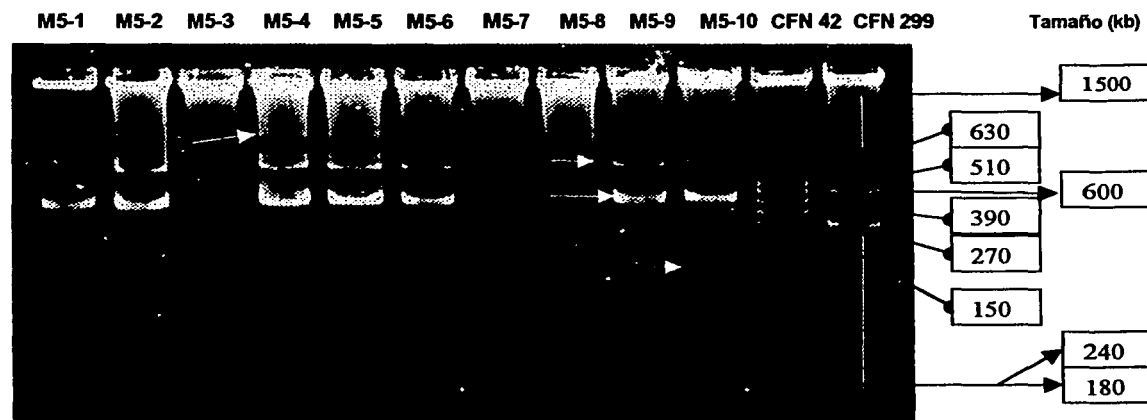
FILE	1.	METHOD	0.	RUN	14	INDEX	14
PEAK#		AREA%		RT		AREA	BC
1		0.008		0.46		73	01
2		0.264		0.99		2507	02
3		0.264		0.99		2508	03
4		99.465		1.34		945238	01
TOTAL		100.				950326	

Todas las cepas M5 tienen la capacidad de reducir acetileno en nódulos de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

1.4 Patrón de plásmidos

El patrón de plásmidos observado para cada una de las 10 cepas se muestra en la figura 3. Como control se utilizó la cepa CFN 42, cuyo patrón de plásmidos, características y tamaños se describen en Romero, *et.al.* (1991) y Brom, *et.al.* (1992). Otro control es la cepa CFN 299, cuyos plásmidos se describen en Martínez-Romero, *et.al.*, (1991) y Geniaux, *et.al.*, (1995).

Figura 3. Perfil de plásmidos de cepas M5



Las flechas señalan los plásmidos diferentes encontrados en las cepas M5. Las cepas M5-1, M5-2, M5-4, M5-5, M5-6 y M5-9 presentan el mismo patrón, donde se observan dos plásmidos de gran tamaño (mayores a 630 kb) y uno de aproximadamente 390. La cepa M5-10 presenta además de los anteriores uno adicional con un tamaño menor a 150 kb. Las cepas M5-3, M5-7 y M5-8 no presentan plásmidos. Esta prueba se repitió al menos 4 veces, observándose siempre el mismo patrón de plásmidos.

2. Colonización

2.1 Determinación de condiciones estándares de recolonización al maíz

a) Rizósfera

La siguiente tabla reporta los valores de bacterias rizosféricas encontradas en cada uno de los 6 tratamientos de este ensayo. Los valores presentados aquí son los promedios de las réplicas utilizadas. Para conocer los datos de cada una de las mismas, consultar el anexo 1.

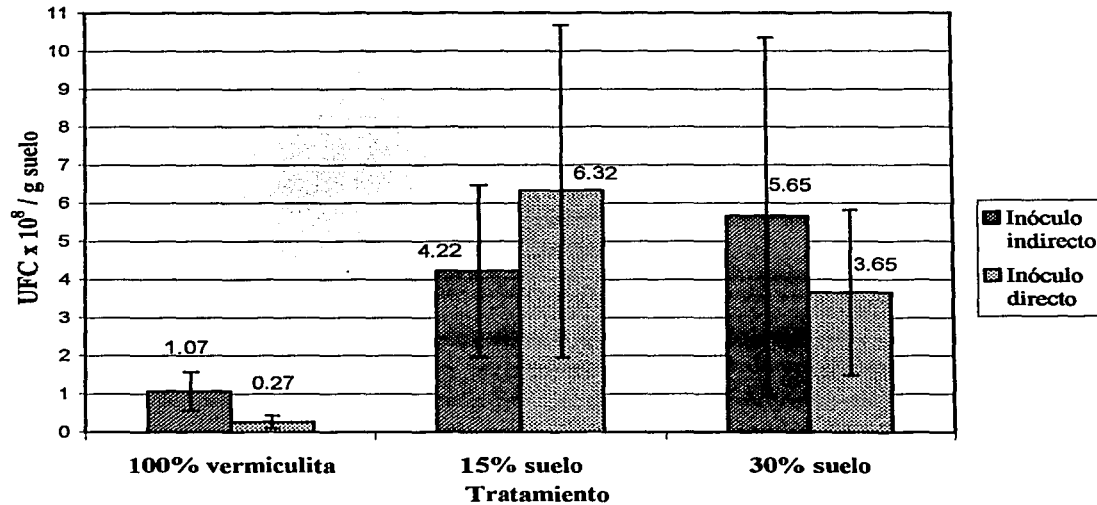
Tabla 5. Promedios de *R. etli* rizosféricas por tratamiento

Tratamiento	Promedio (UFC/ g suelo)	Desviación estándar
100% vermiculita Inóculo indirecto	1.07×10^8	5.03×10^7
100% vermiculita Inóculo directo	2.66×10^7	1.62×10^7
15% suelo Inóculo indirecto	4.22×10^8	2.25×10^8
15% suelo Inóculo directo	6.32×10^8	4.36×10^8
30% suelo Inóculo indirecto	5.65×10^8	4.70×10^8
30% suelo Inóculo directo	3.65×10^8	2.16×10^8
Controles	0	0

Como se puede observar, de manera general, los números poblacionales de las bacterias en la rizósfera se ubican en el orden de entre 10^7 y 10^8 . Estos resultados se pueden apreciar, comparativamente, en la gráfica de la figura 4.

Los valores de números de bacterias han sido ajustados todos a la escala de 10^8 , para facilitar su manejo.

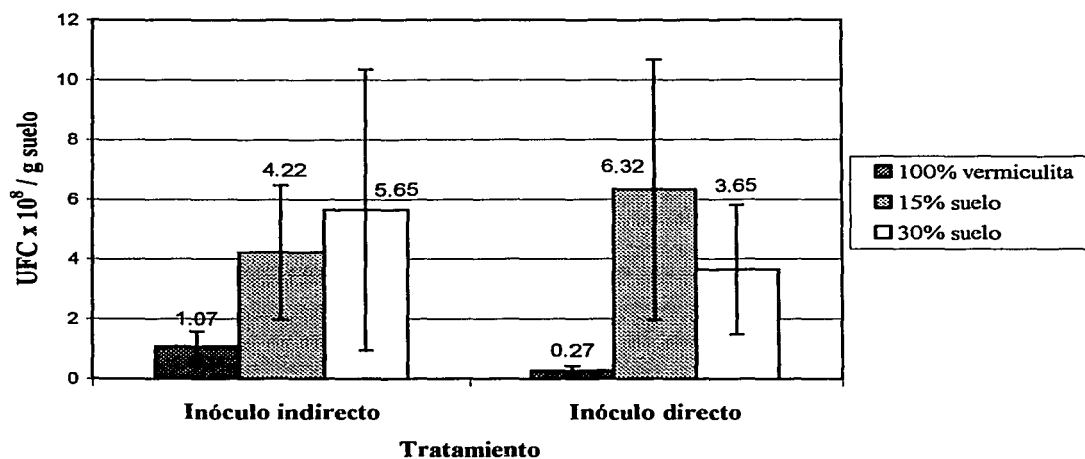
Figura 4. Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por tratamiento (1)



En esta gráfica se muestra el promedio de bacterias rizosféricas encontradas en cada uno de los tratamientos. Los datos se han agrupado de tal manera que se noten las diferencias entre el modo de inocular cuando se trata de uno u otro sustrato. Para las mezclas de 15% y 30% de suelo no hubo ninguna diferencia cuando se trató de inóculo directo o indirecto. Sin embargo, cuando el sustrato fue solamente vermiculita, el inóculo indirecto dio mejores resultados que el directo.

La siguiente gráfica nos muestra los mismos resultados, pero agrupados de tal forma que se noten las diferencias entre los sustratos utilizados cuando el inóculo fue directo o cuando el inóculo fue indirecto. Nuevamente todos los valores fueron ajustados a la escala de 10^8 .

Figura 5. Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por tratamiento (2)



Esta gráfica (fig. 5) muestra que cuando se utilizó un inóculo indirecto, no existieron diferencias entre los sustratos utilizados (las desviaciones estándar se sobrelapan). Esto implica que el tipo de sustrato no es un factor limitante cuando se hace una inoculación indirecta. En el caso de la inoculación directa, no hay diferencias al usar 15% ó 30% de suelo, pero sí al usar 100% vermiculita; hubo mejores resultados (en cuanto a números de *R. etli*) en los sustratos con suelo. Por lo tanto, es recomendable incluir ya sea un 15% ó un 30% de suelo en la mezcla.

Es interesante notar que, a pesar de que existen diferencias en el caso del sustrato de 100% vermiculita y los otros dos, en éste, los números de bacterias en la rizósfera no se encontraron muy por debajo del promedio de los otros tratamientos. En general, las bacterias rizosféricas se aislaron de este microambiente en números que van del orden de 10^7 a 10^8 .

Resumiendo, el número de bacterias rizosféricas fue mayor cuando se incluyó suelo en la mezcla de sustrato, no importando el modo de inoculación.

b) Endósfera

Al llevar a cabo el procedimiento de aislamiento de endófitas se encontró que por cada tratamiento había una cierta proporción de plantas o réplicas de las cuales no se aislaron bacterias. Así entonces, para cada tratamiento existe un número de réplicas “negativas” las cuales no fueron colonizadas. Un resumen de estos resultados se presenta en la siguiente tabla, así como los valores aproximados (sólo la potencia) del número de bacterias encontradas en aquellas réplicas “positivas”. Para las réplicas negativas no se han colocado ceros sino líneas, de tal manera que sea más fácil la visualización de los valores positivos.

Tabla 6. Valores aproximados de *R. etli* endófitas aisladas por réplica por tratamiento

Tratamiento	RÉPLICAS				
	1	2	3	4	5
100% vermiculita Inóculo indirecto	10 ⁶	10 ⁵	----	----	----
100% vermiculita Inóculo directo	----	----	----	----	----
15% suelo Inóculo indirecto	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	----	----
15% suelo Inóculo directo	10 ⁴	10 ³	----	----	----
30% suelo Inóculo indirecto	10 ⁶	10 ⁵	----	----	----
30% suelo Inóculo directo	10 ⁴	10 ⁴	----	----	----
Control	----	----	----	----	----

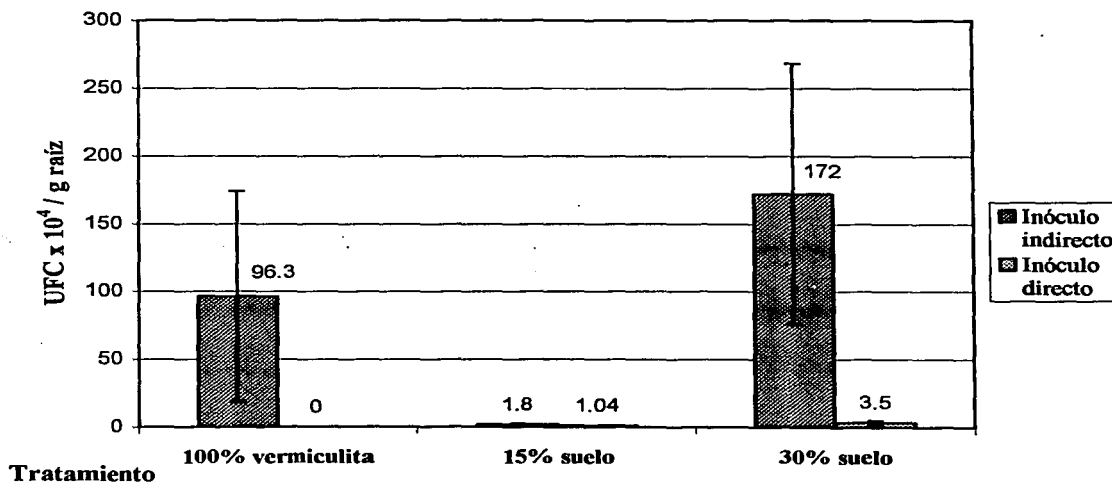
Del grupo de las réplicas positivas o plantas colonizadas se calcularon los promedios y sus desviaciones estándar para poder establecer comparaciones entre ellas. Estos valores se presentan en la siguiente tabla. Para conocer los valores de cada réplica positiva, consultar el anexo 1.

Tabla 7. Promedio de *R. etli* endófitas en réplicas positivas

Tratamiento	Promedio (UFC / g raíz)	Desviación estándar
100% vermiculita Inóculo indirecto	9.63×10^5	7.77×10^5
100% vermiculita Inóculo directo	0	0
15% suelo Inóculo indirecto	1.80×10^4	5.14×10^3
15% suelo Inóculo directo	1.04×10^4	5.10×10^2
30% suelo Inóculo indirecto	1.72×10^6	9.60×10^5
30% suelo Inóculo directo	3.50×10^4	1.40×10^4
Controles	0	0

De manera general, la cantidad de las bacterias endófitas se encuentran entre los órdenes de 10^3 y 10^6 , números que coinciden con otros estudios de bacterias endófitas (Fuentes-Ramírez, L.E., *et.al.*, 1999). Los resultados anteriores se grafican en la siguiente figura. Todos los valores han sido ajustados a la escala de 10^4 .

Figura 6. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por tratamiento (1)

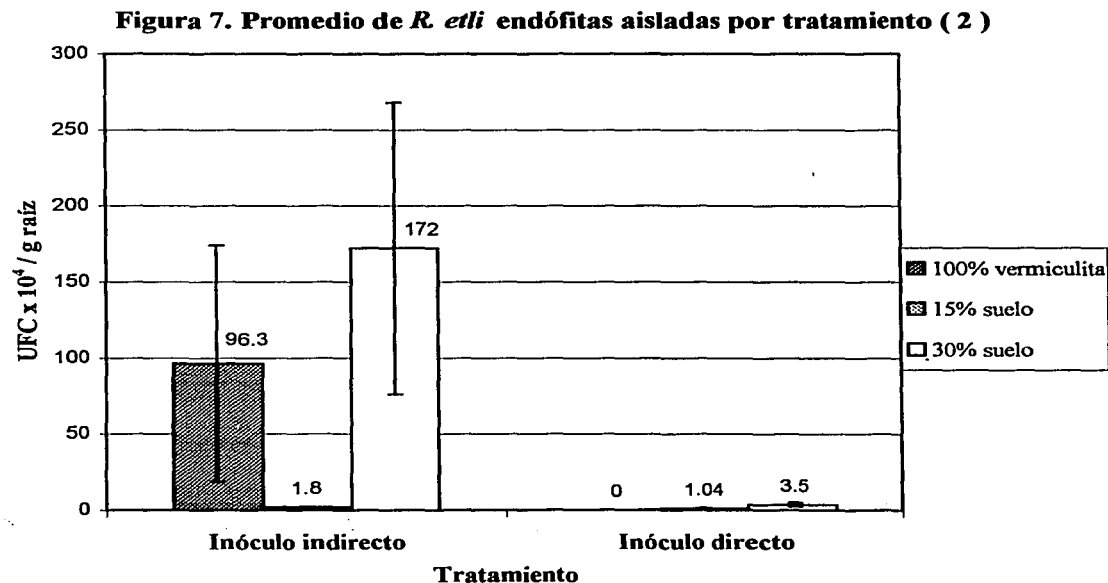


Esta gráfica (fig. 6) presenta los promedios de bacterias endófitas encontradas en cada tratamiento, agrupando los datos conforme al sustrato utilizado. Para cada sustrato se pueden ver las diferencias generadas por el tipo de inoculación.

Primero que nada, es importante notar que no se aislaron endófitas cuando el tratamiento fue de 100% vermiculita e inóculo directo.

Al utilizar 15% de suelo en el sustrato, no hubo diferencias en cuanto al tipo de inoculación. Sin embargo al usar 30% de suelo, el número de bacterias aisladas fue mayor en la inoculación indirecta, al igual que con 100% vermiculita.

La siguiente gráfica agrupa los datos de acuerdo al modo de inoculación, de tal manera que se aprecian las diferencias en el tipo de sustrato cuando se usa una u otra inoculación.



Cuando el inóculo fue directo existió una ligera ventaja usando suelo al 30% en el sustrato en lugar de 15%. En el caso de la inoculación indirecta, no hubo diferencia entre los sustratos con 100% vermiculita y 30% suelo, pero sí de éstos con el de 15% suelo. Sin embargo, es importante señalar de nuevo que del sustrato de 100% vermiculita no se aislaron endófitas

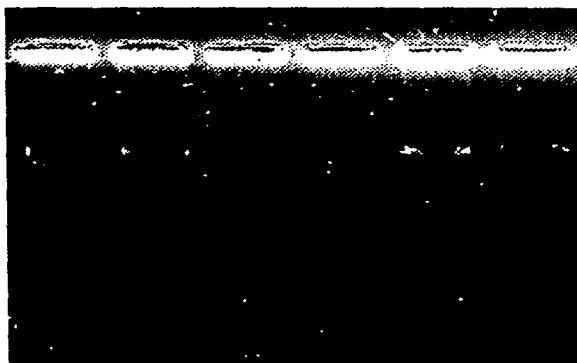
cuando se hizo la inoculación directa. Por lo cual se podría decir que del sustrato con 30% de suelo se aislaron más endófitas que del resto de los tratamientos.

Así entonces, de acuerdo con las gráficas de las figuras 6 y 7, el número de bacterias endófitas fue mayor cuando se utilizó un sustrato con 30% de suelo e inoculación indirecta.

