



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación de la capacidad competitiva
de diferentes cepas de *Rhizobium*
como parte de la valoración de
su potencial como inoculante.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

OLGA NOHEMÍ HERNÁNDEZ DE LA CRUZ



TUTORA

DRA. MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ ROMERO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del Jurado

Formato

1. Alumna Hernández de la Cruz Olga Nohemí 56-42-93-79 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 095027869
2. Tutora (Propietaria) Dra. María Esperanza Martínez Romero
3. Sinodal 2 (Propietaria) Dra. Mónica Teresa Rosenblueth Laguette
4. Sinodal 3 (Propietaria) Dra. Laura Kawasaki Watanabe
5. Sinodal 4 (Suplente) M. en C. Alfonso José Vilchis Peluyera
6. Sinodal 5 (Suplente) Biól. Alicia Marmolejo Flores
7. Trabajo escrito Evaluación de la capacidad competitiva de diferentes cepas de Rhizobium como parte de la valoración de su potencial como inoculante. 125 p 2007

Dedicatorias

Este trabajo está dedicado principalmente a las tres personas más importantes de mi vida: a mis papás y a Hugo por su apoyo incondicional, por su amor, comprensión y paciencia. Por estar a mi lado, creer en mi y permitirme hacer siempre lo que yo he considerado lo mejor para mi.

A mi Mamá, Leonarda de la Cruz García. Gracias por ser un gran ejemplo de bondad y cariño.

A mi Papá, Florentino Hernández Medina. Gracias por ser un hombre protector, trabajador y preocupado por tu familia.

A Oscar Hugo Alvarez Luquín. Gracias por todos estos años maravillosos junto a ti, por todos los momentos felices que me haces pasar, por el amor, la ternura, porque eres el mejor compañero de vida que pude haber encontrado. Porque te amo.

Quiero agradecerle a la vida por permitirme estar al lado de estas tres personas que son mi ejemplo y mi fuerza para seguir adelante.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por la oportunidad que se me ha dado de ser parte de su comunidad, y a sus académicos que se esfuerzan día a día para que tengamos una educación de calidad y por ayudarnos a encontrar nuestro camino.

Agradezco a la Dra. María Esperanza Martínez Romero por ser una bella persona, por su infinita paciencia conmigo, por su apoyo académico y por permitirme trabajar en su laboratorio. Dra. esperanza, gracias por preocuparse constantemente en apoyar a gente interesada en aprender, para usted mi más profundo respeto y admiración.

Agradezco el donativo del PAPIIT IN201106 otorgado a la Dra. María Esperanza Martínez por DGAPA(UNAM).

Agradezco muy especialmente al M.en C. Marco Antonio Rogel Hernández por haberme dado de su tiempo, por sus enseñanzas y paciencia. Porque su ayuda fué de la más importante. Gracias Toño por haber sido mi apoyo y guía, no tengo como agradecerle todo lo que hiciste por mi.

Agradezco al Dr. Ismael Hernández Lucas por brindarme su amistad, por sus ratos de compañía, por sus consejos académicos y personales. Ismael, gracias por todo, deseo y espero que la vida siempre tenga cosas buenas para ti y tu familia.

Agradezco a todas aquellas personas que con su presencia hicieron de mi estancia en el laboratorio una experiencia muy agradable: Noé, Augusto, Deyanira, Ana Laura, Ernesto, Lourdes, Christian, Jorge Muñoz, Lucila Lulo y Martín García. A todos ellos, gracias por su amabilidad, ayuda y compañía.

Agradezco al Lic. Julio César Martínez Romero por su amabilidad, por el tiempo que me dedicó y por su ayuda en la organización de los datos de este trabajo.

Agradezco a mis sinodales por haber aceptado revisar mi trabajo, por sus observaciones y consejos: Dra. María Esperanza Martínez Romero; Dra. Mónica Teresa Rosembueth Laguette; M. en C. Alfonso Vilchis Peluyera; Dra. Laura Kawasaki Watanabe; y Bióloga Alicia Marmolejo Flores.

Finalmente, agradezco mucho a mis amigos de la carrera, especialmente a Elva, Emilio, Eduardo, Genaro, Margarita, Everardo, Edgardo, Arturo, Hugo, Aldo, Mario y Fernando. A mis amigos de la facultad, especialmente a Otto, Noel, Jesús Onofre, y en general a todo el equipo de Fútbol "SAGREV". A Jesús Muñoz, Arturo y Baltazar. A Julio, Rafael, Marcos, Juan Carlos, Francisco, Oscar, César, Pedro y Héctor. A todos ellos porque siempre estarán en mi mente y mi corazón.

Índice general

0.1.	Resumen	3
0.2.	Introducción	4
0.2.1.	Características e importancia del cultivo de frijol	4
0.2.2.	Simbiosis entre las plantas de frijol y <i>Rhizobium</i>	9
0.2.3.	Características y clasificación de <i>Rhizobium</i>	17
0.2.4.	El nitrógeno y su importancia	20
0.3.	Antecedentes	26
0.3.1.	<i>Rhizobium</i> como inoculante de plantas de interés agrícola	26
0.4.	Objetivos e hipótesis	33
0.4.1.	Objetivos e hipótesis de la primera parte del trabajo. Experimentos de competencia.	33
0.4.2.	Objetivos e hipótesis de la segunda parte del trabajo. Mutagénesis por transposición.	33
0.5.	Método	35
0.5.1.	Experimentos de competencia	35
0.5.2.	Experimentos de mutagénesis por transposición.	37
0.6.	Resultados	39
0.6.1.	Experimentos de competencia	39
0.6.2.	Estimación del número de bacterias en los inóculos y en el suelo empleado.	46
0.6.3.	Peso seco y Reducción de acetileno	52
0.6.4.	Mutagénesis por transposición.	56
0.7.	Discusión	64
0.8.	Apéndices	69
0.8.1.	Apéndice I. Genotipo y fenotipo de las cepas mutantes.	69
0.8.2.	Apéndice II. Zona de estudio.	70
0.8.3.	Apéndice III. Esterilización de la superficie de la semilla, germinación y siembra.	72
0.8.4.	Apéndice IV. Colecta de los nódulos y recuperación de los bacteroides.	76
0.8.5.	Apéndice V. Preparación del inoculante e inoculación.	79
0.8.6.	Apéndice VI. Preparación de medios de cultivo, soluciones nutritivas y antibióticos.	81
0.8.7.	Apéndice VII. electroforesis.	85
0.8.8.	Apéndice VIII. Southern blotting.	90

0.8.9.	Apéndice IX. Hibridación y autoradiografía.	96
0.8.10.	Apéndice X. Determinación del peso seco.	99
0.8.11.	Apéndice XI. Ensayos de reducción de acetileno para medir la actividad de la nitrogenasa.	100
0.8.12.	Apéndice XII. Métodos de conteo de rizobios.	103
0.8.13.	Apéndice XIII. Nodulación en el primero y segundo experimento. .	107
0.8.14.	Apéndice XIV. Mutagénesis con transposones.	114
0.9.	Bibliografía	123

0.1. Resumen

Cuando muchas cepas de *Rhizobium* están en presencia de una leguminosa hospedera, para las que ellas son específicas, ciertas cepas forman nódulos preferentemente con relación a las demás. Las cepas de *Rhizobium* difieren unas de otras en su habilidad para ser seleccionadas por su planta hospedera, esto es, a su capacidad competitiva. Cuando se inoculan las leguminosas, es frecuente que existan en el suelo, de manera natural, poblaciones nativas de rizobios, que compiten con las cepas de los inoculantes por la formación de los nódulos.