Tanto en la rizósfera como en la endósfera, las bacterias encontradas corresponden a la misma bacteria inoculada. En la rizósfera el reconocimiento es fenotípico, es decir, las colonias obtenidas fueron comparadas con la morfología de las colonias del inóculo: colonias redondas, aperladas muy gomosas y que no crecen en LB. En el caso de la endósfera se utilizó, además del criterio morfológico, una comparación del patrón de plásmidos de las inoculadas con las aisladas de la endósfera. Los perfiles de plásmidos se presentan a continuación.

Figura 8. Perfil de plásmidos de *R. etli* endófitas con respecto a las cepas inoculadas

M5 A.a B.a B.b C.a C.b



M5: inóculo múltiple de cepas M5

A.a = endófitas de tratamiento : 100% vermiculita, inóculo indirecto

B.a = endófitas de tratamiento: 15% suelo, inóculo directo

B.b = endófitas de tratamiento: 15% suelo, inóculo indirecto

C.a = endófitas de tratamiento: 30% suelo, inóculo indirecto

C.b = endófitas de tratamiento: 30% suelo, inóculo directo

Los perfiles plasmídicos de las bacterias endófitas aisladas son idénticos a los de las bacterias inoculadas. Por tanto estos análisis corroboran que las endófitas corresponden a la bacteria inoculada.

2.2 Prueba de especificidad de colonización

a) Rizósfera

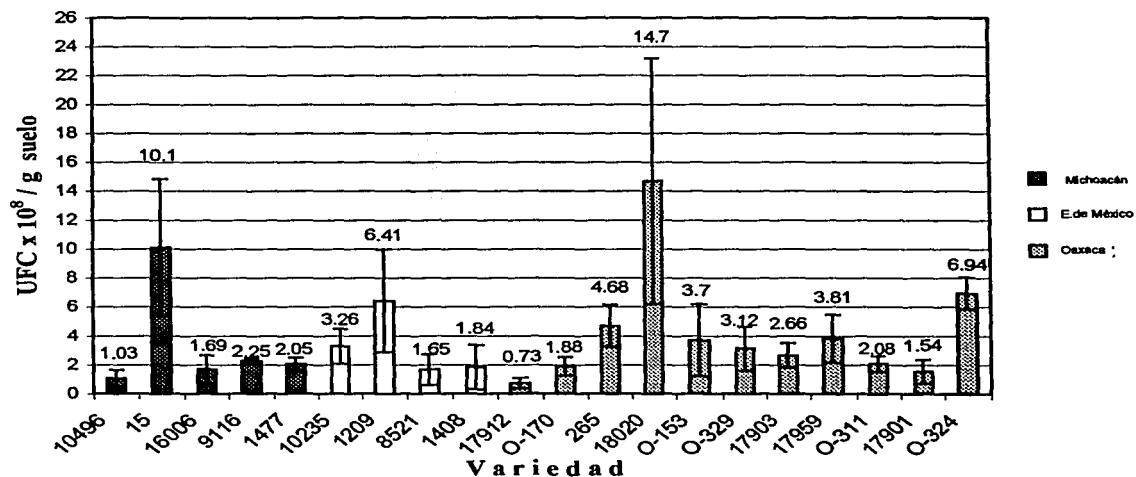
La siguiente tabla muestra el promedio del número de bacterias aisladas de la rizósfera de cada variedad estudiada en este ensayo. Los valores de cada una de las réplicas se pueden consultar en el anexo 1.

Tabla 8. Promedio de *R. etli* rizosféricas para cada variedad

Variedad	Promedio (UFC / g suelo)	Desviación estándar
10496	1.03×10^8	0.59×10^8
15	1.01×10^9	4.72×10^8
16006	1.69×10^8	9.60×10^7
9116	2.25×10^8	2.00×10^7
1477	2.05×10^8	4.20×10^7
10235	3.26×10^8	1.20×10^8
1209	6.41×10^8	3.55×10^8
8521	1.65×10^8	1.05×10^8
1408	1.84×10^8	1.53×10^8
17912	7.30×10^8	3.60×10^7
O-170	1.88×10^8	6.40×10^7
265	4.68×10^8	1.46×10^8
18020	1.47×10^9	8.48×10^8
O-153	3.70×10^8	2.48×10^8
O-329	3.12×10^8	1.53×10^8
17903	2.66×10^8	8.20×10^7
17959	3.81×10^8	1.65×10^8
O-311	2.08×10^8	5.40×10^7
17901	1.54×10^8	8.10×10^7
O-324	6.94×10^8	1.09×10^8
Controles	0	0

Al igual que en el ensayo anterior, los números de bacterias rizosféricas se ubicaron entre 10^7 y 10^9 , teniendo valores rizosféricos bastante homogéneos. Estos datos se aprecian mejor en la gráfica siguiente. Los valores han sido nuevamente ajustados a la escala de 10^8 para facilitar su representación gráfica. Las variedades se agruparon de acuerdo al estado de su procedencia.

Figura 9. Promedio *R. etli* rizosféricas aisladas por variedad de maíz



En esta gráfica (fig. 9) se puede apreciar la distribución de los datos en el intervalo mencionado. Para saber si existen diferencias entre estos promedios y, por tanto, diferencias en los números rizosféricos se llevó a cabo un análisis de varianzas. La razón de varianzas resultante fue 2.07, mayor que el valor crítico de Fisher (F), que fue de 1.75 (con $\alpha = 0.05$), con lo que se rechaza la hipótesis nula de que todas las medias son iguales. Es decir, existen diferencias significativas en los promedios rizosféricos que responden a la variedad de la que se trata. En el caso de la variedades de Michoacán, la variedad 15 dio mejores resultados que el resto. De las variedades que provienen del Estado de México no se distingue ninguna sobre las demás, mientras que, de las que vienen de Oaxaca, la variedad 18020 presenta mejores resultados que la mayoría de las de su grupo. De este mismo grupo, se distingue la variedad 17912 como la que peores resultados tuvo en cuanto a colonización rizosférica.

b) Endósfera

En cuanto a bacterias endófitas, primero que nada hay que mencionar que no todas las variedades inoculadas fueron colonizadas. Solamente 12 de las 20 variedades analizadas permitieron la entrada de las cepas M5 al interior de sus tejidos. Esto es, un 60% de las variedades analizadas fueron colonizadas con éxito por las cepas M5.

Al igual que en el ensayo anterior, para cada una de las variedades se inocularon 4 plantas o réplicas, de las cuales algunas fueron colonizadas ("réplicas positivas") y otras no ("réplicas negativas"). En la tabla siguiente se enlistan las variedades colonizadas y para cada una de ellas las réplicas negativas y positivas, estas últimas con los valores aproximados (potencia) de las endófitas aisladas.

Tabla 9. Valores aproximados de *R. etli* endófitas aisladas por réplica por variedad

Variedad	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
17959	10^4	10^3	10^4	10^4
10496	10^4	10^4	10^4	----
O-311	10^4	10^4	10^3	----
15	10^4	10^4	----	----
10235	10^4	10^3	----	----
17912	10^5	10^5	----	----
O-329	10^3	10^5	----	----
O-324	10^3	10^3	----	----
18020	10^3	10^4	----	----
17903	10^5	10^5	----	----
8521	10^4	10^4	----	----
O-153	10^3	10^4	----	----

Las variedades no colonizadas fueron las siguientes: 17901, 1408, 265, 9116, 1477, 16006, O-170 y 1209.

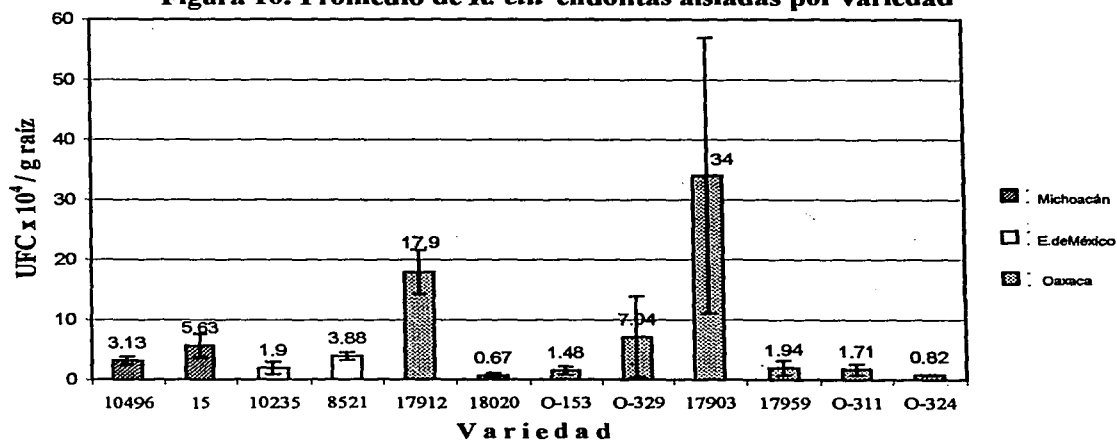
Es interesante notar que en todos los casos de plantas colonizadas, al menos en el 50% de las réplicas hay colonización. De las réplicas positivas se calcularon los promedios y sus desviaciones estándar. Estos valores se presentan en la siguiente tabla. Para conocer los valores de cada réplica positiva, consultar el anexo 1.

Tabla 10. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por réplica para cada variedad

Variedad	Promedio (UFC / g raíz)	Desviación estándar
10496	3.13×10^4	7.00×10^3
15	5.63×10^4	1.94×10^4
10235	1.90×10^4	1.02×10^4
8521	3.88×10^4	6.30×10^3
17912	1.79×10^5	3.70×10^4
18020	6.66×10^3	3.80×10^3
O-153	1.48×10^4	6.90×10^3
O-329	7.04×10^4	6.76×10^4
17903	3.40×10^5	2.30×10^5
17959	1.94×10^4	1.20×10^4
O-311	1.71×10^4	9.30×10^3
O-324	8.20×10^3	8.00×10^2
Control	0	0

Como se puede observar en la tabla, el número de bacterias endófitas se encuentra en el intervalo de 10^3 y 10^4 UFC/g de raíz, números que corresponden a lo esperado (y que coinciden con el ensayo anterior). Los datos de la tabla se grafican en la siguiente figura, con los datos ajustados a la escala de 10^4 . Así mismo, las variedades se encuentran agrupadas de acuerdo a su estado de origen.

Figura 10. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por variedad



Para afirmar que existen diferencias significativas entre los promedios observados, se llevó a cabo un análisis de varianza del que resultó lo siguiente: la razón de varianza = 2.55, que fue mayor al valor crítico de Fisher = 2.45 (con $\alpha = 0.05$), con lo que se rechazó la hipótesis nula de que todas las medias son iguales.

En el caso de las variedades de Michoacán, no hubo diferencias entre ellas pues las desviaciones estándar de sus promedios se sobrelapan. De las variedades del Estado de México, la 8521 presenta una mejor colonización endófito que la 10235. En cuanto a las variedades oaxaqueñas, la 17912 presentó una mejor colonización endófito que la mayoría de las mismas, y muy similar a la variedad 17903. El resto de las variedades presentaron una colonización similar entre ellas. En general, la variedad 17912 dio mejores resultados que el resto en la endósfera, con excepción de la 17903.

Resumiendo, la variedad 17912 tuvo números bajos de *R. etli* en la rizósfera con respecto a las demás, pero números altos en la endósfera. Las variedades 15 y 18020 tuvieron números altos en la rizósfera, pero no altos (con respecto a las demás) en la endósfera. A continuación se presenta la tabla 11 que resume las tendencias de algunas variedades que se destacaron en este análisis.

Tabla 11. Comportamiento de cepas M5 en rizósfera y endósfera de algunas variedades de maíz

Variedad	Rizósfera	Endósfera
15	++	+-
18020	++	--
17912	--	++
17903	+-	++

++ : buena colonización +-: colonización normal con respecto a las demás -- : mala colonización

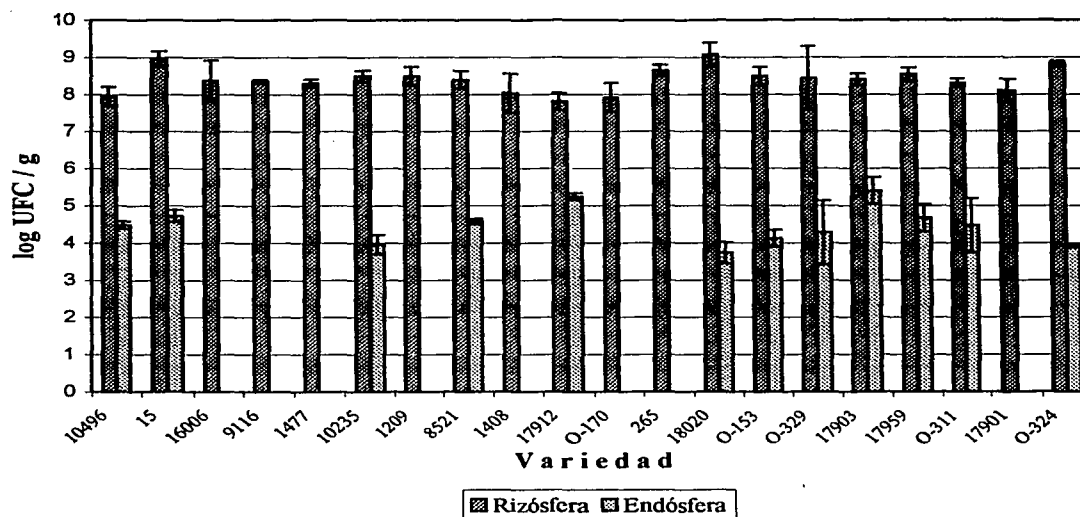
A continuación se muestra tabla 12 y su gráfica (fig. 11) correspondiente donde se pueden comparar los números que se obtienen en la rizósfera, endósfera y el inóculo para cada variedad.

Tabla 12. Comparación del número de *R. etli* en inóculo, rizósfera y endósfera

Variedad	Inóculo (UFC/ ml)	Rizósfera (UFC/g suelo)	Endósfera (UFC/g raíz)
10496	9.32×10^9	$1.03 \times 10^8 \pm 0.59 \times 10^8$	$3.13 \times 10^4 \pm 0.70 \times 10^4$
15	9.16×10^8	$1.01 \times 10^9 \pm 4.72 \times 10^8$	$5.63 \times 10^4 \pm 1.94 \times 10^4$
16006	5.44×10^8	$1.69 \times 10^8 \pm 0.96 \times 10^8$	0
9116	1.80×10^8	$2.25 \times 10^8 \pm 0.20 \times 10^8$	0
1477	1.24×10^8	$2.05 \times 10^8 \pm 0.42 \times 10^8$	0
10235	1.12×10^9	$3.26 \times 10^8 \pm 1.20 \times 10^8$	$1.90 \times 10^4 \pm 1.02 \times 10^4$
1209	1.52×10^9	$6.41 \times 10^8 \pm 3.55 \times 10^8$	0
8521	1.53×10^9	$1.65 \times 10^8 \pm 1.05 \times 10^8$	$3.88 \times 10^4 \pm 0.63 \times 10^4$
1408	5.08×10^9	$1.84 \times 10^8 \pm 1.53 \times 10^8$	0
17912	1.12×10^9	$7.30 \times 10^7 \pm 0.36 \times 10^8$	$1.79 \times 10^5 \pm 0.37 \times 10^5$
O-170	6.40×10^7	$1.88 \times 10^8 \pm 0.64 \times 10^8$	0
265	2.64×10^{10}	$4.68 \times 10^8 \pm 1.46 \times 10^8$	0
18020	3.04×10^{10}	$1.47 \times 10^9 \pm 8.48 \times 10^8$	$6.6 \times 10^3 \pm 3.80 \times 10^3$
O-153	1.32×10^8	$3.70 \times 10^8 \pm 2.48 \times 10^8$	$1.48 \times 10^4 \pm 0.69 \times 10^4$
O-329	4.24×10^7	$3.12 \times 10^8 \pm 1.53 \times 10^8$	$7.04 \times 10^4 \pm 6.76 \times 10^4$
17903	7.80×10^8	$2.66 \times 10^8 \pm 0.82 \times 10^8$	$3.40 \times 10^5 \pm 2.30 \times 10^5$
17959	5.44×10^8	$3.81 \times 10^8 \pm 1.65 \times 10^8$	$1.94 \times 10^4 \pm 1.20 \times 10^4$
O-311	1.00×10^8	$2.08 \times 10^8 \pm 0.54 \times 10^8$	$9.78 \times 10^4 \pm 0.93 \times 10^4$
17901	7.32×10^9	$1.54 \times 10^8 \pm 0.81 \times 10^8$	0
O-324	1.36×10^7	$6.94 \times 10^8 \pm 1.09 \times 10^8$	$8.20 \times 10^3 \pm 0.80 \times 10^3$
Controles	0	0	0

Los datos de rizósfera y endósfera se grafican en la figura 11, donde se aprecia la tendencia de números poblacionales entre estos dos microambientes. Se excluye de la gráfica el valor de los inóculos por no tratarse de un promedio, pero la tendencia con respecto a éste se puede observar en la tabla 12. Los valores fueron transformados a sus logaritmos de tal manera que fueran comparables gráficamente.

Figura 11. Comparación de promeidos de *R. etli* rizosféricas y endófitas aisladas por variedad

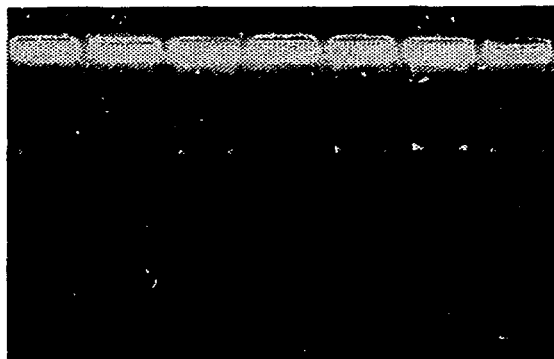


Tanto la tabla 12 como la gráfica de la figura 11 nos dejan ver que la tendencia general fue que las bacterias se mantuvieran en mayor número en la rizósfera que en la endósfera: se recuperaron, aproximadamente, 10,000 veces más bacterias en rizósfera que en endósfera. La cantidad de bacterias rizosféricas permaneció ligeramente por debajo de la cantidad del inóculo al cabo de 15 días. Decreció ligeramente, sin embargo, fue constante dentro de un intervalo en todos los casos. En resumen, las poblaciones se distribuyeron, de mayor a menor, en el siguiente orden: Inóculo > Rizósfera > Endósfera, al cabo de 15 días.