Para que las cepas de los inoculantes prosperen con éxito, es preciso inocular con cepas efectivas y competitivas frente a las del suelo. La inoculación con cepas efectivas y mejoradas, a través de las técnicas de biología molecular y ADN recombinante, incrementarían los rendimientos de los cultivos, si pudieran desplazar en la nodulación a las poblaciones nativas del suelo, que normalmente son muy competitivas y que bajo ciertas condiciones, se presentan en altas concentraciones. Desde un punto de vista agrícola la competitividad es, en general, una propiedad deseable. Cuando se inocula un cultivo, lo que se espera es que las cepas introducidas sean las más competitivas frente a las nativas, es decir, que produzcan una mayor cantidad de nódulos.

En este trabajo, la resistencia de las cepas mutantes de *Rhizobium* a un determinado antibiótico es usada como marcador y por lo tanto pueden ser identificadas por su habilidad para crecer ante tal antibiótico. Si las cepas mutantes son inoculadas en una leguminosa, los nódulos ocupados por estas cepas pueden ser identificados plateándolos en un medio que contenga el respectivo antibiótico, puesto que las cepas mutantes pueden crecer y las otras no. De esta manera, la capacidad simbiótica puede ser comparada, entre las bacterias mutantes y las silvestres en diferentes tiempos.

Lo que se pretendió en el presente trabajo es evaluar la capacidad competitiva de algunas cepas de *Rhizobium*, como parte de la valoración de su potencial como inoculante, en suelos con alta diversidad de *Rhizobium* indígenas, como son los de México.

Bajo nuestras condiciones experimentales, de las nueve cepas evaluadas, 3 mostraron una alta capacidad competitiva (FAJ4010, FAJ4006 y FAJ1329) en comparación con los rizobios nativos. Sin embargo, estas tres cepas se caracterizan por no ser buenas fijadoras de nitrógeno, por lo tanto, no pueden ser utilizadas bajo estas circunstancias como inoculantes de suelos agrícolas.

Así mismo, se pretendió evaluar el método de mutación por transposición como una alternativa para generar nuevos tipos bacterianos que tuvieran la capacidad de adquirir una mayor habilidad competitiva.

Nuestros resultados indican que el método de mutación por transposición puede ser empleada para la generación de nuevos genotipos y fenotipos bacterianos, algunos de los cuales con incrementos en su capacidad competitiva.

0.2. Introducción

0.2.1. Características e importancia del cultivo de frijol

Importancia internacional

El cultivo del frijol en el mundo no se ha generalizado como ha sucedido con otros granos, su consumo se encuentra localizado en algunos países de América y África. Dado el consumo localizado del frijol, su producción normal no tiene un peso relevante a nivel mundial dentro de la producción de granos, por su poca importancia relativa. Los cinco principales países productores de frijol son India, Brasil, China, México y Estados Unidos. En el cuadro 1 se muestran los datos de producción de los 5 principales países productores de frijol a nivel mundial.

Cuadro 1: Producción mundial de frijol

País	Producción (miles de toneladas)
India	4,032
Brasil	2,934
China	1,986
México	1,280
EU.	1,183
Otros	5,743

Participación de los 5 principales países en la producción mundial de frijol 1992 - 1995. Fuente: Acerca, con datos de FAO 2000.

Cuadro 2: Superficie cosechada de frijol

País	Superficie (miles de hectáreas)
India	9,702
Brasil	4,938
México	1,824
China	1,356
EU.	687

Fuente: Acerca, con datos de FAO 2000.

En el cuadro número 2 se muestra la superficie cosechada promedio de frijol en los principales países productores a nivel mundial. Es necesario señalar que, a pesar de ubicarnos entre los 5 principales países productores de frijol del mundo, México sigue siendo un país importador. De éstos cinco países, solamente China y Estados Unidos destinan parte de su producción al comercio exterior, siendo éste último nuestro principal exportador.

Importancia nacional

En nuestro país, después del maíz, que es consumido en grandes cantidades, el frijol es considerado como la principal fuente de proteína en el medio rural. Además, su cultivo representa un alto valor ecológico, tanto por mejorar la fertilidad de los suelos, como por sus métodos de siembra, que permiten aprovechar el terreno de manera más efectiva durante los dos ciclos del año, ya sea como monocultivo o asociado con maíz, donde el frijol de guía crece enrollado en el tallo del maíz,

La principal producción nacional se obtiene de áreas temporales, los principales estados productores se ubican en la zona Noroeste (aportando entre el 60 y 70 % de la producción nacional). Su participación en el campo mexicano sigue siendo relevante, ocupando el segundo lugar en los principales cultivos del país. Su cultivo se realiza en 32 estados de la República, sin embargo, los estados de Zacatecas, Sinaloa, Durango, Nayarit y Chihuahua concentran el 63 % de la superficie sembrada y el 65 % de la producción nacional. Analizando la producción por ciclo agrícola, se distingue el ciclo Primavera-Verano que contribuye con el 75 % de la producción. Los estados implicados en esta producción son Zacatecas, Durango, Chihuahua y San Luis Potosí. El 25 % restante de la producción es el resultado del cultivo en el ciclo Otoño-Invierno, destacando en orden de importancia los estados de Sinaloa, Nayarit, Veracruz, Guanajuato y Chiapas.

Chiapas es el estado con mayor superficie sembrada en el Sureste de México. En los últimos 5 años se han establecido en promedio poco más de 121 mil has. que se incrementan con las variedades resistentes al virus del Mosaico Dorado como Negro Inifap, Negro Tacaná y Negro Huasteco, alcanzando en el 2001 la siembra de 126,006 has., con un rendimiento promedio de 574 kg/ha. Para la economía campesina de varias entidades de la República, el frijol es una fuente de ocupación e ingresos, así como la garantía de seguridad alimenticia para el autoconsumo.