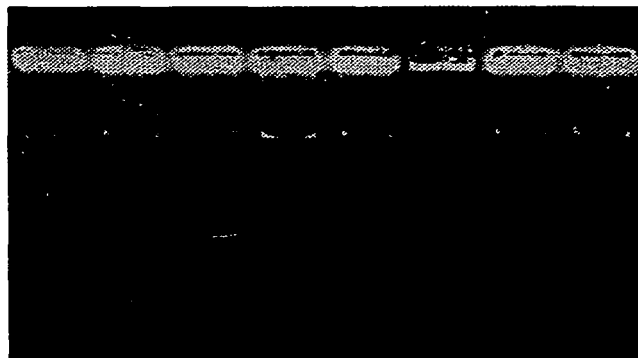
Para corroborar que las bacterias aisladas del interior de los tejidos eran las mismas que las inoculadas, nuevamente se observó el perfil de plásmidos de las aisladas, comparándolos con las inoculadas. Los perfiles de ambas coincidieron, con lo que se corroboró lo anterior.

Figura 12. Perfil de plásmidos de *R. etli* aisladas e inoculadas

M5 10496 18020 15 17903 10235 17912



M5 8521 O-329 O-324 17959 O-311 O-153 O-329



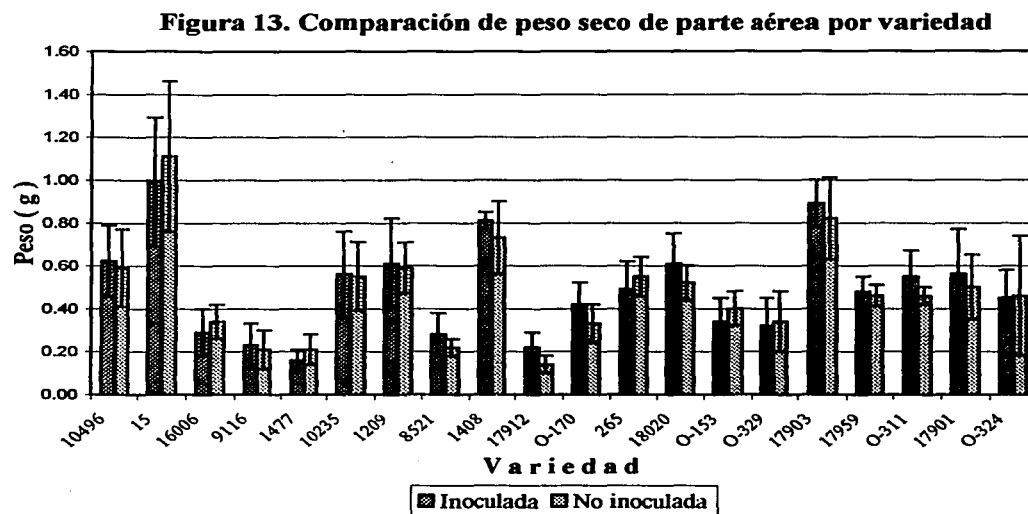
M5 = inóculo múltiple de cepas M5

El resto = endófitas aisladas de la variedad indicada

2.3 Ensayo de promoción de crecimiento y actividad reductora de acetileno (ARA)

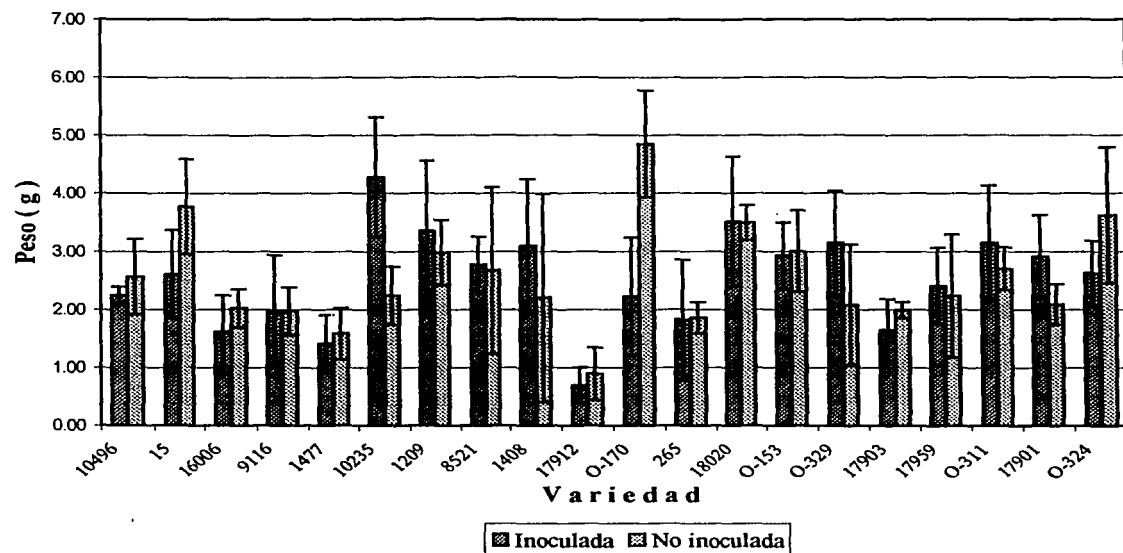
Posterior a la inoculación de 8 plantas por variedad y al cabo de 15 días de crecimiento se deshidrataron las plantas de acuerdo al protocolo descrito. Así mismo, previo a la deshidratación, se midió la actividad de reducción de acetileno de 4 plantas por variedad. Esto para detectar actividad de nitrogenasa de *R. etli* endófito, en caso de haberla, y para analizar si hubo correlación entre aumento de peso seco y actividad de nitrogenasa (y por tanto fijación de nitrógeno).

La figura 13 muestra los valores de peso seco obtenidos para la parte aérea (tallos y hojas) de la planta, mientras que la figura 14 presenta los valores de la raíz.



En la gráfica anterior (fig. 13) se puede ver el promedio del peso de la parte aérea de las plantas inoculadas comparadas con su control (plantas no inoculadas) para cada una de las 20 variedades estudiadas. En ningún caso existió ventaja o desventaja de las plantas inoculadas sobre las no inoculadas. Por tanto, no hay evidencias de promoción de crecimiento, posterior a la inoculación, en ninguna de las 20 variedades utilizadas en este estudio.

Figura 14. Comparación de peso seco de raíz por variedad



En esta gráfica (fig. 14) se pone en evidencia que en la mayoría de las variedades no existió diferencia en plantas inoculadas y su control. Sin embargo, las variedades 10235 y la O-170 sí presentaron diferencias. En la primera, las plantas inoculadas tuvieron un mayor peso seco que las control, mientras que en la O-170, al parecer hubo un efecto negativo sobre el peso seco de la raíz en comparación con las plantas no inoculadas. En ninguno de los dos casos ocurrió algo semejante para la parte aérea. El resto de las variedades no presentaron ventaja o desventaja con respecto a su control.

En cuanto al ensayo de ARA ninguna de las variedades estudiadas fue positiva. Esto es, ninguna de las endófitas presentes en el interior de las raíces del maíz fijó nitrógeno dentro de éstas.

2.4 Correlación entre cepas y capacidad de colonización

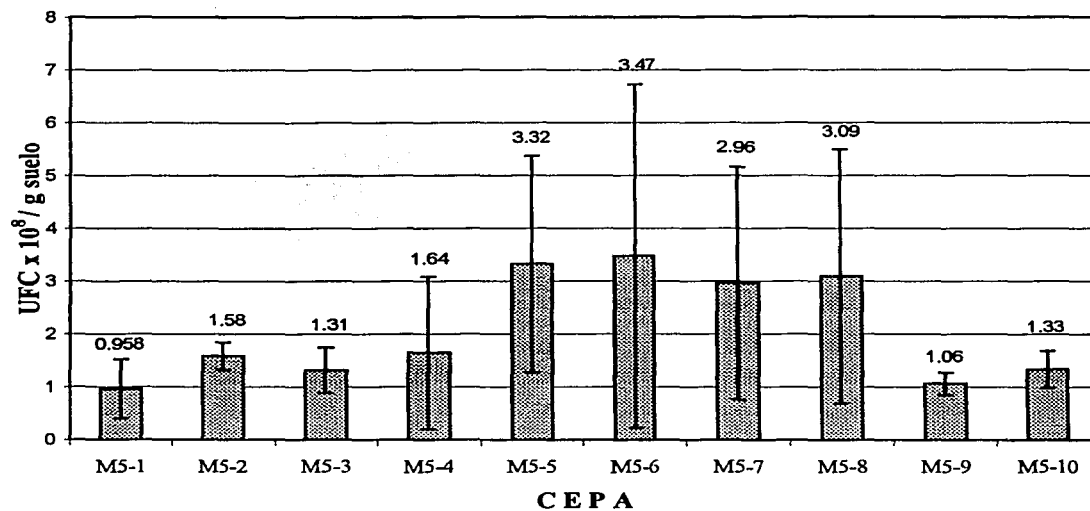
En este ensayo se inocularon las cepas M5, cada una por separado en 4 plantas de maíz. Como control se utilizaron plantas sin inocular. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas y gráficas. Los valores para cada réplica se pueden consultar también en el anexo 1.

a) Rizósfera

Tabla 13. Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por cepa inoculada

Cepa	Promedio	Desviación estandar
M5-1	9.58×10^7	5.60×10^7
M5-2	1.58×10^8	2.60×10^7
M5-3	1.31×10^8	4.30×10^7
M5-4	1.64×10^8	1.44×10^8
M5-5	3.32×10^8	2.05×10^8
M5-6	3.47×10^8	3.25×10^8
M5-7	2.96×10^8	2.20×10^8
M5-8	3.09×10^8	2.40×10^8
M5-9	1.06×10^8	2.10×10^7
M5-10	1.33×10^8	3.50×10^7
Control	0	0

Figura 15. Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por cepa inoculada



En esta gráfica (fig. 15) se observa que en todos los casos las bacterias rizosféricas se mantuvieron en números del orden de 10^8 , coincidiendo con los dos ensayos anteriores. También se puede observar que no existieron diferencias significativas entre cada una de las cepas utilizadas. Esto se comprobó con un análisis de varianzas, donde la razón de varianzas (0.96) fue menor al valor crítico de Fisher (2.28) (con $\alpha = 0.05$), con lo que se aceptó la hipótesis nula de que todas las medias son iguales. Esto es, ninguna de las 10 cepas M5 colonizó la rizósfera del maíz criollo de Cholula mejor que otra, en términos de números de población.

b) Endósfera

Al igual que en los experimentos anteriores, en el caso de la endósfera, no todas las plantas inoculadas fueron colonizadas, por lo que también hay réplicas positivas y réplicas negativas. A continuación se muestra la tabla donde se indican los valores aproximados de las positivas.

Tabla 14. Valores aproximados de *R. etli* endófitas aisladas por réplica por tratamiento

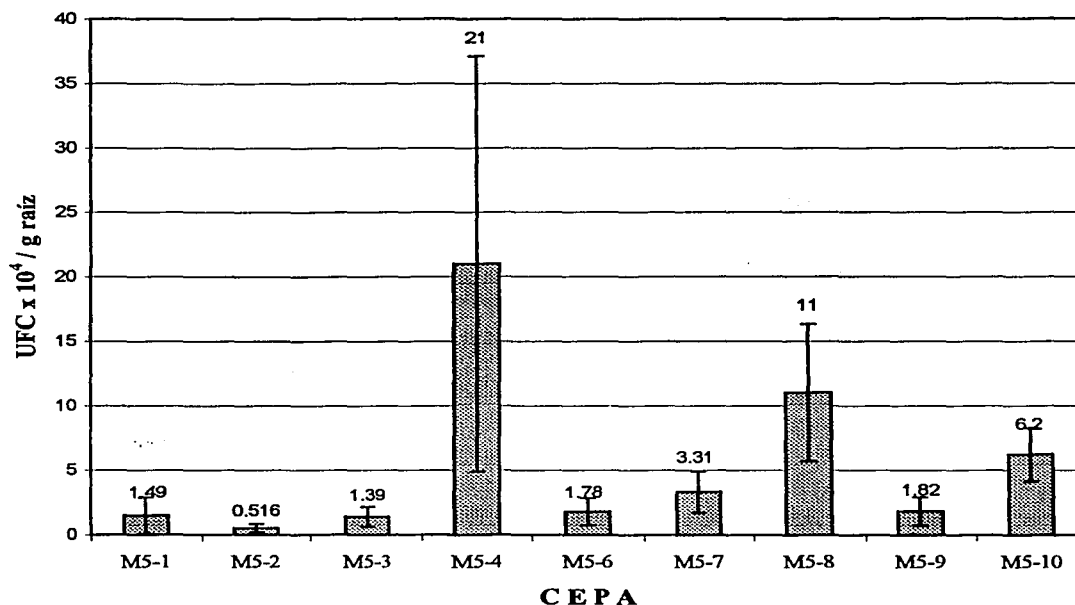
Tratamiento	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4
M5 -1	10^3	10^3	10^4	----
M5 -2	10^3	10^3	----	----
M5 -3	10^3	10^4	----	----
M5 -4	10^3	10^5	----	----
M5 -5	----	----	----	----
M5 -6	10^3	10^4	----	----
M5 -7	10^4	10^4	----	----
M5 -8	10^4	10^5	----	----
M5 -9	10^4	10^3	10^4	----
M5 -10	10^4	10^4	----	----

Los valores exactos para cada planta colonizada se pueden consultar en el anexo 1. En la siguiente tabla y su gráfica correspondiente, se ilustran los promedios de las plantas colonizadas.

Tabla 15. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por cepa inoculada

Cepa	Promedio	Desviación estándar
M5 -1	1.49×10^4	1.41×10^4
M5 -2	5.16×10^3	3.37×10^3
M5 -3	1.39×10^4	7.53×10^3
M5 -4	2.10×10^5	1.61×10^5
M5 -6	1.78×10^4	1.06×10^4
M5 -7	3.31×10^4	1.60×10^4
M5 -8	1.10×10^5	5.31×10^4
M5 -9	1.82×10^4	1.09×10^4
M5-10	6.20×10^4	2.06×10^4
Controles	0	0

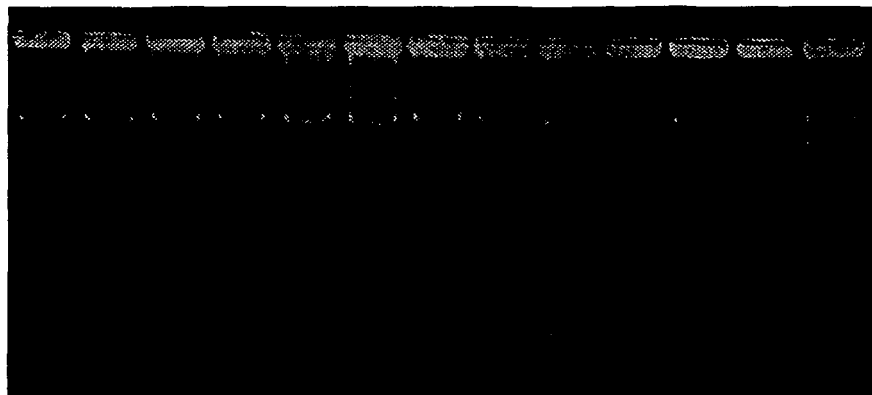
Figura 16. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por cepa inoculada



Primeramente, es importante resaltar que la cepa M5-5 no fue reaislada del interior de las plantas inoculadas, mientras que el resto de las cepas sí. Para corroborar este resultado se repitió el experimento, bajo las mismas condiciones y con 5 réplicas, obteniendo los mismos resultados. Esto es, la cepa M5-5 no colonizó individualmente al maíz. Dada esta situación, se tomaron 7 colonias aisladas obtenidas del inóculo y 5 colonias de los cultivos resultantes de la rizósfera, para hacer un perfil de plásmidos. Esto con la finalidad de averiguar si su contenido plasmídico seguía intacto, pues cabía la posibilidad de que la cepa hubiese perdido un plásmido (ya sea en el inóculo o en la rizósfera) y con él quizá también la capacidad colonizadora. El perfil de plásmidos fue el siguiente:

Figura 17. Perfil de plásmidos de cepa M5-5 de inóculo y rizósfera

I1 I2 I3 I4 I5 I6 I7 R1 R2 R3 R4 R5 CFN 42



**I1 a I7 = Inóculo
R1 a R5 = Rizósfera
CFN 42 como control**

En la figura 17 se puede ver que los plásmidos de las colonias del inóculo fueron iguales entre sí e iguales con las colonias provenientes de la rizósfera. Este ensayo se repitió otra vez más con colonias diferentes de los mismos orígenes, y se obtuvieron los mismos resultados. Si se compara con el perfil obtenido de la cepa M5-5 en el primer perfil mostrado (en el capítulo de caracterización), se puede ver que se trata del mismo perfil y que no se ha perdido plásmido alguno.

Con respecto a las demás cepas, todas fueron reaisladas de la endósfera al menos en el 50% de las réplicas. Para averiguar si existen diferencias significativas entre los promedios de datos obtenidos se realizó un análisis de varianza. Se obtuvo una razón de varianza de 2.85, menor al valor crítico de Fisher (2.95) ($\alpha = 0.05$), con lo que se aceptó la hipótesis nula de que todas las medias son iguales. Así entonces, no existen diferencias significativas entre los promedios de endófitas aisladas después de una inoculación individual de las cepas M5. Por lo tanto, ninguna de las cepas M5 tiene mejor capacidad de colonización que otra. Cabe mencionar que

todas las cepas que colonizaron la endósfera se reaislaron en números del orden de 10^3 a 10^5 , coincidiendo con lo anteriormente mencionado para este microambiente.