El cultivo del frijol en México es muy importante porque es uno de los alimentos que constituyen la base de la dieta en la población. Sin embargo, sólo se han domesticado 5 especies de *Phaseolus*, y de éstas el frijol común (*P. vulgaris*) es la que ha sido estudiada en mayor medida. Las otras cuatro (*P. coccineus*, *P. polyanthus*, *P. acutifolius* y *P. lunatus*) persisten en los sistemas de agricultura tradicional y/o marginada.

El cultivo de frijol en México

En Mesoamérica el frijol ocupaba un lugar especial dentro de los patrones culturales y agrícolas de las civilizaciones precolombinas y constituía dentro de sus dietas un alimento básico importante. Este cultivo, al igual que otros como la calabaza, el chile, el aguacate, el quelite, el maguey, y en un lugar sobresaliente el maíz, fue la base alimenticia de las culturas mesoamericanas. En México, el cultivo de las leguminosas es tan antiguo como las culturas prehispánicas. Los restos arqueológicos muestran evidencias de su uso en la alimentación por más de 4,000 años. El frijol se originó y se diversificó en América mucho antes de que los españoles lo llevaran a Europa hace 500 años junto con *R. etli* [2].

Actualmente, en México *Phaseolus vulgaris* desempeña un papel fundamental en la alimentación, es un alimento primario en la dieta del mexicano. Aporta casi la totalidad de las proteínas que consumen los estratos sociales de menores ingresos, además de ser el complemento indispensable del maíz en la alimentación campesina. De ahí que una

parte importante de la producción se realice en este sector y se destine al autoconsumo.

Ubicación taxonómica, descripción y distribución del género *Phaseolus*

El nombre de este género se debe al parecido de su vaina a un pequeño bote ("*Phaseolus*"); Este nombre fue asignado por Linneo cuando lo describe en su obra "Species plantarum" (1753), en ese entonces formado por 11 especies, de las cuales, sólo 4 pertenecen actualmente al género *Phaseolus*. A la derecha se muestra una fotografía de la vaina de *Phaseolus vulgaris*.



Desde el punto de vista taxonómico el género *Phaseolus* se ubica en la división Magnoliophyta; Clase Magnoliopsida; subclase Rosidae; Orden Fabales; Familia Fabaceae; Subfamilia Papilionoideae; Tribu Phaseoleae y subtribu Phaseolineae. No existe un acuerdo en cuanto al número real de especies que componen el género y se infiere que pueden ser de 50 a 55 taxones. Este género está estrechamente relacionado con el género *Macroptilium* (ambos endémicos de América) y con la porción Americana de *Vigna*. Se ha definido el género *Phaseolus* y ha considerado sólo a las especies del Nuevo Mundo; las especies del Viejo Mundo, como el garbanzo (*Cicer arietinum*) y el frijol de arroz son ahora clasificados como pertenecientes al género *Vigna*.

La distribución geográfica del género *Phaseolus* es amplia y se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta el noroeste de Argentina. Sin embargo, más del 90 % de las especies se encuentran distribuidas en Mesoamérica, principalmente en los claros de los bosques de pino-encino con una amplitud altitudinal de 10 a 2,700 msnm. Las especies silvestres de *Phaseolus*, en general, tienden a ser más numerosas en México a lo largo de las principales cordilleras, esta diversidad decrece drásticamente al sur de Guatemala.

Importancia de las especies de *Phaseolus*

El género *Phaseolus* es trascendente debido a que las semillas de las formas cultivadas están entre los granos comestibles más importantes en varios países del mundo [12]. En efecto, las cinco especies comprenden formas silvestres y cultivadas. Estas especies han sido una importante fuente de alimento humano desde hace miles de años y han estado asociadas con las principales culturas americanas, según la evidencia de los hallazgos arqueológicos de Kaplan, (1967 y 1981); y Kaplan y Kaplan, (1988) [12]. Aparte de las cinco especies mencionadas, hay otras que han sido utilizadas, aunque en forma más local, por grupos indígenas en el pasado y aún en el presente. Así se tiene lo descrito por Nabhan et al. (1980) sobre *P. maculatus* aún utilizado en Chihuahua, Méx., por sus semillas y sus raíces engrosadas. En el mismo estudio Debouck (1987), ha señalado, que aunque carece de evidencias de que el hombre antiguo hizo uso de las especies no cultivadas en la actualidad, tampoco se puede descartar que algunas de ellas se pudieran haber cultivado y utilizado en el pasado [12].

Las especies silvestres son de gran importancia porque en su diversidad genética pueden existir características de resistencia y/o tolerancia a enfermedades, plagas, sequía,

etc. (Hucló y Scoles, 1987; y Simmonds et al., 1989; citados por Martínez [12]).

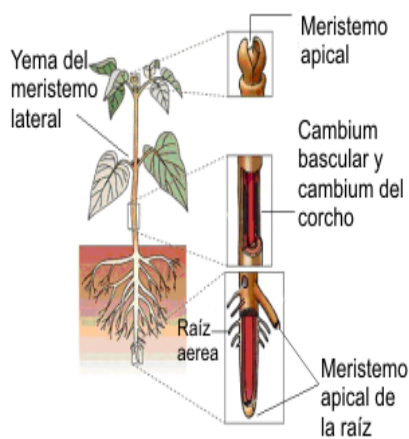
Los pueblos precolombinos cultivaron las especies domesticadas del género *Phaseolus* durante miles de años, como principal fuente de proteínas, ya que los animales no jugaron un papel importante en la alimentación o como fuerza de trabajo, especialmente en Mesoamérica. En la época precolombina, el frijol común (*P. vulgaris* L.) tuvo una mayor aceptación y se seleccionó de manera más intensa, por lo que, el esfuerzo por su mejora se ha concentrado principalmente en éste. En una época en que se ha aceptado el modelo de una agricultura a la vez sostenible y productiva, el frijol merece ser objeto de renovada atención [13]. A la derecha se muestra una fotografía del frijol común *Phaseolus vulgaris*.



Características de adaptación

Es importante conocer la capacidad de adaptación de las especies cultivadas, tanto para seleccionar las regiones en las cuales se podrían introducir estas especies, como para llevar a cabo su adecuado manejo agronómico. Algunos de los aspectos de dicha adaptabilidad del frijol común *Phaseolus vulgaris* son: por lo general, no se adapta bien a las regiones tropicales húmedas con alta temperatura, pero crece bien en áreas subtropicales con lluvias regulares y temperatura moderada. En las zonas templadas se adaptan a altitudes que varían desde el nivel del mar hasta cerca de los 3,000 metros de altura dependiendo de la latitud, pero es muy sensible tanto a las heladas como a las altas temperaturas. Las condiciones secas durante las épocas críticas de floración y el llenado de las vainas le son muy perjudiciales. Por otra parte, la abundancia de lluvias también afectan al frijol común, por ser muy susceptible al exceso de agua en el suelo, además de que se incrementa la frecuencia de enfermedades, tales como bacteriosis y antracnosis.

Fenología



El desarrollo de la planta depende de la interacción coordinada de factores hereditarios y ambientales sobre sus procesos fisiológicos internos. El crecimiento y la diferenciación de las plantas se consideran también como una respuesta a estos factores. El fenotipo de una planta está determinado por la interacción de su genotipo y el medio que le rodea durante sus diferentes etapas de desarrollo [14].

A la izquierda se muestra un esquema donde se muestran los principales componentes estructurales de la planta de frijol.

Producción de materia seca

El crecimiento de la planta o de algunos de sus órganos puede ser estudiado por la medición de variables tales como: la longitud, el volúmen, el peso fresco, el peso seco, etc., a intervalos sucesivos durante el periodo de desarrollo. Durante las primeras fases del crecimiento, la planta del frijol asigna el mayor porcentaje de la biomasa a las hojas, tallo y raíces. La mayor parte de los estudios sobre el crecimiento vegetal consideran solamente la parte aérea, excluyendo a la parte radical por los problemas que tiene su determinación en los experimentos de campo. De modo que la raíz generalmente se ignora en los planes de mejoramiento genético y en la evaluación de la influencia del ambiente sobre los cultivos. Sin embargo, la raíz es uno de los órganos más importantes de la planta, pues además de las funciones de sostén, es el órgano de almacenamiento y absorción de los nutrientes, así como el punto de contacto con el mundo edáfico. Por ser la raíz un órgano no fotosintético, su crecimiento depende del suministro de carbohidratos desde la parte aérea de la planta, además del agua, minerales, hormonas, oxígeno disponible y una temperatura favorable [15].

En el frijol común el peso seco del tallo es una característica morfológica importante en la evaluación de los genotipos y fenotipos debido a que está relacionado con los aspectos más importantes de la arquitectura de la planta. Los valores del peso seco de las hojas pueden aumentar hasta poco antes de que se inicia el envejecimiento, posteriormente ocurre la abscisión marcada de hojas maduras, debido al flujo preferente de fotosintatos hacia los frutos y por su translocación desde las hojas viejas hacia zonas de mayor actividad metabólica. Como el peso foliar está directamente relacionado con el área foliar total, éste provee información indirecta sobre el potencial fotosintético de las plantas [15]. El estatus nutricional de la planta puede alterar considerablemente la proporción de materia seca y carbohidratos entre tallos y raíces.

El rendimiento puede formularse como la expresión fenotípica de interés antropocéntrico, y es el resultado final de los procesos fisiológicos, ecológicos y de manejo, que se reflejan en la morfología de la planta (Kohashi,1979 y Ballesteros, 1997; citado por Martínez [12]).

Los principales componentes fisiológicos del rendimiento son la acumulación de fotosintatos, que pueden expresarse como el peso seco total de la planta, también llamado rendimiento biológico o biomasa; además, de la distribución de dicho fotosintato, representado por el peso seco de la semilla, también llamado rendimiento económico o de grano. A la derecha se muestra un fotografía del ejote, el fruto del frijol.



0.2.2. Simbiosis entre las plantas de frijol y *Rhizobium*.

Comunicación entre microorganismos

Los microorganismos no son simples y solitarios, son capaces de interactuar y comunicarse de manera armoniosa, cuando entran en contacto directo o por medio de señales químicas, con otros organismos, coordinando así su desarrollo y comportamiento. Existe una amplia diversidad de lenguajes químicos que los microorganismos usan para comunicarse de manera eficiente con sus congéneres, y así poder transmitir información acerca de las condiciones físicas y químicas del ambiente y sobre la disponibilidad de los nutrientes en su entorno [16]; o bien, para comunicarse con organismos “superiores” [17]. La evolución bacteriana ha desarrollado una gran diversidad de mecanismos que les han permitido adaptarse a nuevos y diferentes nichos ecológicos, así como contrarrestar los cambios bruscos en las condiciones de su ambiente [16].

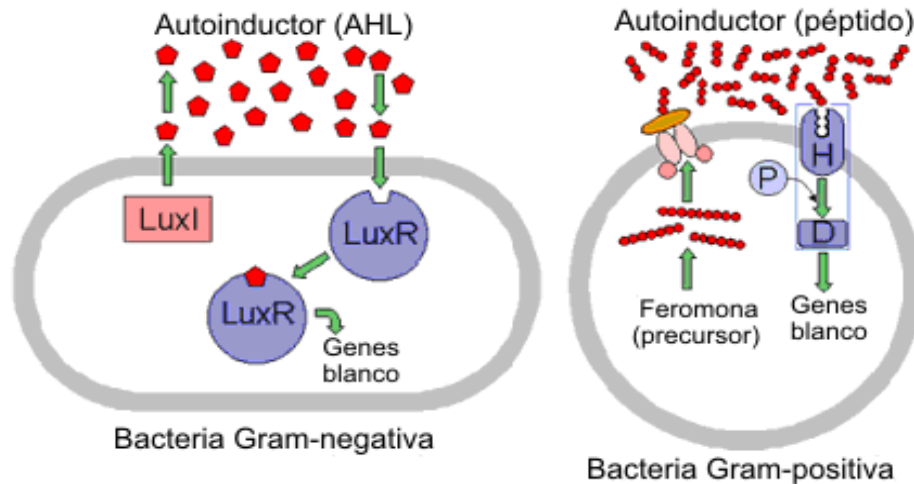
El paradigma para la señalización intercelular entre bacterias es el sistema *Quorum sensing* (detección de quórum), tomando como modelo clásico a la bacteria marina Gram negativa *Vibrio fischeri*, que aunque puede vivir libremente, se ha adaptado para habitar dentro de un órgano especializado en el calamar *Euprymna scolopes*. A edad muy temprana, éste calamar acepta a un solo tipo de bacterias (*V. fischeri*) dentro de su órgano especializado. Gracias a la disponibilidad de nutrientes proporcionados por el calamar en éste sitio, las bacterias se multiplican hasta alcanzar una alta densidad, y en ese momento, la población bacteriana comienza a producir luz. En esta relación simbiótica el calamar brinda protección y nutrientes a las bacterias, mientras que las bacterias producen luz en la parte inferior del calamar, que es dónde se localiza el órgano de simbiosis. Como el calamar es de hábitos nocturnos, el producir luz le permite no proyectar sombra, o bien, asemejar la apariencia de la luna, y de esta manera, pasar inadvertido para sus depredadores o para sus presas [16].