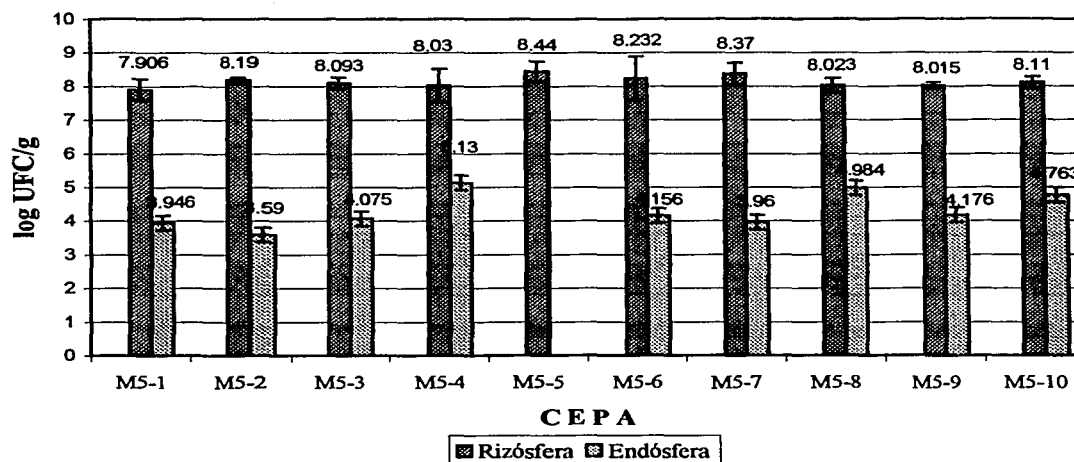
Resumiendo, todas las cepas M5, excepto la M5-5, tienen el mismo potencial de colonizar tanto la rizósfera como la endósfera del maíz criollo de Cholula. La cepa M5-5 perdió la capacidad de recolonización al maíz, pero coloniza la rizósfera al igual que el resto.

La tabla 16 y su gráfica correspondiente (fig. 18) muestran un resumen de datos donde se indica la cantidad de inóculo, lo obtenido en la rizósfera y lo obtenido en la endósfera por cada cepa.

Tabla 16. Comparación de número de *R. etli* en inóculo, rizósfera y endósfera por cepa

Cepa	Inóculo (UFC/ml)	Rizósfera (UFC/g suelo)	Endósfera (UFC/g raíz)
M5 - 1	1.46×10^9	$9.58 \times 10^7 \pm 5.60 \times 10^7$	$1.49 \times 10^4 \pm 1.41 \times 10^4$
M5 - 2	7.2×10^8	$1.58 \times 10^8 \pm 2.60 \times 10^7$	$5.16 \times 10^3 \pm 3.37 \times 10^3$
M5 - 3	7.6×10^8	$1.31 \times 10^8 \pm 4.30 \times 10^7$	$1.39 \times 10^4 \pm 7.53 \times 10^3$
M5 - 4	4.9×10^8	$1.64 \times 10^8 \pm 1.44 \times 10^8$	$2.10 \times 10^5 \pm 1.61 \times 10^5$
M5 - 5	1.21×10^9	$3.32 \times 10^8 \pm 2.05 \times 10^8$	0
M5 - 6	3.7×10^8	$3.47 \times 10^8 \pm 3.25 \times 10^8$	$1.78 \times 10^4 \pm 1.06 \times 10^4$
M5 - 7	1.66×10^8	$2.96 \times 10^8 \pm 2.20 \times 10^8$	$3.31 \times 10^4 \pm 1.60 \times 10^4$
M5 - 8	9.9×10^7	$1.15 \times 10^8 \pm 2.40 \times 10^8$	$1.10 \times 10^5 \pm 5.31 \times 10^4$
M5 - 9	1.06×10^8	$1.06 \times 10^8 \pm 2.10 \times 10^7$	$1.82 \times 10^4 \pm 1.09 \times 10^4$
M5 - 10	2.46×10^8	$1.33 \times 10^8 \pm 3.50 \times 10^7$	$6.20 \times 10^4 \pm 2.06 \times 10^4$
Control	0	0	0

Figura 18. Comparación de promedios de *R. etli* rizosféricas y endófitas



En la figura 18 sólo se grafican los valores rizosféricos y endófitos para cada cepa. No se incluye al inóculo por no tratarse de un promedio. Así mismo, los valores fueron transformados a sus logaritmos para hacerlos comparables en la gráfica.

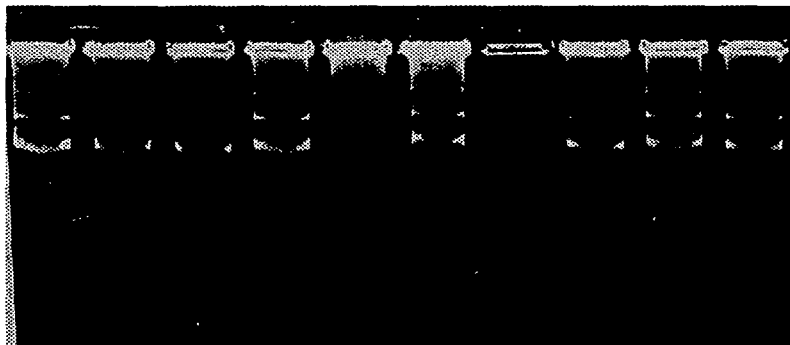
La tendencia observada es la misma que para el ensayo anterior. Se puede ver que la cantidad de bacterias en la rizósfera se mantuvo más o menos cerca de lo inoculado, en números del orden de 10^8 , mientras que en la endósfera los números poblacionales decrecieron considerablemente, manteniéndose constantes en números del orden de alrededor de 10^4 . Nuevamente se recuperaron 10,000 veces menos bacterias en la endósfera que en la rizósfera. Es interesante notar que incluso para la cepa M5-5 los valores de la rizósfera quedaron dentro del intervalo esperado.

Para corroborar que las cepas aisladas como endófitas corresponden a la cepa inoculada, se realizaron los perfiles de plásmidos correspondientes. Éstos se muestran en la figura 19. Cada carril izquierdo corresponde a la cepa inoculada y el derecho a la cepa aislada como endófitas. La cepa endófitas está indicada con una apóstrofe en cada carril.

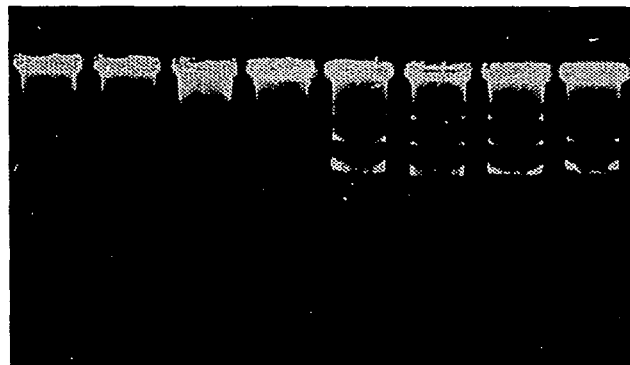
En este perfil plasmídico se puede observar que cada endófito corresponde efectivamente con la cepa que fue inoculada en el ensayo, por lo tanto, las cepas aisladas sí corresponden a las cepas inoculadas.

Figura 19. Perfil de plásmidos de cepas inoculadas y aisladas como endófitas

M5-1 M5-1' M5-2 M5-2' M5-3 M5-4 M5-3' M5-4' M5-6 M5-6'



M5-7 M5-7' M5-8 M5-8' M5-9 M5-9' M5-10 M5-10'



2.5 Colonización del maíz en presencia de *Phaseolus vulgaris*

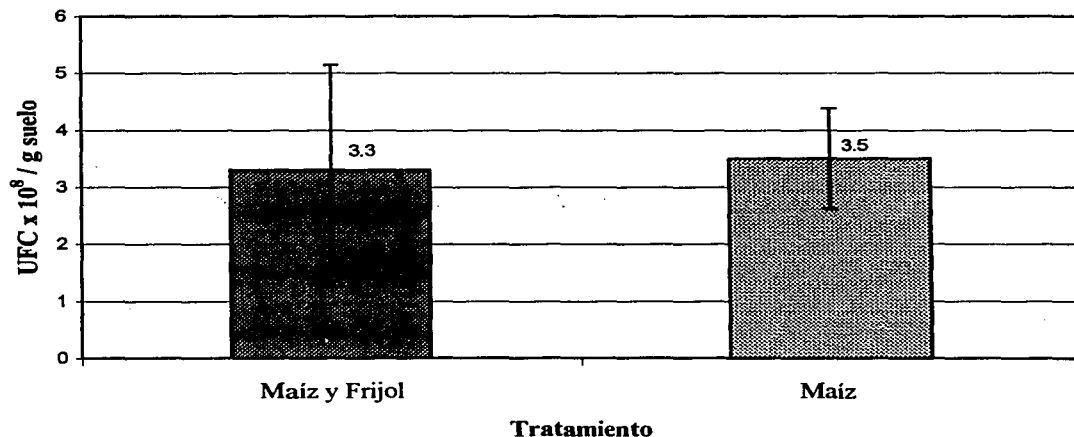
Los resultados obtenidos en este ensayo se presentan en las tablas y gráficas siguientes. Los valores de cada réplica individual pueden consultarse en el anexo 1. Se inocularon 10 plantas de maíz acompañadas de frijol y 5 de maíz solo. Como controles se tuvieron 10 plantas de maíz con frijol y 5 de maíz solo, ambas sin inocular.

a) Rizósfera

Tabla 17 . Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por tratamiento

Tratamiento	Promedio (UFC / g suelo)	Desviación estándar
Maíz y frijol inoculados	3.30×10^8	1.84×10^8
Maíz solo inoculado	3.50×10^8	8.80×10^7
Maíz y frijol sin inocular	0	0
Maíz solo sin inocular	0	0

Figura 20. Promedio de *R. etli* rizosféricas aisladas por tratamiento



Estos resultados indican que no existe una diferencia entre lo encontrado para ambos tratamientos. Los números de bacterias rizosféricas en los dos casos fueron similares y se ubicaron dentro del intervalo esperado, esto es, 10^8 . Las poblaciones en la rizósfera fueron iguales tanto en maíz solo como en maíz acompañado de frijol.

b) Endósfera

Nuevamente, en la endósfera se obtuvieron plantas inoculadas que no fueron colonizadas, pero al mismo tiempo plantas inoculadas sí colonizadas (réplicas negativas y positivas). Las tablas 18 y 19 muestran los valores aproximados de cada una de las plantas inoculadas de este ensayo. En ninguno de los controles (plantas no inoculadas) se encontraron *R. etli* endófitas.

Tabla 18. Valores aproximados de *R. etli* endófitas obtenidas en maíz con frijol

Réplica	Maíz y frijol
Planta 1	----
Planta 2	----
Planta 3	----
Planta 4	10^5
Planta 5	10^5
Planta 6	10^3
Planta 7	----
Planta 8	10^5
Planta 9	10^3
Planta 10	----

Las líneas --- corresponden a ceros.

Tabla 19. Valores aproximados de *R. etli* endófitas obtenidas de maíz sin frijol

Réplica	Maíz solo
Planta 1	----
Planta 2	10^4
Planta 3	10^4
Planta 4	10^4
Planta 5	----

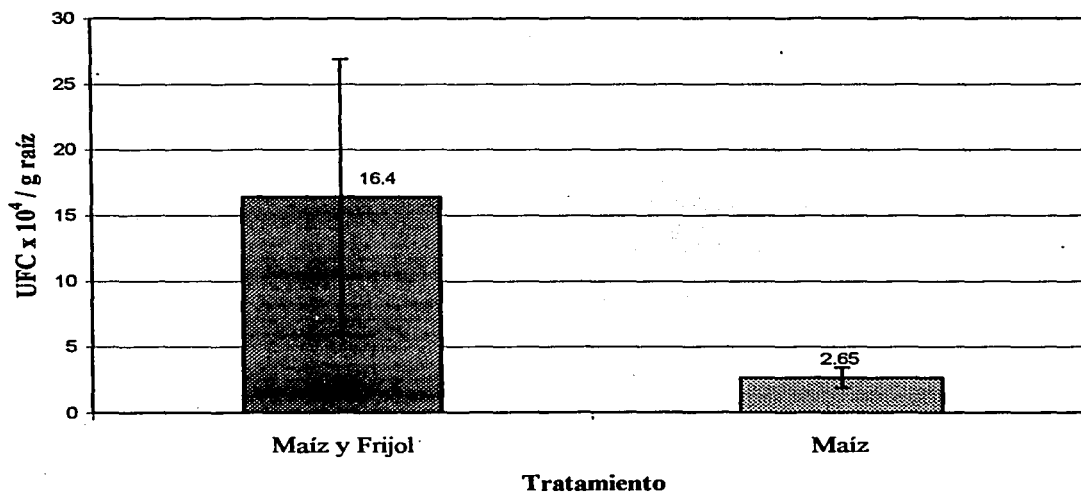
Las líneas --- corresponden a ceros.

La tabla 20 y la gráfica de la figura 21 muestran los promedios de *R. etli* endófitas aisladas de las réplicas positivas.

Tabla 20. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por tratamiento (réplicas positivas)

Tratamiento	Promedio (UFC / g raíz)	Desviación estándar
Maíz y frijol inoculados	1.64×10^5	1.05×10^5
Maíz solo inoculado	2.65×10^4	7.70×10^3
Maíz y frijol sin inocular	0	0
Maíz sin inocular	0	0

Figura 21. Promedio de *R. etli* endófitas aisladas por tratamiento

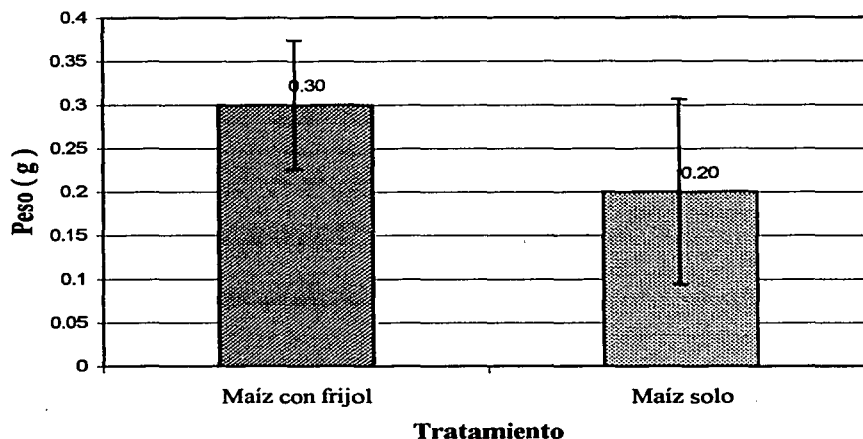


Como se puede observar en la figura 21, se aislaron endófitas de ambos tratamientos, con números poblacionales dentro del intervalo de 10^4 a 10^5 . En este caso, el número de endófitas aislado de las plantas de maíz inoculadas con frijol es más alto que el de plantas de maíz solas. Estas últimas con un promedio de endófitas del orden de 10^4 y las primeras en el orden de 10^5 .

A pesar de que la magnitud no es tan grande, existe diferencia entre los promedios de ambos tratamientos pues no se sobrelapan sus desviaciones estándar.

Para evaluar si el efecto observado en la endósfera implicó un beneficio para la planta de maíz, se compararon los valores de peso seco de las plantas de maíz que crecieron con frijol y las de maíz solo, ambas inoculadas. Los valores obtenidos se grafican en la figura 22.

Figura 22. Comparación del promedio de peso seco de plantas de maíz



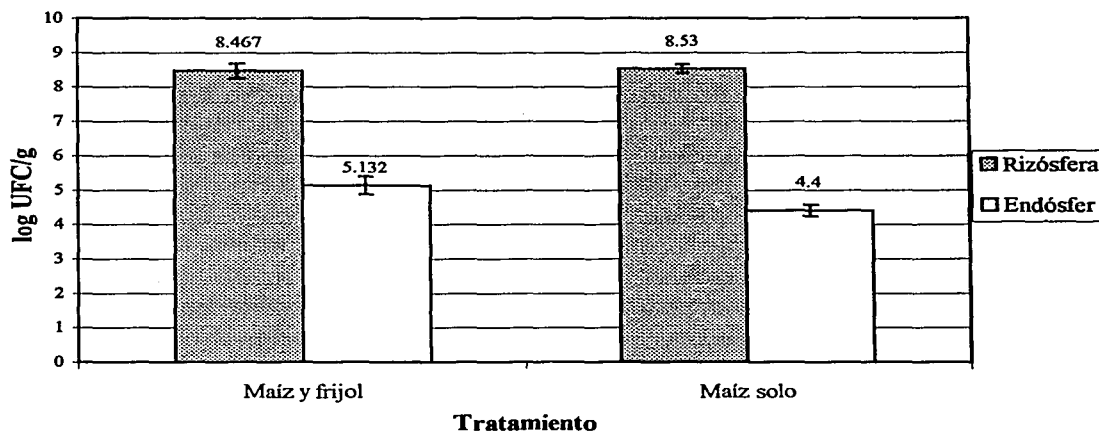
Los promedios del peso seco de las plantas no son diferentes, por lo que la presencia de una mayor cantidad de *R. etli* endófitas en el maíz con frijol no promovió el crecimiento de la planta.

A continuación se muestra una comparación entre inóculo, rizósfera y endósfera, en cada tratamiento, para distinguir la tendencia de los números poblacionales en estos microambientes. Los valores en la gráfica fueron transformados a sus logaritmos para hacerlos comparables.