La producción de luz por *V. fischeri* es regulada a través de una molécula de señalización que es dependiente de la densidad celular conocida como autoinductor, que se acumula en el medio externo de la célula y es detectada por ésta. El autoinductor de *V. fischeri* es una acil-homoserina lactona que es sintetizada por la enzima *LuxI* sintetasa y detectada por el activador transcripcional *LuxR*. Se han encontrado homólogos del sistema *LuxI/LuxR* en una amplia variedad de bacterias Gram-negativas, que controlan la expresión de genes de virulencia, conjugación de DNA y formación de biopelículas (*biofilms*).

La comunicación colectiva por detección de quórum es un mecanismo ampliamente distribuido en muchas de las especies bacterianas. También es utilizado por ellas en su relación con organismos “superiores” en procesos de simbiosis y de patogenicidad. Además, se sabe que las bacterias no se limitan a poseer un solo sistema de comunicación, sino que, en ocasiones son capaces de poseer dos sistemas de detección de quórum. Estos sistemas utilizan distintas moléculas autoinductoras (acil-homoserinas lactonas). Existe un amplio polimorfismo entre los grupos de genes que controlan el sistema de *Quorum sensing*, de tal manera que puede existir una amplia especificidad debido a la vasta gama de autoinductores sintetizados (Tortosa y Dubnau,).

El sistema de *Quórum sensing* existe también en bacterias Gram positivas, pero en este caso la molécula de señalización es un péptido, que puede estar o no modificado.

Los sistemas de Quórum sensing basados en péptidos están mediados por un grupo de genes que codifican el péptido, una enzima que modifica el péptido, en casos donde hay modificación post-traducciona, y un sistema de dos componentes para responder ante el péptido. Entre los fenómenos biológicos que están sujetos al sistema de *Quorum sensing* y que son mediados por péptidos está la competencia genética en *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pneumoniae* y la expresión de los genes de virulencia en *Staphylococcus aureus* [17]. En la siguiente figura se muestran dos ejemplos de los sistemas de *Quorum sensing* en bacterias Gram negativas y positivas. La bacterias Gram negativas utilizan para comunicarse y regular procesos biológicos moléculas tipo acil homoserinas lactonas y la Gram positivas péptidos que en algunas ocasiones estan modificados.



Se han descrito otros sistemas de detección de quórum que no implican homoserinas lactonas, ni proteínas tipo *LuxR/LuxI*. Así, en *Streptomyces*, unas moléculas llamadas gama-butirolactonas son las encargadas de regular la producción de antibióticos en estas especies [16]. En años recientes se han descrito una gran variedad de funciones reguladas por detección de quórum, que modulan el comportamiento poblacional en respuesta a la densidad celular, tanto en el laboratorio como en la naturaleza. El estudio de este tipo de sistemas se hace principalmente a través de mutaciones específicas o por medio del empleo de moléculas inhibitoras.

Las plantas viven en asociación con una gran diversidad de microorganismos desde el momento en que son sembradas en el suelo, en forma de semilla, hasta que mueren. Muchas de estas interacciones pueden resultar en una enfermedad, como cuando las plantas se asocian con microorganismos patógenos. Sin embargo, la mayor parte de las interacciones de plantas con microbios no terminan en una enfermedad, pues se asocian con microorganismos benéficos, como son las bacterias diazotróficas, que contribuyen a la nutrición de la planta y a su establecimiento en el suelo, de manera significativa [18].

Muchas plantas pueden crecer en suelos pobres en nutrientes, esto se debe a que pueden formar asociaciones simbióticas con microorganismos. Estas asociaciones requieren un diálogo entre las dos partes (microsimbionte-macrosimbionte) [36]. Un ejemplo son las bacterias del género *Rhizobium* que habitan en el suelo y son capaces de establecer una relación simbiótica altamente específica dentro de unas estructuras llamadas

nódulos, que se forman en las raíces de plantas leguminosas. En los nódulos, donde la concentración de oxígeno es mínima, las bacterias son capaces de comenzar a fijar nitrógeno atmosférico. Para que *Rhizobium* comience a interactuar con la planta, necesita de un sistema tipo *Quorum sensing* que requiere N-acil-homoserina lactonas [16], que le permite una comunicación entre los microorganismos de su género.

La habilidad de las plantas para recibir, integrar e intercambiar señales moleculares con estos organismos es el resultado de su evolución conjunta, es decir, a su coevolución [19]. Las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos moleculares de señalización que les ayudan a comunicarse y responder ante los organismos con los que está interactuando en su medio ambiente. Las señales aparecen como redes complejas a escalas moleculares, celulares y bioquímicas, más que un simple camino lineal de señalización. Una vez que la planta percibe la presencia de un microorganismo, en respuesta, altera sus patrones de expresión genética [19]. Por análisis mutacionales se ha revelado la existencia de muchos genes implicados en estas asociaciones.

Se conoce mucho acerca del intercambio de señales químicas entre las bacterias del género *Rhizobium* y las plantas leguminosas, que se da durante la infección de los pelos radicales y la iniciación de la formación del nódulo en dichas plantas [17]. Una característica importante de este sistema es que se requieren relativamente pocos genes bacterianos para que se de este reconocimiento [23]. Al tratar de identificar las bases genéticas del reconocimiento entre plantas y sus microorganismos simbiotes, se presentan varias dificultades, especialmente por el lado de las plantas, ya que, como es el caso de las leguminosas, muchas presentan genomas relativamente grandes, algunos más grandes que el genoma humano, y por ese motivo es difícil identificar los puntos de mutación [36].

La cepa de *R. etli* CNPAF512, que es la cepa parental a partir de la cual se generaron las cepas mutantes utilizadas en este trabajo, produce un autoinductor que inhibe el crecimiento de *R. leguminosarum* *bv. viciae* 248, y además, activa el sistema *tra* de *Agrobacterium tumefaciens*. La producción de este compuesto en *R. etli* es dependiente de dos genes, llamados *cinR* y *cinI*, que codifican para un regulador transcripcional y una autoinductor sintasa, respectivamente [20].

Las bacterias y las células eucariontes tienen un rango extraordinario de estrategias para coordinar su desarrollo, motilidad y comportamiento entre ellos mismos y con otros organismos. Pero además de ésta comunicación interespecífica, las células responden a cuestiones internas, tales como, las que dirigen el ciclo celular y la muerte celular. El conocimiento del desarrollo y comportamiento de una gran cantidad de microorganismos está lejano de ser completo, pero con la aplicación de poderosas herramientas y nuevos métodos de estudio, tal como la disponibilidad de las secuencias genómicas y el uso de microarreglos génicos, se puede substancialmente profundizar en la comprensión de la comunicación bacteriana. De esta manera, se puede utilizar la genética molecular, la genómica, proteómica y metabolómica en conjunto, para elucidar las complejas interacciones que controlan la patogénesis y la simbiosis.

Condiciones de *Rhizobium* en vida libre

Cuando *Rhizobium* no se encuentran viviendo en simbiosis dentro de los nódulos de alguna planta, comúnmente forma parte de las poblaciones microbianas del suelo. Fuera

de los nódulos, *Rhizobium* se encuentra principalmente en la superficie de las raíces (rizoplano), en la rizósfera que es el suelo próximo a las raíces y que es influenciado por éstas, y en menor número en el suelo no rizosférico. El incremento en número de *Rhizobium* en la rizósfera, es promovida por la excreción de compuestos por las raíces de las plantas, especialmente por las leguminosas. El número de rizobias en el suelo varía desde cantidades no detectables hasta 1.000.000 de células por gramo de suelo. Existe un procedimiento de conteo indirecto, que se basa en la aplicación del estimado del número más probable (MPN) que determina el tamaño de las poblaciones de rizobia en el suelo.

El suelo es el principal reservorio de *Rhizobium* de vida libre. En cultivos puros de leguminosas o de alta densidad, la multiplicación en la rizósfera y la liberación de *Rhizobium* de los nódulos senescentes, contribuyen a la recolonización del suelo. Las diversas especies reconocidas de rizobia, no se encuentran localizadas universalmente en todos los suelos, pero donde no existen, éstas pueden ser introducidas con fines agrícolas en las semillas o por inoculación directa del suelo.

En los centros de origen de las leguminosas hospederas, donde la diversidad de leguminosas es mayor, es más probable encontrar una mayor diversidad genética de rizobias indígenas. Por ejemplo, en México, que es considerado como centro de origen del frijol y de muchas otras leguminosas, se han hecho estudios sobre la diversidad genética de bacterias aisladas de estas plantas y han demostrado que existe una gran diversidad de *Rhizobium* capaces de nodular frijol.

Las rizobias del suelo son susceptibles al ataque y lisis por bacteriófagos específicos, los cuales abundan y están ampliamente distribuidos al igual que su rizobia hospedera. Por ejemplo, las bacterias Gram negativas *Bdellovibrio* son parásitos obligados comunes de rizobias de vida libre.

El proceso de infección y *Rhizobium* como simbiote



Las rizobias de vida libre son capaces de entrar en contacto con los pelos radicales de plantas leguminosas susceptibles y penetrarlas, estimulando posteriormente la formación de nódulos radicales, que son una especie de tumor benigno. Son estructuras únicas de interés agronómico ya que proporcionan una alternativa frente al uso de fertilizantes nitrogenados que dependen de mucha energía para su fabricación.

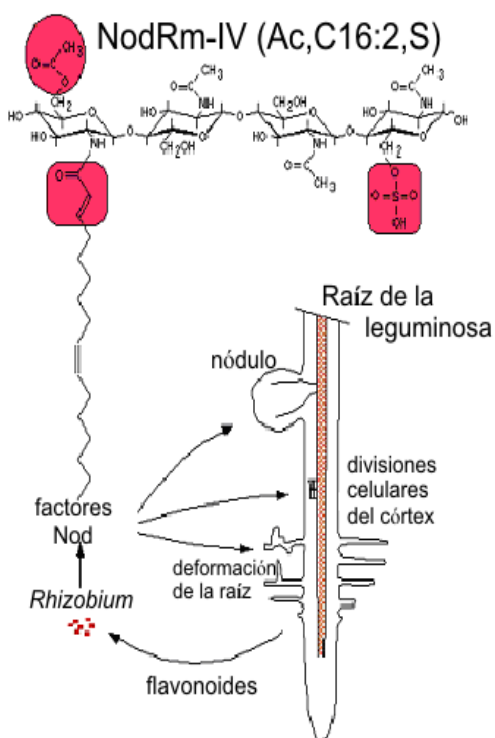
Los géneros pertenecientes a la familia Rhizobiaceae que nodulan leguminosas son: *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*. En términos generales, se puede utilizar el término "rizobia" para todos estos géneros. Cada especie y cada cepa tiene la capacidad de nodular un particular grupo de leguminosas hospederas, y son clasificadas de acuerdo a su rango de hospedero: las de rango de hospedero amplio que nodulan muchas plantas de diferentes especies y las de rango de hospedero estrecho que nodulan una o pocas especies vegetales. Los nódulos formados en una plan-

ta por diferentes bacterias exhiben similitudes en su desarrollo, por la homología de los procesos que son determinados por la planta [21].

Las rizobias son únicas entre los organismos del suelo por su habilidad de fijar nitrógeno en asociación simbiótica con leguminosas y excepcionalmente, con una no leguminosa, *Parasponia*. La familia de las leguminosas tiene tres subfamilias, y aunque más del 90 % de las especies de la familia Papilionoideae y Mimosoideae son capaces de entrar en simbiosis con rizobia, solamente los miembros del género *Caesalpinioideae* de la tercera subfamilia, pueden hacerlo (Doyle, 1994; citado por Pawlowski y Bisseling [22]).

La comunicación inicial entre la bacteria y la planta comienza con la inducción de la expresión de los genes *nod* de *Rhizobium* que se requieren para la nodulación, por compuestos liberados de las raíces de las leguminosas. Esto puede ocurrir en ausencia del contacto directo entre las raíces de la planta y la bacteria. Los compuestos de las plantas pueden inducir a los genes *nod*, aún cuando se encuentran en concentraciones muy bajas (10nM), los cuales incluyen sustitutos de flavonas o moléculas de flavononas, tal como, la luteína en la alfalfa; 7,4 di-hidroxi flavona en el clavel, y naringenina en *Vicia* y chícharo [23]; y en el frijol, eridictiol, naringenina y genisteína [?].

Las leguminosas hospederas liberan compuestos de manera especí y sirven como señales que inducen la expresión coordinada de los genes *nod* [?], que a su vez, codifican enzimas involucradas en la síntesis de compuestos proteicos de bajo peso molecular conocidos como factores Nod, los cuales son variantes de una estructura básica de oligoquitina con un lípido pequeño en el extremo reductor [?], que causan cambios morfológicos en la raíz de la planta hospedera, como la deformación y ramificación de los pelos radicales, y en el caso de las leguminosas de semilla pequeña, inhiben el crecimiento completo de la raíz (van Brussel et al., 1986; citado por Downie y Johnston, [23]). Dichos factores *Nod* determinan el rango de hospedero exhibido por una bacteria. Se ha observado que una misma bacteria produce varios factores *Nod* (Schultze et. al., 1992 y Stokkermans et. al., 1996; citados por Rosenblueth M. et. al. [?], que parecen tener efectos sinérgicos.