Tabla 21. Comparación de número de *R. etli* en inóculo, rizósfera y endósfera para cada tratamiento

Tratamiento	Inóculo (UFC/ml)	Rizósfera (UFC/g suelo)	Endósfera (UFC/g raíz)
Maíz y Frijol	8.7×10^7	$3.30 \times 10^8 \pm 1.84 \times 10^8$	$1.64 \times 10^5 \pm 1.05 \times 10^5$
Maíz solo	7.7×10^7	$3.50 \times 10^8 \pm 8.80 \times 10^7$	$2.65 \times 10^4 \pm 7.70 \times 10^3$
Controles	0	0	0

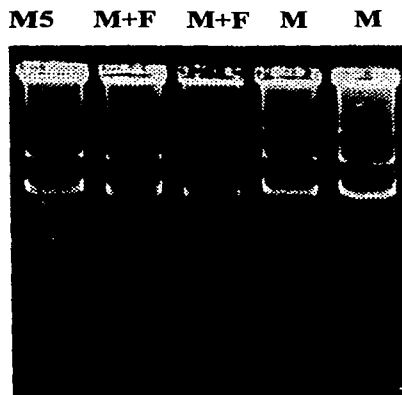
Figura 23. Comparación de promedios *R. etli* rizosféricas y endófitas para cada tratamiento



Primeramente, se puede observar que de la rizósfera se aisló una mayor cantidad de bacterias (10 veces más) que lo inoculado inicialmente, contrario a lo que se había observado hasta ahora en los ensayos anteriores. Sin embargo, la tendencia global entre rizósfera y endósfera permaneció igual. Esto es, los números aislados de la endósfera fueron 10,000 veces menores en comparación con lo encontrado en la rizósfera (tabla. 21).

En este ensayo, igualmente, se analizaron los perfiles de plásmidos de las cepas aisladas de la endósfera, comparándolos con los de las cepas inoculadas, con la finalidad de corroborar que las cepas aisladas y contadas fueran las cepas M5 inoculadas.

Figura 24. Perfil de plásmidos de *R. etli* aisladas de maíz



M5 = cepas M5

M+F = endófitas aisladas del maíz acompañado de frijol

M = maíz solo

El perfil plasmídico de las cepas aisladas fue idéntico al de las cepas inoculadas, en ambos casos (fig 24).

En el caso de las plantas de frijol, todas las inoculadas presentaron nódulos grandes y rojizos, indicando un estado funcional. Paralelamente a este análisis, se hicieron ensayos de ARA a las plantas de maíz, sin detectarse actividad.

Discusión

En este capítulo, la discusión se centrará en los resultados obtenidos en la segunda parte, caracterización y ensayos de colonización, pues los resultados de la primera parte ya fueron discutidos en el artículo que se anexa. Sin embargo, se tomarán elementos que sean necesarios en la discusión de esta segunda parte.

Caracterización

En la segunda parte de la metodología de este trabajo, se llevaron a cabo algunas pruebas de caracterización de las cepas M5 adicionales a las pruebas de caracterización genética y enzimática realizadas previamente (en la primera parte). Dichas pruebas se hicieron para definir algunos datos complementarios.

El comportamiento de la cinética de crecimiento poblacional de cada una de las cepas M5 efectivamente, correspondió a la curva utilizada como patrón (la cepa tipo de *R. etli* CFN42). Bajo condiciones adecuadas, todas las cepas M5 tuvieron un patrón de crecimiento similar, por lo tanto, ninguna cepa posee ventaja sobre otra en cuanto a crecimiento en medio de cultivo. Dado este resultado, se podría considerar también que bajo las mismas condiciones experimentales (e incluso en el campo), ninguna de las cepas estudiadas tendrá una ventaja en crecimiento sobre la otra que pueda influenciar en los resultados finales de los experimentos.

Por otro lado, existía el interés de saber si cada una de las cepas, individualmente, era capaz de inducir nodulación en *Phaseolus vulgaris*. Dado que *Rhizobium etli* es la principal especie simbiótica de frijol en México (Segovia, *et.al.*, 1993), era de esperarse que las cepas utilizadas nodularan esta planta. Esta hipótesis se confirmó con el ensayo de nodulación. Estas plantas también se sometieron a ensayo de reducción de acetileno, como un parámetro para medir la actividad de nitrogenasa de las cepas nodulantes. En todos los casos hubo reducción de acetileno y las cantidades de etileno producidas fueron todas similares a la producida por la cepa control CFN 42 (datos no mostrados). Estos resultados indican que todas las cepas estudiadas poseen tanto los genes de nodulación como los genes de fijación *nif*. Además, indican que, en presencia de frijol, poseen un comportamiento comparable con el de la cepa

tipo. El hecho de saber que tienen la posibilidad de nodular y fijar nitrógeno indica que tienen el potencial genético para hacerlo y que lo harán siempre y cuando se encuentren las condiciones adecuadas para ello. Así entonces, resulta interesante averiguar cuál es el comportamiento de las cepas en el interior del maíz. Resultados que se analizarán más adelante.

Como parte del análisis de caracterización se obtuvo también el perfil de plásmidos de cada una de las cepas. El patrón de plásmidos obtenido no fue idéntico al de la cepa tipo CFN 42. Es importante mencionar que en las cepas M5-3, M5-7 y M5-8 no se detectaron plásmidos en los repetidos ensayos. Esto puede deberse a dos cosas: 1) que estas cepas no posean plásmidos ó 2) que bajo las condiciones utilizadas fue muy difícil romper las membranas de estas cepas y, por lo tanto, no se liberaron los plásmidos contenidos o bien éstos se rompieron al extraerlos. Sin embargo, resulta difícil que se trate de la primera posibilidad, ya que anteriormente se observó que sí fijan nitrógeno, y por ende, que poseen los genes *nif*. A la fecha, no se ha reportado ninguna bacteria del género *Rhizobium* cuyos genes *nif* se encuentren en el cromosoma. Por esta razón, se hace más probable que lo segundo haya ocurrido. Para estas cepas en particular, si se pretende hacer un estudio genético más a fondo, valdría la pena explorar distintas condiciones metodológicas para lograr la extracción de sus plásmidos o, en dado caso, plantear la posibilidad de que sus genes *nif* se encuentren en el cromosoma y hacer los experimentos correspondientes. Para los fines de este trabajo, bastó con conocer el patrón plasmídico y averiguar si éste se podía correlacionar con la fisiología y comportamiento de las cepas y, por lo tanto, con la capacidad de colonización que cada una posee.

Las cepas M5-1, M5-2, M5-4, M5-5, M5-6 y M5-9 presentaron el mismo patrón de plásmidos. Se puede notar, en la figura 3, que la banda que se expresó más consistentemente (más brillante) tiene el mismo tamaño que el plásmido simbiótico del control CFN 42 (tercera banda) cuyo tamaño es de 390 kb. Sin embargo, no necesariamente se trata del mismo. Además, se observa un segundo plásmido de un tamaño más grande a 630 kb. En las cepas M5-2, M5-4, M5-5 y M5-6 se encontró, además de los dos anteriores, una banda de gran tamaño, que podría tratarse de un megaplásmido. Hay que señalar que este resultado no se repitió en todos los ensayos que se hicieron, aunque sí en la mayoría. A la fecha no se han

reportado megaplásmidos en *R. etli*, sin embargo, cabe la posibilidad de que efectivamente se trate de uno y que en los ensayos posteriores no aparezca por algún rearrreglo en la arquitectura del genoma, como se ha reportado anteriormente para esta especie (Mavigni, *et.al.*, 2002) o bien por efectos de la técnica utilizada. Dicho megaplásmido es ligeramente más grande que el megaplásmido de la cepa CFN 299, utilizada también como control, que tiene un tamaño mayor a 1500 kb. En los distintos perfiles de plásmidos presentados en este trabajo (figuras 17, 19 y 23) es posible ver repetidamente la presencia de este megaplásmido.

Finalmente, la cepa M5-10 presenta, a diferencia de todas las demás, un plásmido adicional, de un tamaño muy pequeño, menor a 150 kb. Cabe decir que éste solamente se observó 2 veces de los 4 ensayos donde se hizo perfil de plásmidos. Probablemente se perdió, sufrió un rearrreglo genómico o se rompió durante el desarrollo de la técnica. Pudiera tratarse de un plásmido inestable.

Es necesario conocer el contenido plasmídico de las cepas, de tal manera que se pueda utilizar como “huella digital” para reconocer a las bacterias que se aíslan como endófitas en los ensayos de colonización. Es decir, se espera que el perfil de las cepas inoculadas corresponda con el de las cepas aisladas. Este dato permitirá averiguar si las cepas M5 tienen la capacidad de recolonizar al maíz, requisito que deberá ser cumplido para considerarlas verdaderamente como endófitas.

Ensayos de Colonización

El primer ensayo de colonización sirvió para establecer las condiciones en las cuales se trabajaría en los ensayos siguientes, fundamentándose en el criterio de que el tratamiento donde se encontrara un mayor número de bacterias sería el ideal para hacer los siguientes y se tomaría como estándar.

Se consideró como un factor importante al suelo, dado que estos ensayos estaban diseñados para un tiempo relativamente prolongado en condiciones de invernadero. Se consideró necesario incluir suelo, de tal manera que las plantas sobrevivieran con el menor estrés posible a lo largo del tratamiento. Sin embargo, para poder determinar qué cantidad de suelo era la ideal, se debían hacer primero las pruebas realizadas en este primer ensayo.

No resulta conveniente utilizar solamente suelo, ni tampoco una alta proporción del mismo en los sustratos, pues es difícil lograr homogenizar las condiciones de los suelos utilizados en todos los experimentos y resulta más difícil lograr una esterilización efectiva del mismo. Por otro lado, existía también la necesidad de mantener una baja concentración de nitrógeno externa, pues como parte de los experimentos se pretendía ver si existe alguna influencia de las cepas en el crecimiento de las plantas. Para poder hacer una buena correlación, era necesario mantener una baja concentración de nitrógeno en el suelo, para evitar que éste promoviera el crecimiento de las plantas independientemente de las bacterias inoculadas. Cabe señalar que el porcentaje de materia orgánica del suelo utilizado fue bajo (3 %) y que el porcentaje estimado de N en este suelo fue bajo también (1.5%). Por estas razones se determinó como límite máximo un 30% de suelo en la mezcla del sustrato.

Otro factor importante considerado fue la forma de inocular. Existían dos posibilidades para hacer una inoculación. La primera, denominada en esta tesis como "inóculo directo" se refiere a poner en contacto directo la suspensión bacteriana con la semilla germinada. Ésta se dejó incubando 30 minutos para asegurar que las bacterias se adhirieran a la superficie de la plántula y particularmente a toda la raíz. Después, el mismo inóculo se colocó sobre la semilla cuando ésta se sembró. En el modo "indirecto" simplemente se agregó la suspensión en el medio nutritivo y luego éste se vertió en el sustrato previo al sembrado de la semilla. El inóculo directo permite que las bacterias entren en contacto estrecho con la planta y su interacción sea temprana, mientras que el indirecto permite que las bacterias inoculadas se encuentren en todo el volumen de sustrato disponible para la planta, que haya una distribución homogénea de las bacterias para asegurar el contacto con inóculo conforme la raíz va creciendo y desarrollándose en el interior de la maceta. Este ensayo pretendió determinar qué condición favorece más la colonización de la rizósfera y la endósfera, en combinación con la presencia o ausencia de suelo.

Se encontró, en la rizósfera, un mayor número de bacterias cuando se adicionó suelo, sin importar la proporción del mismo ni el modo de inoculación utilizado. Este resultado tiene sentido cuando pensamos que el suelo contiene minerales y componentes que para el desarrollo de las poblaciones bacterianas son benéficos, en comparación con la composición de la vermiculita, que no los tiene. Por lo tanto, la colonización de la rizósfera se vio

favorecida con la presencia de suelo. Sin embargo, a pesar de esto, sí hubo colonización en la rizósfera al usar sólo vermiculita y ésta no es mucho menor que cuando se usó suelo.

Por otro lado, al hacer la estimación de endófitas, se encontró un mayor número de bacterias cuando se utilizó 30% de suelo e inoculación directa. Es importante notar que en el sustrato con vermiculita solamente e inóculo directo no se aislaron endófitas. El hecho de haberlas aislado del tratamiento de 100% vermiculita e inóculo indirecto, habla de que el efecto negativo observado se debió al modo de inoculación. En este caso no fue favorable el inóculo directo. En los demás tratamientos también es claro que hay resultados mejores al usar inóculo indirecto que directo. Esto se puede deber quizá a que no resultó favorable para la plántula ser incubada con el inóculo, previo a su siembra, y probablemente despertó una respuesta de defensa contra patógenos que afectó finalmente la colonización endófitas.

Resumiendo, en la rizósfera sólo importó la presencia de suelo para una mejor colonización, mientras que en la endósfera resultó más favorable la presencia de suelo al 30% y una inoculación directa. Dados estos resultados, se eligió, como mejor tratamiento para los futuros experimentos, al sustrato con 30% de suelo y la inoculación indirecta.

A las endófitas aisladas en cada tratamiento se les hizo un perfil plasmídico para corroborar que se tratara de las mismas bacterias inoculadas. Como muestra la figura 8, en todos los casos se aislaron las bacterias inoculadas.

Con esto se puso en evidencia que las cepas estudiadas tuvieron, efectivamente, la capacidad de recolonizar el maíz, por lo que, con certeza, pueden ser consideradas bacterias endófitas.

Otro objetivo muy importante de este trabajo consistió en determinar si existe especificidad en la colonización al maíz. Es decir, si este grupo de cepas solamente tiene la capacidad de colonizar el interior de las raíces del maíz del cual fueron aisladas originalmente, o bien, si tienen la capacidad de colonizar todas las variedades de maíz o solamente algunas.

Como se puede observar en los resultados del inciso 2.2, no existió una especificidad absoluta de las cepas M5 en la colonización endófitas del maíz, pues se les encontró como endófitas en 12 de las 20 variedades analizadas, esto es en un 60%. Así entonces, no son específicas de su variedad (criollo de Cholula) pues colonizaron también otras, pero tampoco tienen la capacidad de colonizar todas las variedades de maíz. Se puede decir entonces que tienen una

especificidad relativa. Las cepas M5 fueron específicas para algunas variedades de maíz, pero no colonizaron a todas indistintamente. Este resultado coincidió con el ensayo previo descrito en la parte I de este trabajo, donde la colonización endófito fue del 50% de las variedades estudiadas. Las razones por las cuales ocurrió esto se desconocen, pero probablemente se deba a mecanismos específicos de comunicación entre la planta y la bacteria. El hecho de que existan variedades que no permiten la colonización endófito resulta favorable para la experimentación, ya que dichas variedades se podrían utilizar para llevar a cabo estudios más específicos sobre los mecanismos de comunicación entre *R. etli* y el maíz. Cuando se pretenda hacer ensayos de colonización de estas cepas en maíz de alguna variedad distinta a las que se analizaron en este trabajo, es importante determinar antes si las cepas tienen o no la capacidad de colonizar dicha variedad. De lo contrario se pueden obtener falsos negativos (por ejemplo, en la inoculación de mutantes).

Las 20 variedades estudiadas provienen de los estados de Oaxaca, Michoacán y Estado de México. Las variedades colonizadas corresponden indistintamente a uno u otro estado, por lo que no hay correlación entre variedad colonizada y localidad de origen.

En estos estados se sigue practicando la agricultura del policultivo, es decir, se sigue sembrando en la milpa el maíz y el frijol en la misma parcela. Esto puede estar beneficiando la interacción de *R. etli* con distintas variedades de maíz y por lo tanto, manteniendo el potencial de colonización de la bacteria.

Las cepas M5 colonizaron de forma diferente la rizósfera de las distintas variedades de maíz estudiadas. En este caso, la variedad 15 y 18020 (figura 9) presentaron una mejor colonización en la rizósfera que la mayoría de las variedades, pero su colonización endófito no fue notablemente buena. Incluso, la variedad 18020 tuvo una colonización endófito más bien pobre. En estas dos variedades la tendencia fue favorecer y, tal vez, mantener una buena colonización rizosférica, mas que endófito. Sin embargo, el caso contrario también se observó en este ensayo. La colonización endófito fue mucho mejor en la variedad 17912, mientras que en la rizósfera fue pobre. Lo mismo se puede decir de la variedad 17903 que, a pesar de tener heterogeneidad en las réplicas (desviación estándar grande), los valores de endófitos aisladas fueron mayores que en las demás variedades (ver tabla 25 del anexo 1). Por otro lado, la gran

mayoría de las variedades analizadas no favorecieron la colonización de un ambiente u otro (rizósfera/endósfera), como en los casos anteriores. El hecho de haber encontrado estos tres resultados diferentes, puede implicar que la asociación entre el maíz y *R. etli* está determinada por la combinación de la variedad con la cepa. Las diferentes variantes obtenidas apoyan esta idea. En este sentido, si lo que se busca es una buena colonización de la endósfera, es recomendable utilizar la variedad 17912 (y las cepas M5). Pero si lo que se busca es tener una buena colonización rizosférica (mas no endófito), las variedades 15 y 18020 en combinación con las cepas M5, son las recomendables. Probablemente, cada una de estas plantas de maíz esté aportando metabolitos y/o sustancias diferentes que favorezcan una u otra colonización por parte de estas cepas. El hecho de encontrar especificidad relativa en la colonización endófito (60% colonizadas) y mejor colonización en unas variedades que en otras, implica un proceso de selección variedad-cepa que podría estar ocurriendo en la naturaleza.

Por otro lado, es interesante mencionar que la variedad donde mejor colonización endófito hubo proviene de Oaxaca, estado donde se conserva una alta diversidad de variedades de maíz (tabla 4). Esto podría significar que en los sitios donde hay mayor diversidad, probablemente se estén favoreciendo las relaciones *R. etli*-maíz. A mayor diversidad, mayor probabilidad hay de que se establezca una relación favorable entre bacteria y planta.

Si asumimos que el inicio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa pudo ser una simple asociación de inquilinismo, tipo la asociación endófito, entonces resulta factible pensar que a lo largo del tiempo, si se conserva la asociación *Rhizobium*-maíz, eventualmente se podría llegar a una relación mutualista. Actualmente no se sabe cuáles son las condiciones fisiológicas particulares de esta asociación. Pero mientras la planta no desarrolle una respuesta de defensa contra patógenos, se podría asumir que es benéfica y que tiene potencial para evolucionar hacia algo fisiológicamente más comprometido.