Los genes *nod* han sido clasificados en “comunes”, tal como los *nodABC*, que son esenciales para que la nodulación se lleve a cabo; y los “hospedero específico”, que ayudan a determinar el rango de hospedero y son encontrados solo en ciertos tipos de bacterias.

Las diferentes plantas secretan distintos flavonoides inductores y una sola planta puede segregar diferentes inductores a diferentes tiempos durante su desarrollo. Además de su papel en la inducción de los genes *nod*, estos compuestos pueden causar un incremento del crecimiento de *Rhizobium* (Phillips, 1991; citado por Fisher y Sharon [21]; También muestran una actividad mitogénica, ya que, añadidos a plantas en ausencia de bacterias son capaces de promover la producción de nódulos [?][6].

En la figura anterior se muestra una representación esquemática del proceso de inducción de la nodulación por los exudados radiculares. Las plantas leguminosas secretan por la raíz compuestos químicos como los flavonoides que inducen la expresión de los genes *nod* que a partir de ellos se sintetizan los factores Nod de *Rhizobium*, los cuales son necesarios para iniciar el proceso de infección y nodulación en leguminosas específicas.

La expresión de los genes *nod* mediados por inductores de plantas requieren de la presencia de la proteína NodD. El gen *nodD* existe como un solo gen en algunos rizobios, pero como una familia multigénica en otros, que codifican para una proteína de membrana de *Rhizobium* llamada NodD que reconoce a los diferentes flavonoides. Las proteínas NodD de diferentes fuentes difieren a su respuesta ante diferentes hospederos, comportándose de una manera hospedero-específica, y son generalmente más activos en combinación con los extractos de las plantas que normalmente nodulan [21]. En las diferentes especies bacterianas existen diferentes alelos múltiples de *nodD*, esto permite la percepción de diferentes inductores hospedero-específico optimizando la nodulación por asociación simbiótica. El amino(N)-terminal de las proteínas *NodD* es mucho más conservado que el carboxilo(C)-terminal, implicando que la porción del C-terminal tiene una función variable, tal como el reconocimiento y unión a diferentes flavonoides, donde el N-terminal es una porción que tiene la capacidad de unirse al DNA de manera específica. Se han hecho análisis de mutantes del gen *nodD* sugiriendo que la especificidad de los flavonoides está ampliamente determinada por la porción C-terminal de dicha proteína.

Las estructuras de los factores Nod de diferentes bacterias, que inducen la morfogénesis de los nódulos, difieren en las sustituciones de sus ácidos grasos. Además, la longitud de la estructura de n-acetilglucosaminas puede variar, pueden ser pentaméricos o tetraméricos. Dos generalizaciones emergen a partir de esto: primero, las cepas bacterianas de manera individual sintetizan una familia de factores que pueden diferir ligeramente en la longitud y/o en sustituciones; segundo, las diferentes sustituciones generalmente son observadas cuando los factores de diferentes especies son comparados. Así, la estructura de los factores *Nod*, puede no sólo ser importante para distinciones entre un mayor rango de hospedero entre especies y biovariedades de rizobios, sino además, en la preferencia u optimización de la nodulación de algunas plantas por algunas cepas [21].

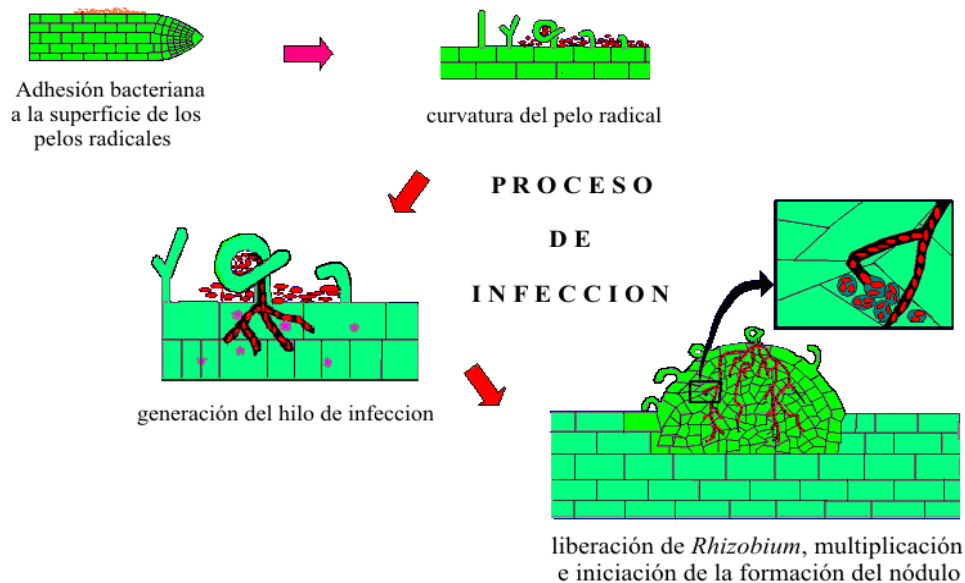
En las cepas de rizobios conocidas como de crecimiento rápido, tal como *Rhizobium spp*, los genes *nod* están presentes en plásmidos simbióticos. Cuando son clonados los genes *nod* de una cepa de *Rhizobium* y transferidos a otra cepa que ha sido curada (escindida) del plásmido simbiótico, la cepa receptora adquiere la nodulación característica de la cepa donadora. La infección y la nodulación se llevan a cabo (aunque los nódulos no fijan nitrógeno debido a la falta de genes bacterianos que codifican para esa función), indicando que estos genes llevan todas las funciones esenciales hospedero-específico.



Comúnmente, el desarrollo de una interacción simbiótica involucra alguna diferenciación del endófito. En los nódulos de las leguminosas, los rizobios se diferencian a bacteroides fijadores de nitrógeno. Este proceso involucra un marcado incremento de tamaño, un cambio en la morfología de las células en forma de bacilo a células ramificadas y cambios en antígenos de superficie [22]. La fotografía de la izquierda muestra

el corte transversal de un nódulo de frijol donde se pueden observar los bacteroides de *Rhizobium* en su interior [3].