Dada la alta posibilidad de colonizar distintas variedades que tiene *R. etli* y dado el gran número de variedades que posee el maíz (250), las probabilidades de que alguna combinación *R. etli*-variedad X evolucione hacia una asociación simbiótica donde haya un beneficio neto, aumentan significativamente. Más aun, si se encontrara alguna cepa de *R. etli* que facilitara la simbiosis con maíz, o bien, si se modificara genéticamente a *R. etli* para que proporcione un beneficio al maíz, sin dañarlo, estaríamos muy cerca de lograr el objetivo tan deseado, la

fijación biológica de nitrógeno en maíz. Se podría considerar como una ganancia el hecho de encontrar a esta especie bacteriana habitando “pacíficamente” el interior de la planta. El siguiente paso sería lograr que en este ambiente y en este nicho, la bacteria fijara nitrógeno y lo compartiera con la planta hospedera. Por esta razón, también se llevó a cabo el ensayo de reducción de acetileno en todas las variedades estudiadas, sin embargo, desgraciadamente no hubo resultados positivos.

La presencia de *R. etli* en el interior de las raíces de maíz bajo las condiciones de este estudio, no promueve el crecimiento de la planta, pero tampoco la daña. Por tanto, se podría considerar que *R. etli* establece una asociación neutral con la planta, que podría tratarse de lo que en Ecología se conoce como “inquilinismo”.

En la primera parte de este trabajo (aislamiento e identificación) se observó aumento en el peso seco de algunas variedades, sin embargo, este dato no es comparable con los de esta segunda parte pues las condiciones experimentales fueron diferentes. Independientemente de que no se observara un aumento significativo en el peso de las plantas inoculadas, se hicieron ensayos de reducción de acetileno a las raíces. Tampoco se obtuvo reducción de acetileno, por lo tanto, la nitrogenasa de estas bacterias no se encuentra activa en estas circunstancias. Esto significa que todavía dentro del maíz no se dan las condiciones que la nitrogenasa necesita para poder ser funcional. Sin embargo abre la posibilidad de que, si se inocula una cepa de *R. etli* cuya nitrogenasa no sea tan sensible al O_2 o bien sea “super fijadora” en *P. vulgaris*, se pueda, eventualmente, fijar nitrógeno dentro del maíz. Sería entonces muy importante evaluar si este nitrógeno fijado afectara directamente al crecimiento de la planta, lo que debiera resultar en incremento de los valores de peso seco de plantas inoculadas comparados con los controles no inoculados.

Se exploró la posibilidad de que alguna de las 10 cepas M5 fuera mejor colonizadora que otra, y por tanto, mejor candidata para ser modificada genéticamente. Los resultados del experimento correspondiente (inciso 2.4) indican que cada una de las cepas M5 se comportó de la misma manera tanto en la rizósfera como en la endósfera del maíz estudiado. Es decir, los números de bacterias que se recuperaron de la rizósfera fueron muy similares en todos los casos y lo mismo en la endósfera. La figuras 15 y 16 muestran que no hubo diferencias

significativas en los promedios de números de bacterias aisladas, por lo tanto, ninguna de las cepas colonizó la rizósfera o endósfera del maíz mejor que otra. Dado que ninguna cepa tiene mejor capacidad colonizadora que otra, entonces las ventajas observadas en el experimento de especificidad se deben, muy probablemente, a la variedad de maíz involucrada.

Por otro lado, no se puede asociar la capacidad colonizadora de las cepas con el contenido de plásmidos que posea, pues las diferencias que se observaron en los patrones plasmídicos no implicaron diferencias en colonización. Esto podría llevarnos a suponer que la capacidad de colonización al maíz de estas cepas reside en el cromosoma, pero para poder asegurar esto hace falta más experimentos al respecto, eg. la generación de mutantes.

Resulta también interesante el caso de la M5-5, que no posee la capacidad de recolonizar al maíz. Esta cepa, junto con las demás, fue aislada originalmente del maíz de Cholula y, por alguna razón, perdió la capacidad de recolonizarlo. Al hacer las comparaciones de los perfiles de plásmidos de cepa original, inóculo y rizósfera (figura 17), queda claro que el conjunto de plásmidos de la cepa sigue intacto. Por lo tanto, la pérdida de la capacidad de colonización no se encuentra asociada con los plásmidos. Esto apoya la idea del párrafo anterior, pues implica que la capacidad de colonización al maíz de estas cepas no reside en los plásmidos que posee. Cabe también la posibilidad de que la cepa M5-5 sea una "endófita oportunista" (Reinhold-Hurek y Hurek, 1998) y que haya penetrado al maíz aprovechando, de alguna manera, la entrada de las otras cepas M5 u otras cepas, sin necesidad de poseer los mecanismos necesarios para colonizar por sí misma.

Las cepas M5 son un grupo heterogéneo de bacterias. Por un lado está la que no recolonizó al maíz (M5-5) y por otro las colonizadoras. Así mismo, hubo tres cepas en las que no se pudieron observar sus plásmidos (M5-3, M5-7 y M5-8), otras que poseen el mismo patrón de plásmidos (M5-1, M5-2, M5-4, M5-5, M5-6 y M5-9) y la que posee un patrón de plásmidos diferente (M5-10). Así mismo, los análisis de identificación (parte I) de las cepas mostraron varios electroferotipos diferentes para las cepas M5. Esta variación de características de las cepas, quizá haga una mezcla favorable para la colonización al maíz. Sin embargo, dados los resultados anteriores, al parecer lo que favoreció que penetraran al tejido de la planta lo

determinó la planta misma o una combinación de los productos de las cepas y de la planta. Dado que el grupo de bacterias M5 proviene de la misma planta originalmente, se puede asumir que dentro de una planta de maíz, existe una diversidad de cepas. Esto aunado a la presencia de otras especies bacterianas (tabla 3), resulta en que la comunidad de bacterias endófitas del maíz es bastante diversa.

Como se había mencionado anteriormente, en nuestro país el maíz todavía es cultivado en asociación con el frijol. Por lo tanto resultó importante averiguar cuál fue el comportamiento de *R. etli* en la rizósfera y en la endósfera del maíz bajo estas circunstancias. Los resultados del experimento correspondiente (inciso 2.5) indican que en la rizósfera no existió diferencia entre el maíz solo y el maíz con frijol. Esto podría significar que si se usara *R. etli* como inoculante en un sistema de "bicultivo" como éste, la bacteria colonizaría la rizósfera exitosamente. Si se compara con el maíz solo, se puede observar que no hubo una influencia del frijol en los efectos de colonización rizosférica. Entonces, el maíz solo tiene el mismo potencial de mantener una población rizosférica de *R. etli* que el maíz asociado a frijol posterior a una inoculación, en condiciones de laboratorio. Esto se puede considerar una ventaja si se pensara utilizar como inoculante a esta bacteria en monocultivos del maíz.

Sin embargo, cuando se analiza la endósfera, queda claro que hubo un efectivo positivo de la presencia del frijol en cuanto a colonización de la endósfera del maíz. La diferencia de números de endófitas en uno y otro tratamiento no fue, sin embargo, muy grande, pero sí fue suficiente para poder asumir que hubo una mejor colonización del maíz cuando el frijol lo acompaña. En este caso, se puede pensar que los factores de nodulación que están siendo producidos por la bacteria y las señales químicas del frijol (sumadas a las del maíz en caso de haberlas) están determinando una mejor colonización endófitas que en el maíz solo. Cabe destacar que todos los frijoles de estos sistemas desarrollaron nódulos funcionales, por lo que se puede asumir que la población rizosférica de *R. etli* en estas cantidades (10^8) es suficiente para nodular el frijol y para colonizar el maíz. El número poblacional rizosférico en este caso no fue un factor limitante para la colonización.

Del resultado anterior se puede concluir que es más favorable para la asociación *R. etli*-maíz que esté presente el frijol (situación que ocurre en las milpas) a que no lo esté (como sucede en los monocultivos). Este dato apoya lo estudiado por Souza y colaboradores (1997). A pesar

de que hubo buena colonización de la endósfera, aparentemente no ocurrió un beneficio para la planta de maíz, pues no hubo aumento en el peso seco de las plantas con respecto al maíz inoculado que creció sin frijol. Sin embargo, esto no significa que no pueda ocurrir un beneficio en otras circunstancias diferentes a las estudiadas (en campo por ejemplo), o bien que el efecto se observe al cabo de más tiempo de crecimiento.

Se puede predecir que si se pretendiera utilizar esta bacteria como inoculante del maíz, se esperarían resultados más favorables si en el cultivo estuviera presente también el frijol. Estos datos son una evidencia más de que es ventajoso continuar con prácticas de policultivo o cultivos mixtos en la agricultura en comparación con el monocultivo, la tendencia global que predomina actualmente y de la cual México no está exento.

El hecho de que una población de *R. etli* de 10^8 en la rizósfera no haya sido un factor limitante para la colonización endófito, como se observó en el experimento con frijol, implica que en el resto de los ensayos, donde la población rizosférica fue muy similar, tampoco fue un factor limitante. Se podría considerar que hubo un "exceso" de *R. etli* con potencial para colonizar el interior del maíz. Se puede pensar que existe un mecanismo de selección en el maíz para elegir a las *R. etli* "adecuadas", dado que es una constante el haber encontrado números poblacionales de 10^8 en la rizósfera y alrededor de 10^4 en la endósfera. Hay un efecto de "dilución" de las bacterias al penetrar en la planta o bien, un máximo de bacterias que la planta puede albergar. Este resultado y el hecho de que la cepa M5-5 no recolonizó el maíz, coinciden con lo observado por Reinhold-Hurek y Hurek (1998) quienes dicen que cuando una bacteria traspasa las barreras físicas de una planta, ésta lleva a cabo la selección de ciertos genotipos en su interior, por lo tanto la diversidad es menor en la endósfera que en la rizósfera. Esta observación también la hacen Mavigni y col. (1992) y van Peer y col. (1990). En este estudio, la planta no seleccionó genotipos en función de los plásmidos de las cepas (según lo expuesto anteriormente), por lo que se puede asumir que seleccionó características que residen en el cromosoma de las cepas.

En todos los ensayos de colonización, se presentó este efecto de "dilución" de rizósfera a endósfera y en la mayoría, los números del inóculo siempre fueron ligeramente más grandes que lo encontrado en la rizósfera. Sin embargo, en el caso del ensayo con frijol, los números

recuperados de la rizósfera fueron ligeramente más grandes que los del inóculo en ambos tratamientos, a diferencia del resto de los ensayos. Esto indica que sí existen ligeras fluctuaciones en cuanto a la colonización rizosférica

Es importante señalar que en todos los casos de aislamiento de endófitas realizados en este trabajo, hubo siempre plantas del mismo lote que no fueron colonizadas por *R. etli* al ser inoculadas, dando lugar a lo que se denominó “réplicas negativas” y “réplicas positivas”. Las réplicas negativas no fueron incluidas en los análisis de colonización, precisamente por la ausencia de la misma. Sin embargo, vale la pena analizar este resultado. Una posible explicación de lo sucedido es la siguiente: dado que las plantas utilizadas no provienen de cultivo de tejidos y por tanto no son clonas, no son genéticamente idénticas. Así entonces, la variación misma de las semillas que se utilizaron puede estar determinando la colonización de las endófitas. Sin embargo, al menos en el 50% de las réplicas estudiadas en todos los casos, hubo buena colonización endófitas (considerando como “buena” cuando los números poblacionales se ubican en el rango de 10^3 a 10^5). Al haber buena colonización en el 50% de las réplicas estudiadas, se puede asumir que la planta sí admite la colonización endófitas, pero no necesariamente todos los individuos de un lote se comportarán igual. En este sentido, la colonización endófitas es inconsistente.

Otra posible explicación de lo sucedido es que las semillas utilizadas en todos los casos provienen de colecciones que han sido tratadas con funguicidas para su conservación. Probablemente el funguicida pueda estar desencadenado ciertas respuestas en el embrión de la planta que pudieran afectar la colonización endófitas de *R. etli*. Sin embargo, para que esto resultara cierto, el efecto negativo del funguicida tendría que durar incluso después de la esterilización y lavados de la misma.

Por otro lado, el tener réplicas positivas y negativas, no se debe a diferencias en el inóculo, pues en todos los casos el inóculo fue muy similar.

Dado el análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos llegar a las siguientes conclusiones.

Conclusiones

- *Rhizobium etli* existe en la naturaleza como bacteria endófito del maíz.
- Las cepas M5 tienen la capacidad de formar nódulos y fijar nitrógeno en *Phaseolus vulgaris*.
- Las cepas M5 poseen tres diferentes patrones de plásmidos.
- Las cepas M5-2, M5-4, M5-5 y M5-6 poseen un megaplásmido de aproximadamente 1500 kb.
- Los plásmidos de las cepas M5 no están relacionados con la capacidad de colonización endófito al maíz.
- Las cepas M5 pueden ser consideradas endófitas, pues tienen la capacidad de recolonizar repetidas veces la misma variedad de maíz de la cual fueron aisladas originalmente.
- Para los ensayos de colonización, resulta más conveniente utilizar un sustrato formado por 30% suelo y 70% vermiculita y una inoculación indirecta.
- Las cepas M5 tienen una especificidad relativa de colonización endófito al maíz, pues no colonizan indistintamente a todas las variedades. Hubo una colonización endófito del 60%.
- Las variedades 17912 y 17903 presentan mejor colonización endófito que el resto de las variedades, pero mala colonización rizosférica.
- Las variedades 18020 y 15 presentan una colonización rizosférica mejor que el resto de las variedades, pero su colonización endófito no es muy buena.
- Probablemente, la combinación cepa-variedad determine el éxito en la colonización.

- Las cepas M5 no promueven el crecimiento de ninguna variedad estudiada y tampoco reducen acetileno en el interior de sus raíces.
- Las cepas M5 no provocan daño a la planta, por lo que se cree que establecen una relación neutral de “inquilinismo”.
- Cada una de las cepas M5 coloniza exitosamente la rizósfera.
- La cepa M5-5 no tiene la capacidad de recolonizar el interior del maíz por sí sola y probablemente necesite de las otras para lograrlo. Esta cepa mantiene intacto su patrón de plásmidos.
- Ninguna de las cepas M5 que coloniza la endósfera es mejor colonizadora que otra.
- La capacidad de colonización endófito no está relacionada con los plásmidos que las cepas poseen, pero probablemente sí con su cromosoma.
- Las cepas M5 son un grupo heterogéneo de bacterias.
- Hay una diversidad de genotipos bacterianos habitando los tejidos internos del maíz.
- Hay una mejor colonización de la endósfera del maíz cuando éste se cultiva junto con el frijol, sin embargo esto no promovió el crecimiento de la planta.
- Los números poblacionales de las *R. etli* endófitas se encontraron siempre en el rango de 10^3 a 10^5 .
- En todos los ensayos de colonización endófito hubo al menos 50% de “réplicas positivas” y 50% de “réplicas negativas”, por lo que la colonización endófito fue inconsistente.

- Los números poblacionales de *R. etli* rizosféricas se encontraron siempre en el rango de 10^8 a 10^9 . La colonización rizosférica es consistente.
- Hay un efecto de “dilución” de bacterias entre el inóculo, la rizósfera y la endósfera. Generalmente, en la rizósfera hay 10 veces menos bacterias que en el inóculo, y en la endósfera hay 10,000 veces menos bacterias que en la rizósfera. Por tanto hay 100,000 veces menos bacterias en la endósfera que en el inóculo. Estos valores han de considerarse normales bajo las condiciones experimentales aquí utilizadas.
- Probablemente haya una selección de genotipos de *R. etli* en el interior de la planta de maíz.

- Los números poblacionales de *R. etli* rizosféricas se encontraron siempre en el rango de 10^8 a 10^9 . La colonización rizosférica es consistente.
- Hay un efecto de “dilución” de bacterias entre el inóculo, la rizósfera y la endósfera. Generalmente, en la rizósfera hay 10 veces menos bacterias que en el inóculo, y en la endósfera hay 10,000 veces menos bacterias que en la rizósfera. Por tanto hay 100,000 veces menos bacterias en la endósfera que en el inóculo. Estos valores han de considerarse normales bajo las condiciones experimentales aquí utilizadas.
- Probablemente haya una selección de genotipos de *R. etli* en el interior de la planta de maíz.

Perspectivas

Todavía quedan por resolver ininidad de cuestiones y dudas que han surgido desde el inicio de este proyecto. Hay varios caminos por explorar y preguntas que responder. A continuación se enuncian sólo algunas:

- Analizar los efectos que tienen distintas concentraciones de fertilizantes nitrogenados sobre la colonización. Descrito en Fuentes-Ramírez, *et.al.*, 1999 para caña y *A. diazotrophicus*.
- Comparar el contenido de *R. etli* en suelo rizosférico y no rizosférico, tanto de suelo de monocultivos y policultivos, como de situaciones experimentales.
- Averiguar el papel de las micorrizas del maíz en conjunción con estas cepas.
- Averiguar el papel de los funguicidas en el comportamiento y genoma de las cepas M5, o en general, de *R. etli* en su asociación con maíz.
- Localizar a *R. etli* endófitas dentro de los tejidos de la planta por medio microscopía electrónica de barrido.
- Analizar la presencia de enzimas celulolíticas que probablemente estén permitiendo la entrada de estas cepas al maíz, tal como ocurre en *Azoarcus* (Reinhold-Hurek y col., 1993) y en *Rhizobium* con trébol (Mateos y col., 1992).
- De acuerdo con Pepper (2000), la presión parcial del oxígeno en la rizósfera es menor que en el suelo no rizosférico. Si consideramos esto, podemos suponer que la presión parcial del O₂ en los sistemas rizosféricos utilizados en los ensayos de esta tesis, es mayor que lo que se encuentra en los sistemas reales, pues en éstos hay mayor número de bacterias y por tanto, mayor consumo de O₂. Dadas estas condiciones, probablemente en los suelos donde se cocultivan maíz y frijol, se den las condiciones de presión parcial de O₂ adecuadas que permitan la actividad de la nitrogenasa. Por lo que un experimento interesante, no así menos difícil de llevar a cabo, sería analizar la actividad reductora de acetileno de las bacterias rizosféricas totales de maíces tomados directamente de cultivos, obviamente tratando de estresar lo menos posible a la planta para evitar respuestas fisiológicas ajenas a lo ocurrido en los sistemas naturales.

- Averiguar cuál es el efecto de inocular distintas densidades bacterianas y hallar la cantidad de inóculo ideal.
- Triplett (com.pers., 2000) propone que se debe encontrar la combinación correcta de cepa-variedad en cualquier relación endofítica con importancia agrícola, para obtener mejores resultados. Propone incluso que al hallarla se deberá hacer “genomics”, “proteomics” y “metabolomics” *in planta*. Así que valdría la pena hacer dichos estudios de las combinaciones aquí halladas.
- Investigar qué otros rizobia son capaces de colonizar endofíticamente al maíz.
- Averiguar los efectos sobre colonización del maíz de distintas mutantes de *R. etli*.
- Averiguar cuáles son los mecanismos de comunicación entre el maíz y *R. etli* y en la interacción frijol-*R. etli*-maíz.

Consideración final

Haciendo un análisis global de los experimentos llevados a cabo, queda claro que la asociación *R. etli*-maíz tiene mucho potencial para ser aprovechado en la agricultura. Al tratarse se una bacteria fijadora de nitrógeno que se asocia al maíz, se abre la posibilidad de manipularla y aprovecharla para su uso como inoculante de este cultivo. Ya sea vía FBN u otros mecanismos, eventualmente puede beneficiar al maíz. Sin embargo, todavía hace falta más investigación para definir una infinidad de detalles que se involucran en esta asociación. Vale la pena estudiarlos, vale la pena definir parámetros básicos, vale la pena aventurarse a aplicar en el campo lo obtenido en el laboratorio. Vale la pena promover la investigación de estas asociaciones, para lograr un impacto verdadero en el uso de inoculantes agrícolas y, por lo tanto, aportar algo en el intento por lograr una agricultura verdaderamente sostenible.

Anexo 1

2.1 Determinación de condiciones estándares de recolonización del maíz

Tabla 22. Número de *R. etli* rizosféricas aisladas por réplica en cada tratamiento

Tratamiento	No. bacterias aisladas por planta (UFC/g suelo)	Promedio	Desviación estándar
100% vermiculita Inóculo directo	1) 9.8×10^7	1.07×10^8	5.03×10^7
	2) 1.72×10^8		
	3) 4.97×10^7		
100% vermiculita Inóculo indirecto	1) 5.55×10^7	2.66×10^7	1.62×10^7
	2) 2.87×10^7		
	3) 1.06×10^7		
	4) 1.16×10^7		
	5) 2.68×10^7		
15% suelo Inóculo indirecto	1) 1.42×10^8	4.22×10^8	2.25×10^8
	2) 8.17×10^8		
	3) 3.99×10^8		
	4) 2.94×10^8		
	5) 4.57×10^8		
15% suelo Inóculo directo	1) 1.46×10^9	6.32×10^8	4.36×10^8
	2) 2.48×10^8		
	3) 6.66×10^8		
	4) 4.18×10^8		
	5) 3.66×10^8		
30% suelo Inóculo indirecto	1) 3.66×10^8	5.65×10^8	4.70×10^8
	2) 1.00×10^8		
	3) 4.44×10^8		
	4) 1.35×10^9		
30% suelo Inóculo directo	1) 5.29×10^8	3.65×10^8	2.16×10^8
	2) 3.99×10^8		
	3) 5.29×10^8		
	4) 2.22×10^6		

Tabla 23. Número de *R. etli* endófitas aisladas por réplica "positiva" en cada tratamiento

Tratamiento	No. bacterias aisladas por planta (UFC/g raíz)	Promedio	Desviación estándar
100% vermiculita Inóculo indirecto	1) 1.74×10^6	9.63×10^5	7.77×10^5
	2) 1.86×10^5		
15 % suelo Inóculo indirecto	1) 1.44×10^4	1.80×10^4	5.14×10^3
	2) 2.53×10^4		
	3) 1.44×10^4		
15% suelo Inóculo directo	1) 9.88×10^3	1.04×10^4	5.10×10^2
	2) 1.09×10^4		
30% suelo Inóculo indirecto	3) 2.68×10^6	1.72×10^6	9.60×10^5
	4) 7.60×10^5		
30% suelo Inóculo directo	1) 4.89×10^4	3.49×10^4	1.40×10^4
	2) 2.09×10^4		

2.3 Prueba de especificidad de colonización

Tabla 24. Número de *R. etli* rizosféricas aisladas por réplica de cada variedad

Variedad	No. de bacterias aisladas por planta (UFC/g suelo)	Promedio	Desviación estándar
10496	1) 1.96×10^8	1.03×10^8	0.59×10^8
	2) 3.92×10^7		
	3) 6.93×10^7		
	4) 1.07×10^8		
17901	1) 1.57×10^8	1.54×10^8	0.81×10^8
	2) 2.68×10^8		
	3) 1.50×10^8		
	4) 3.92×10^7		
1408	1) 8.50×10^7	1.84×10^8	1.53×10^8
	2) 4.18×10^8		
	3) 2.16×10^8		
	4) 1.70×10^7		
265	1) 5.03×10^8	4.68×10^8	1.46×10^8
	2) 6.27×10^8		
	3) 2.75×10^8		
18020	1) 2.74×10^9	1.47×10^9	8.48×10^8
	2) 1.30×10^9		
	3) 1.48×10^9		
	4) 3.59×10^8		

15	1) 4.88×10^8	1.01×10^9	4.72×10^8
	2) 8.06×10^8		
	3) 1.77×10^9		
	4) 9.95×10^8		
17903	1) 1.50×10^8	2.66×10^8	0.82×10^8
	2) 3.26×10^8		
	3) 3.22×10^8		
10235	1) 5.20×10^8	3.26×10^8	1.20×10^8
	2) 3.32×10^8		
	3) 2.23×10^8		
	4) 2.30×10^8		
1209	1) 5.95×10^8	6.41×10^8	3.55×10^8
	2) 2.37×10^8		
	3) 5.21×10^8		
	4) 1.21×10^9		
17912	1) 1.28×10^8	7.30×10^7	3.60×10^7
	2) 2.90×10^7		
	3) 5.60×10^7		
	4) 7.80×10^7		
8521	1) 1.35×10^8	1.65×10^8	1.05×10^8
	2) 1.02×10^8		
	3) 3.43×10^8		
	4) 8.04×10^7		
9116	1) 1.97×10^8	2.25×10^8	0.20×10^8
	2) 2.42×10^8		
	3) 2.36×10^8		
1477	1) 2.45×10^8	2.05×10^8	0.42×10^8
	2) 1.84×10^8		
	3) 1.47×10^8		
	4) 2.44×10^8		
O- 153	1) 2.64×10^8	3.70×10^8	2.48×10^8
	2) 7.94×10^8		
	3) 2.51×10^8		
	4) 1.70×10^8		
O-329	1) 4.26×10^8	3.12×10^8	1.53×10^8
	2) 1.32×10^8		
	3) 1.93×10^8		
	4) 4.96×10^8		
16006	1) 1.37×10^8	1.69×10^8	9.60×10^7
	2) 1.90×10^8		
	3) 4.10×10^7		
	4) 3.08×10^8		
O- 324	1) 6.05×10^8	6.94×10^8	1.09×10^8
	2) 8.73×10^8		

	3) 6.94×10^8		
	4) 6.03×10^8		
17959	1) 2.13×10^8	3.81×10^8	1.65×10^8
	2) 2.57×10^8		
	3) 6.33×10^8		
	4) 4.22×10^8		
O- 311	1) 2.73×10^8	2.08×10^8	5.40×10^7
	2) 1.54×10^8		
	3) 2.49×10^8		
	4) 1.56×10^8		
O-170	1) 1.06×10^8	1.88×10^8	6.40×10^7
	2) 2.67×10^8		
	3) 1.49×10^8		
	4) 2.29×10^7		

Tabla 25. Número de *R. etli* endófitas aisladas por réplica positiva en cada variedad

Variedad	No. de bacterias aisladas por planta (UFC/g raíz)	Promedio	Desviación estándar
10496	1) 3.96×10^4	3.13×10^4	7.00×10^3
	2) 2.24×10^4		
	3) 3.19×10^4		
18020	1) 2.73×10^3	6.60×10^3	3.80×10^3
	2) 1.04×10^4		
15	1) 3.69×10^4	5.63×10^4	1.94×10^4
	2) 7.57×10^4		
17903	1) 1.09×10^5	3.40×10^5	2.30×10^5
	2) 5.70×10^5		
10235	1) 2.92×10^4	1.90×10^4	1.02×10^4
	2) 8.72×10^3		
17912	1) 1.42×10^5	1.79×10^5	3.70×10^4
	2) 2.15×10^5		
8521	1) 3.25×10^4	3.88×10^4	6.30×10^3
	2) 4.50×10^4		
O- 153	1) 7.83×10^3	1.48×10^4	6.90×10^3
	2) 2.17×10^4		
O- 329	1) 2.70×10^3	7.04×10^4	6.76×10^4
	2) 1.38×10^5		
17959	1) 3.48×10^4	1.94×10^4	1.20×10^4
	2) 4.45×10^3		
	3) 1.16×10^4		
	4) 2.66×10^4		

O-324	1) 7.36×10^3	8.2×10^3	8.00×10^2
	2) 8.95×10^3		
O-311	1) 2.69×10^4	1.71×10^4	9.30×10^3
	2) 1.98×10^4		
	3) 4.50×10^3		

2.4 Correlación entre cepas y capacidad de colonización

Tabla 26. Número de *R. etli* rizosféricas aisladas por réplica por cepa

Cepa	No. de bacterias aisladas por planta (UFC/g raíz)	Promedio	Desviación estándar
M5-1	1) 4.18×10^7	9.58×10^7	5.60×10^7
	2) 7.25×10^7		
	3) 1.73×10^8		
M5-2	1) 1.30×10^8	1.58×10^8	2.60×10^7
	2) 1.58×10^8		
	3) 1.44×10^8		
	4) 1.99×10^8		
M5-3	1) 1.74×10^8	1.31×10^8	4.30×10^7
	2) 1.74×10^8		
	3) 9.28×10^7		
	4) 8.30×10^7		
M5-4	1) 3.99×10^7	1.64×10^8	1.44×10^8
	2) 8.50×10^7		
	3) 3.66×10^8		
M5-5	1) 2.70×10^8	3.32×10^8	2.05×10^8
	2) 2.61×10^8		
	3) 6.73×10^8		
	4) 1.23×10^8		
M5-6	1) 4.70×10^8	3.47×10^8	3.25×10^8
	2) 8.24×10^8		
	3) 4.05×10^7		
	4) 5.42×10^7		
M5-7	1) 6.70×10^8	2.96×10^8	2.20×10^8
	2) 1.66×10^8		
	3) 2.29×10^8		
	4) 1.17×10^8		
M5-8	1) 1.05×10^8	3.09×10^8	2.40×10^8
	2) 1.75×10^8		
	3) 6.47×10^8		

M5 - 9	1) 8.37×10^7	1.06×10^8	2.10×10^7
	2) 1.39×10^8		
	3) 9.09×10^7		
	4) 1.09×10^8		
M5 - 10	1) 9.87×10^7	1.33×10^8	3.5×10^7
	2) 1.68×10^8		

Tabla 27 . Número de *R. etli* endófitas aisladas por réplica positiva por cepa

Cepa	No. de bacterias aisladas por planta (UFC/g suelo)	Promedio	Desviación estándar
M5 - 1	1) 2.71×10^3	1.49×10^4	1.41×10^4
	2) 7.31×10^3		
	3) 3.47×10^4		
M5 - 2	1) 8.53×10^3	5.16×10^3	3.37×10^3
	2) 1.79×10^3		
M5 - 3	1) 6.34×10^3	1.39×10^4	7.53×10^3
	2) 2.14×10^4		
M5 - 4	1) 4.95×10^4	2.10×10^5	1.61×10^5
	2) 3.72×10^5		
M5 - 6	1) 7.22×10^3	1.78×10^4	1.06×10^4
	2) 2.84×10^4		
M5 - 7	1) 4.91×10^4	3.31×10^4	1.60×10^4
	2) 1.70×10^4		
M5 - 8	1) 5.67×10^4	1.10×10^5	5.31×10^4
	2) 1.63×10^5		
M5 - 9	1) 3.30×10^4	1.82×10^4	1.09×10^4
	2) 7.12×10^3		
	3) 1.44×10^4		
M5 - 10	1) 4.14×10^4	6.20×10^4	2.06×10^4
	2) 8.26×10^4		
Control	0	0	0

2.6 Colonización del maíz en presencia de *Phaseolus vulgaris*

Tabla 28. Número de *R. etli* rizosféricas aisladas por réplica por tratamiento

Tratamiento	No. de bacterias por planta (UFC/g suelo)	Promedio	Desviación estándar
Maíz y Frijol	1) 2.63×10^8	3.30×10^8	1.84×10^8
	2) 1.76×10^8		
	3) 2.47×10^8		
	4) 2.34×10^8		
	5) 2.21×10^8		
	6) 1.62×10^8		
	7) 8.14×10^8		
	8) 3.58×10^8		
	9) 4.57×10^8		
	10) 3.69×10^8		
Maíz solo	1) 3.23×10^8	3.50×10^8	8.8×10^7
	2) 2.28×10^8		
	3) 4.54×10^8		
	4) 4.48×10^8		
	5) 2.97×10^8		
Maíz y frijol sin inocular	Todas las réplicas = 0	0	0
Maíz solo sin inocular	Todas las réplicas = 0	0	0

Tabla 29 . Número de *R. etli* endófitas aisladas por réplica positiva por tratamiento

Tratamiento	No. de bacterias por planta (UFC/g raíz)	Promedio	Desviación Estándar
Maíz y frijol	1) 1.88×10^5	1.64×10^5	1.05×10^5
	2) 3.58×10^5		
	3) 7.25×10^4		
	4) 1.22×10^5		
	5) 8.07×10^4		
Maíz solo	1) 2.85×10^4	2.65×10^4	7.70×10^3
	2) 1.62×10^4		
	3) 3.48×10^4		
Controles	0	0	0

Anexo 2

1. Medio PY

Para preparar 1000 ml de medio:

Peptona de caseína.....	5 g.
Extracto de levadura.....	3 g.

En caso de tratarse de medio sólido se agregan 15 g. de agar por 1000 ml de medio.

2. Solución nutritiva para maíz (Fahraeus, 1957)

Para preparar 1000 ml de solución stock 1000 x

Na ₂ HPO ₄ H ₂ O.....	15 g
KH ₂ PO ₄	10 g
CaCl ₂	10 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	12 g
Fe citrato	0.5 g
H ₃ BO ₃	2.86 g
MnSO ₄ 4H ₂ O	2.03 g
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	220 mg
CuSO ₄ 5 H ₂ O	80 mg
H ₂ MoO ₄	80 mg
(ó Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O)	

Referencias Citadas

Allen, O.N., E.K. Allen. 1981. *The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation*. University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin and MacMillan Publishers Ltd. London.

Baldani, J.I., A.L.M. Oliveira, S.L. Guimaraes, V.L.D. Baldani, F.B. Jr. Reis, L.G. Silva, V.M. Reis, K.R.S. Teixeira, J.Döbereiner. 2000. *Biological Nitrogen Fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs*. En: "Nitrogen Fixation: from Molecules to Crop Productivity" (Pedrosa, F.O., M. Hungria, G. Yates, W.E. Newton, eds.) Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 397-400.

Baldani, J.I., V.M. Reis, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner. 1999. *Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs*. En "12th International Congress on Nitrogen Fixation". Libro de resúmenes. Universidade Federal do Paraná, Paraná. pp.12

Baldani, V.L.D., J.I. Baldani, F.L. Olivares, J. Döbereiner. 1992. *Identification and ecology of Herbaspirillum seropedicae and the closely related Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis 13: 65-73.

Baldani, J.I., V.L.D. Baldani, L. Seldin, J. Döbereiner. 1986. *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. nov. sp.nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. 36:86-93.

Baldani, V.L.D., J. Döbereiner. 1980. *Host-plant specificity in the infection of cereals with Azospirillum spp.* Soil Biol. Biochem. 12: 433-439.

Baldy, C., C.J. Stigter. 1993. *Agrométéorologie des cultures multiples en régions chaudes*. INRA, Paris

Barraquio, W.L., L. Revilla, J.K. Ladha. 1997. *Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice*. Plant Soil 194: 15-24

Bashan, Y. 1998. *Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture*. Biotech. Advances 16(4): 729-770.

Bell, C.R., G.A. Dickie, W.L.G. Harvey, J.W.Y.F. Chan. 1995. *Endophytic bacteria in grapevine*. Can. J. Microbiol. 41: 46-53.

Biederbeck, V.O., N.Z. Lupway, K.G. Hanson, W.A. Rice, R.P. Zenter. 2000. *Effect of long term rotation with lentils on rizosphere ecology and on endophytic rhizobia in wheat*. En: "Proceedings of the 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation". p.80. University of Laval. Quebec, Canadá.

Boddey, R.M., O.C. de Oliveira, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. de Olivares, V.L.D. Baldani, J. Döbereiner. 1995. *Biological Nitrogen Fixation Associated with Sugar Cane and Rice: Contributions and Prospects for improvement.* Plant Soil 174: 195-209.

Brom, S., A. García de los Santos, T. Stepkowsky, M. Flores, G. Dávila, D. Romero, R. Palacios. 1992. *Different plasmids of Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli are required for optimal symbiotic performance.* J. Bacteriol. 174 (16): 183-5189.

Burgos, P.A., J. Castellanos, Y. Mora, J. Mora. 1999. *Field inoculation of common bean (Phaseolus vulgaris L.) with high efficiency Rhizobium strains.* En "Highlights of Nitrogen Fixation Research" (Martínez-Romero E., G. Hernández, eds.) p. 255-257 Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, EUA.

Burris, R.H. 1974. Methodology. En "The Biology of Nitrogen Fixation" (A. Quispel, ed.) American Elsevier, New York, pp.10-33.

Caballero-Mellado, J., M.G. Carcaño-Montiel, M.A. Mascarúa-Esparza. 1992. *Field inoculation of wheat (Triticum aestivum) with Azospirillum brasilensis under temperate climate.* Symbiosis 13: 243-253.

Cavalcante V.A., J.Döbereiner, 1988. *A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane.* Plant and Soil. 108: 23-31.

CGIAR. 1988. Sustainable Agricultural Production: Implications for Agricultural Research. CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) Meeting, Berlin, Alemania.

Chaintreuil C., E. Giraud, Y. Prin, J. Lorquin, A. Ba, M. Gillis, P. de Laudie, B. Dreyfus. 2000. *Photosynthetic brdayrhizobia are natural endophytes of the African wild rice Oryza breviligulata.* Appl.Environ.Microbiol. 66: 5437-5447.

Chelius, M.K., E.W. Triplett. 2000a. *Diazotrophic endophytes associated with maize.* En: "Procariotic Nitrogen Fixation: A Model System for the Analysis of a Biological Process" (Triplett, E.W., ed.) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 770-791.

Chelis M.K., E.W. Triplett. 2000b. *Dyadobacter fermentans gen.nov.sp.nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from surface-sterilized Zea mays stems.* Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:751-758.

Dangerfield J.A., D.W.S. Westlake, F.D. Cook. 1978. *Characterization of the bacterial flora associated with root systems of Pinus contorta var. patifolia.* Can. J. Microbiol 24: 1520-1525.

Döbereiner, J., J.M. Day. 1976. *Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites.* En: "Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation" Vol.2 (Newton, W.E., C.J. Nyman, eds.), pp. 518-538, Washington State University Press, Pullman, USA.

Döbereiner, J., V.M. Reis, M.A. Paula, F. Olivares. 1993. *Endophytic bacteria in sugarcane, cereals and tuber plants*. En "New Horizons in Nitrogen Fixation" (Palacios, R., et.al. eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp. 671-676.

Dobbelaere, S., A. Croonenborghs, A. Thys, D. Ptacek, J. Vanderleyden, P. Dutto, C. Labandera-González, J. Caballero-Mellado, J.F. Aguirre, Y. Kapulnik, S. Brener, S. Burdman, D. Kadouri, S. Sarig, Y. Okon. 2001. *Responses to agronomically important crops to inoculation with Azospirillum*. Aust. J. Plant Physiol. 28: 871-879.

Dubach, M., M.P. Ruselle. 1994. *Forage legume roots and nodules and their role in nitrogen transfer*. J Agron 86: 259-266.

Egener, T., T. Hurek, 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.

Engelhard, M., T. Hurek, B. Reinhold-Hurek. 2000. *Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, Azoarcus spp., in wild rice species and land races or Oryza sativa in comparison with modern races*. Environ.Microbiol. 2: 131-141.

Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales, J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution*. Appl. Environ. Microbiol. 67(6): 2790-2798.

Fahraeus, G. 1957. *The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique*. J. Gen. Microbiol. 16: 374-381.

FAO. 2001. Food and Agriculture Organization. Naciones Unidas. Estadísticas agrícolas del año 2001. www.fao.org

Faurie, O. 1994. *Interactions carbone-azote dans des associations prairiales graminées (Lolium perenne L.) légumineuse (Trifolium repens L.). Etude d'associations simulées en conditions contrôlées*. Tesis. Universidad Blaise Pascal (Clermont II), Clermont-Ferrand, Francia. 203 pp.

Ferreira, A.C., K. Cozzolino, A.R.V. Carvahlo, J. Döbereiner. 1995. *Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees*. En: "International symposium on sustainable agriculture for the tropics, the role on biological nitrogen fixation". Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. Libro de resúmenes, pp. 210-211.

Fuentes-Ramírez, L.E., J. Caballero-Mellado, J. Sepúlveda, E. Martínez-Romero. 1999. *Colonization of sugar cane by Acetobacter diazotrophicus is inhibited by high N-fertilization*. FEMS Microbiol. Ecol. 29: 117-128.

Gagné, S., C.R. Richard, H. Rousseau, 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 behaviour of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus tree*. Appl. Environ. Microbiol. 43:1335-1342.

Gaur, Y.D., A.N. Sen, S.S. Suba Rao. 1980. *Improved legume-Rhizobium symbiosis by inoculating preceding cereal crop with Rhizobium*. Plant Soil 54: 313-316.

Geniaux, E., M. Flores, R. Palacios, E. Martinez. 1995. *Presence of Megaplasmids in Rhizobium tropici and further evidence of differences between the two R. tropici subtypes*. Int. J. Syst. Bacteriol. 45(2): 392-394.

Gopalaswamy, G., S. Kannaiyan, K.J. O'Callaghan, M.R. Davey, E.C. Cocking. 2000. *The xylem of rice (Oryza sativa) is colonized by Azorhizobium caulinodans*. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 267(1439):103-107.

Gough C., J. Vasse, C. Galera, G. Webster, E. Cocking, J. Denarie. 1997. *Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: Arabidopsis thaliana as a model plant*. Plant and Soil 194: 123-130.

Hartmann A., G. Kirchof, B. Eckert, M. Stoffels, M. Rothballer, O. Weber, F. Olivares, V. Reis, B. Jha, I. Baldani. 2000. *Diversity and Ecology of Azospirillum, Herbaspirillum and other diazotrophic PGPR in Graminae*. En "Proceedings of the 8th. International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes". pp.75. University of Sydney: NSW, Australia.

Hilali, A., D. Prevost, W.J. Broughton, H. Antoun. 2000. *Potential use of Rhizobium leguminosarum bv. Trifolii as plant growth-promoting rhizobacteria on wheat*. En "Proceedings of the 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation". p.81. University of Laval. Quebec, Canada.

Haynes, J. 1980. *Competitive aspects of the grass-legume association*. Adv. Agron 33:227-261.

Hynes, M. F., N.F. McGregor. 1990. *Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen fixing nodules by Rhizobium leguminosarum*. Mol. Microbiol. 4:567-574.

Hungria, M., M.A.T. Vargas, R.J. Campo, L.M.O. Chueire, D.S. Andrade. 2001. *The Brazilian experience with the soybean (Glycine max) and common bean (Phaseolus vulgaris) symbioses*. En: "Nitrogen Fixation: From Molecules to Plant Productivity" (Pedrosa, F.O. ed). Kluwer Academic Publishers. 515-518.

Jacobs, M.J., W.M. Bugbee, D.A. Gabrielson. 1985. *Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beetroots*. Can. J. Bot. 45:757-766.

Jiménez-Salgado T., L.E. Fuentes-Ramírez, A. Tapia-Hernández, M.A. Mascarúa-Esparza, E. Martínez-Romero, J. Caballero-Mellado. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *App. Environ. Microbiol.* 63(9): 3676-3683.

James, E.K., P. Gyaneshwar, W.L. Barraquio, N. Mathan, J.K. Ladha. 2000. *Endophytic diazotrophs associated with rice*. En: "The Quest for Nitrogen Fixation in Rice" (Ladha, J.K., Reddy, P.M., eds.) IRRI, Makati city, Filipinas pp. 119-140.

James, E.K., F.L. Olivares. 1997. *Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs*. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17: 77-199.

Kennedy A.C. 1997. *The rizosphere and spermosphere*. En: "Principles and Applications of Soil Microbiology" (D.M. Sylvia, J.J. Furrhman, P.G. Hartel y D.A. Zuberer, eds.) Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp 389-407.

Kennedy, I.R., L.L. Pereg-Gerk, C. Wood, R. Deaker, K. Gilchrist, S. Katupitiya. 1997. *Biological Nitrogen Fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between Azospirillum and wheat*. *Plant and Soil* 194: 65-79.

Kennedy, I.R., Y. Chan. 1992. *Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances*. *Plant and Soil* 141:93-118.

Kloepper, J.W., B. Schnippers y P.A.H.M. Bakker. 1992. *Proposed elimination of the term endorhizosphere*. *Phytopatol* 82: 726-727.

Kloepper, J.W., 1994. *Plant growth promoting rhizobacteria: other systems*. En: "Azospirillum/plant associations" (Okon, Y., ed.), CRC Press, Florida, EUA. Pp.137-166.

Kostychev, S., A. Sheloumova, A. Shulgina. 1926. *Nitrogen content of soils of the southern coast of Crimea (Russian)*. *Sonetskii Agron.* 1

Lupway, N.Z., W.A. Rice, G.W. Clayton. 2000. *Endophytic rhizobia in barely and canola in rotation with field peas*. En "Proceedings of the 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation" p.80 University of Laval: Quebec, Canadá.

Martínez-Romero E., L. Segovia, F.M. Mercante, A.A. Franco, P. Graham, M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int.J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.

Martínez-Romero E., J. Caballero-Mellado. 1996. *Rhizobium phylogenies and bacterial genetic diversity*. *Crit. Rev.Plant.Sci.* 15:113-140.

Mateos, P.F., J.I. Jiménez-Zurdo, J. Chen, A.S. squartini, S.K. Haack, E. Martínez-Molina. D.H. Hubbell, F.B. Dazzo. 1992. *Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1816-1903.

Matiru V., M.A. Jaffer, F.D., Dakora. 2000. *Rhizobial colonization of roots of African landraces of sorghum and millet and the effects on sorghum growth and P nutrition.* En "Proceedings of the 9th Congress of the African Association for Biological Nitrogen Fixation: Challenges and Imperatives for BNF research and application in Africa for the 21st century", pp. 99-100, Nairobi, Kenya.

Mavigni, P., M.A. Flores, X. Guo, G. Davila, X. Perret, W.J.Broughton, and R. Palacios. 2002. *Dynamics of genome architecture in Rhizobium sp. strain NGR234.* J. Bacteriol 184:171-176.

Mavigni, P., G. Laguerre, O. Berge, T. Heulin. 1992. *Genetic and phenotypic diversity of Bacillus polymixa in soil and in the wheat rizosphere.* Appl. Environ. Microbiol. 58: 1984-1903.

McInroy, J.A. y J.W. Kloepper. 1995. *Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn.* Plant and Soil 173: 337-342.

Mishagi, I.J., C.R. Donndelinger. 1990. *Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants.* Phytopathol. 80: 808-811.

Okon, Y., C.A. Labandera. 1994. *Agronomic applicatoins of Azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation.* Soil Biol. Biochem. 26: 1591-1601.

Olivares, F.L., V.L.D. Reis, J.I. Baldani, J. Döbereiner. 1996. *Ocurrence of endophytic diazotrophs Herbaspirillum spp. in roots, stems and leaves predominantly in Gramineae.* Biol.Fertil.Soils 21: 197-200.

Palus, J.A., J. Borneman, P.W. Ludden, E.W. Triplett. 1996. *A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of Zea mays L., and Zea luxurians Itlis and Doebley.* Plant Soil 186: 135-142.

Paul, E.A., F.E. Clark. 1989. *Soil Microbiology and Chemistry.* Academic Press, San Diego.

Pawlowski, C., y T. Bisseling. 1996. *Rhizobial and actinorhizal symbioses: what are the shared features?* Plant Cell 8: 1899-1913.

Pepper I.L. 2000. *Beneficial and Pathogenic Microbes in Agriculture.* En "Environmental Microbiology" (R. M. Maier, I.L. Pepper, C.P. Gerba, eds). Academic Press. USA.

Piceno, Y.M., C.R. Lovell. 2000. *Stability in natural bacterial communities: II. Plant resource allocation effects on rhizosphere diazotroph assemblage composition.* Microbiol.Ecol. 39: 41-48.

Plucknett D.L., N.J.H. Smith. 1986. *Sustaining Agricultral Yields.* Bioscience 36: 40-45.

Quispel A. 1992. *A search of signals in endophytic microorganisms*. En: "Molecular signals in plant-molecular communications". (Verma, D.P.S., ed.) CRC Press, Boca Ratón, Fl. pp. 471-492

Rao, V.R., B. Ramakrishnan, T.K. Adhya, P.K. Kanungo, D.N. Nayak. 1998. Review: *Current Status and Future Prospects of Associative Nitrogen Fixation in Rice*. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 621-633.

Reinhold-Hurek, B., T. Hurek, M. Gillis, B. Hoste, M. Vancanneyt, K. Kersters, J. De Ley. 1993. *Azoarcus gen.nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of kallar grass (Leptochloa fusca (L.) Kunth) and description of two species Azoarcus indigenus sp.nov. and Azoarcus communis sp.nov.* Int.J.Syst.Bacteriol. 43: 574-584.

Reinhold-Hurek B., T. Hurek, 1998. *Life in grasses: diazotrophic endophytes*. Trends in Microbiology. 6: 139-144.

Romero D., S. Brom, J. Martínez-Salazar, M. Girard, R. Palacios, G. Dávila. 1991. *Amplification and Deletion of a nod-nif Region in the Symbiotic Plasmid of Rhizobium phaseoli*. J.Bacteriol. 178 No.8: 2435-2441.

Rovira A.D., R.C. Foster, J.K. Martin.1979. *Note on terminology: Origin, Nature and Nomenclature of Organic Materials in the rhizosphere*. En: "The Soil-Root Interface" (J.L. Harley y R.Scott Russell, eds.) Academic Press, Londres pp 1-4.

Rubenchik, L.I., 1963. *Azotobacter and its use in agriculutre*. Academy of Sciences of the Ukranian SSR, Microbiological Institute D.K. Zabolotnyi. Israel program for scientific translations, Jerusalem. p.65

Ruppel, S., Ch. Hecht-Buchholz, R. Remus, U. Ortman, R. Schmelzer. 1992. *Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain Pantoea agglomerans on and witihin wheat: An investigation using ELISA and transmission electron microscopy*. Plant and Soil. 145: 261-273.

Rusell J.P., D.F. Beech, P.N. Jone. 1989. *Grain Legume Productivity in Subsistence Agriculutre*. Food Policy 14: 129-142.

Sabry, S. R.S., S.A. Saleh, C.A. Batchelor. 1997. *Endophytic establishment of Azorhizobium caulinodans in wheat*. Proc. R. Soc. Lond. B. 264: 341-346.

Segovia, L., J.P.W. Young, E. Martínez-Romero. 1993, *Reclassification of American Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli type I strains as Rhizobium etli sp. nov.* Int. J. Syst.Bacteriol.43:374-377.

Sevilla, M., S. Lee, D. Meletzus, R. Burris, C. Kennedy. 1999. *Genetic analysis and effect on plant growth of the nitrogen fixing sugar cane endophyte Acetobacter diazotrophicus*. En "2th International Congress on Nitrogen Fixation" (Pedrosa, F.O., M. Hungria, *et.al.* eds.). Libro de resúmenes. Universidade Federale do Paraná, Paraná. Pp. 12.

Sevilla, M., A. De Oliveira, I.J. Baldani, C. Kennedy. 1998. *Contributions of the bacterial endophyte Acetobacter diazotrophicus to sugar cane nutrition: A preliminary study*. Symbiosis 25: 181-191.

Soussana, J.F., C. Arregui, L. Hazard. 1989. *Assimilation du nitrate et fixation symbiotique dans les associations tréfle blanc-raygrass anglais*. Proc XVI IGC, Nice. pp.147-148

Souza, V., J. Bain, C. Silva, V. Bouchet, A. Valera, E. Márquez, L.E., Eguiarte. 1997. *Ethnomicrobiology: do agricultural practices modify the population structure of the nitrogen fixing bacteria Rhizobium etli biovar phaseoli?* J. Ethnobiol. 17: 249-266.

Stigter, C.J., C Baldy. 1995. *Manipulation of the microclimate by intercropping: making the best of services rendered*. En " Ecophysiology of tropical intercropping" (Sinoquet, H., P. Cruz, eds.) INRA, Paris. pp 331-341.

Sturz, A.V. 1995. *The role of endophytic bacteria during seed decay and potato tuberization*. Plant and Soil 175: 257-263.

Ta, T.C., F.D.H. Macdowall, M.A. Farris. 1996. *Excretion of assimilated N fixed by nodules of alfalfa (Medicago sativa)*. Can J. Bot. 64: 2063-2067.

Tan, Z., T. Hurek, P. Vinuesa, J.K. Ladha, B. Reinhold-Hurek. 2001. *Specific detection of Bradyrhizobium and Rhizobium strains colonizing rice (Oryza sativa) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR*. Appl. Environ.Microbiol. 67: 3655-3664.

Tang, W.H. 1994. *Yield-increasing bacteria (YIB) and biocontrol of sheath blight of rice*. En: "Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria" (Ryder, M.H., P.M. Stephens, G.D. Bowen, eds.), Division of Soils, CSIRO, Adelaide, Australia. pp. 267-273.

Tang, W.H., H. Yang. 1997. *Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China*. En: "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, present status and future prospectus. (Ogoshi, A., K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, S. Akino, eds.), Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Japón. pp. 4-9.

Tapia-Hernández, T., M.R. Bustillos-Cristales. T. Jiménez-Salgado, J. Caballero-Mellado J., L.E. Fuentes-Ramírez. 2000. *Natural Endophytic occurrence of Acetobacter diazotrophicus in pineapple plants*. Microbial Ecology.

Vallis, I., K.P. Haycock, P.J. Ross, E.F. Henzell. 1967. *Isotopic studies on the uptake of soil nitrogen by pasture plants. III. The uptake of small additions of 15N-labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne*. Aust J. Agric.Res. 18: 865-877.

- Vandermeer, J.** 1989. *The ecology of intercropping*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Peer, R., H.L.M. Punte, L.A. de Weger, B. Schippers.** 1990. *Characterization of root surface and endorhizosphere Pseudomonads in relation to their colonization of roots*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2462-2470.
- Virtanen, A.I., S. Von Hausen, T. Laine.** 1937. *Investigations on the root nodule bacteria of leguminous plants. Excretion of nitrogen in associated culture of legumes and non-legumes*. J.Agric. Sci. 27:584-610.
- Weber, O.B., Teixeira, K.R.S., Kirchhof, G., Baldani, J.L., J.Döbereiner.** 1995. *Ocurrence of endophytic diazotrophic bacteria in pineapple (*Ananas sp.*) and banana (*Musa sp.*)* En "International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics, the Role of Biological Nitrogen Fixation", Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil. Libro de resúmenes, pp.238-239.
- Wilson, D.** 1995. *Fungal endophytes: out of sight but should not be out of mind*. Oikos 73: 274-276.
- Yanni, Y.G., R.Y., Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Philip-Hollingsworth, G. Organbide, F. De Bruijn, J. Stolfus, D. Buckley, T.M. Svmidt, P.F. Mateos, J.K. Ladha, 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.
- You C., F. Zhou.** 1989. *Non nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice*. Can. J. Microbiol. 35:403-408.