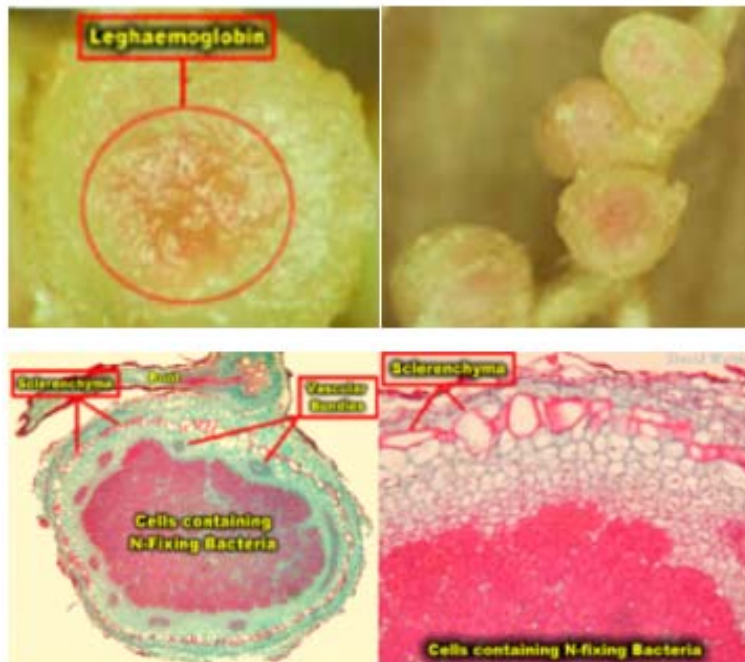
La penetración ocurre por una compleja serie de interacciones, conocidas colectivamente como el proceso de infección. Éste comienza con la adhesión de rizobias específicas a la superficie de los pelos de las raíces. La adhesión es seguida por la deformación y enrollamiento de los pelos radicales, en ellos se desarrolla gradualmente la formación de un hilo de infección, terminando en la formación de una estructura tubular, que frecuentemente es una invaginación de la pared de dichos pelos. Los hilos de infección contienen una gran cantidad de células de rizobia. Las ramificaciones del hilo de infección pasan a través del cortex de la raíz, en proximidad con los núcleos de las células hospederas. Las rizobias son liberadas de las puntas del hilo de infección al citoplasma de las células hospederas y son rodeadas por una membrana de origen vegetal conocida como peribacteroidal, donde posteriormente se multiplican. Una vez que se liberaron las rizobias, las células hospederas pasan por varias divisiones celulares tetraploides, de manera rápida y continua. El resultado es una estructura llamada nódulo, el cuál puede ser de tipo determinado o indeterminado, que en el caso de los nodulos de frijol son de tipo determinado, en ellos el centro contiene a las células de rizobia y el área cortical está ocupada por el sistema vascular, que conecta al nódulo con la raíz. Los rizobia se dividen y se diferencian a bacteroides. La membrana peribacteroidal separa de manera efectiva a los bacteroides del citoplasma de la planta, de tal manera que la planta tenga un medio de regular el intercambio de nutrientes con los bacteroides. De ésta manera, la bacteria se establece, evadiendo la respuesta de defensa de la planta. En la siguiente figura se esquematiza el proceso de infección que se divide principalmente en los siguientes eventos: adhesión, deformación de los pelos radicales, formación del hilo de infección, liberación de los bacteroides, multiplicación en el interior de las células hospederas e inicio de la formación del nódulo.



Una sola célula infectada de una planta madura de frijol puede contener arriba de 10.000 unidades peribacteroidales. Las formas de los bacteroides encontrados en los nódulos

los, pueden variar considerablemente. La planta es la que determina, de una manera importante, el tamaño, la forma y el número de bacteroides, dentro de cada unidad peribacteroidal.

Está ampliamente aceptado que la síntesis y contenido de una proteína llamada leghemoglobina (Lb), caracterizada por un color rojo o rosa, en el tejido del nódulo, está correlacionada con una simbiosis efectiva y la capacidad de fijar nitrógeno. Sin embargo, la Lb puede estar ausente o presente en pequeñas cantidades en los nódulos inefectivos cuando estos son observados en su interior. La síntesis de Lb requiere de información genética de la leguminosa y sólo se sintetiza en simbiosis. Las siguientes fotografías (las dos primeras) muestran el interior de nódulos de *Rhizobium* donde se puede observar la coloración rosada producida por la presencia de la leghemoglobina que es típica de un nódulo funcional fijador de nitrógeno. La leghemoglobina es capaz de atrapar el oxígeno y crear dentro del nódulo un medio bajo en oxígeno [4]. Las dos fotografías de abajo muestran un corte de un nódulo determinado donde se observa una gran cantidad de células infectadas por rizobios. Muestra el esclerénquima de la planta que ayuda a reducir los niveles de O_2 dentro del nódulo, así como el sistema vascular de la planta que transporta azúcar dentro del nódulo y compuestos nitrogenados fuera del nódulo [4].



La enzima nitrogenasa es un complejo constituido por dos enzimas: una proteína que contiene Fe y una proteína que contiene Fe-Mo. Este complejo es el responsable de la conversión (reducción) de nitrógeno atmosférico a amonio en el interior de los nódulos y sólo se sintetiza en el citosol de los bacteroides.

0.2.3. Características y clasificación de *Rhizobium*

Características morfofisiológicas de *Rhizobium* de vida libre

Las Rhizobaceas son un grupo de bacterias pertenecientes a las alfa-protobacterias. Rizobia es un grupo de bacterias heterogéneo. Se caracteriza por incluir bacterias noduladoras de raíces de plantas de la familia Leguminosae. Son de tamaño medio, 0.5-0.9 μ . Son microsimbiontes facultativos. No forman endosporas, son Gram negativas y son móviles por un único flagelo polar o 2-6 flagelos peritricos. Son bacterias predominantemente quimiorganotrofas, aeróbicas, y son relativamente fáciles de cultivar. Crecen bien en presencia de oxígeno y utilizan como fuente de energía hidratos de carbono relativamente simples y compuestos aminados. Todas las cepas utilizan glucosa, galactosa, fructuosa, tiamina y pentatenato de calcio. El Fe^{++} es necesario para la síntesis de ferredoxina y de una hemoproteína importante que constituye la leghemoglobina, presente en la Fe-proteína y la Mo-Fe-proteína (componentes de la nitrogenasa). La escasez de cationes divalentes (Ca, Mg) conduce a una pérdida marcada de viabilidad. La presencia del cobalto es importante para la síntesis y funcionamiento de la vitamina B12. La deficiencia de Zn tiene un efecto adverso sobre la nodulación y se observa sobre todo cuando hay altos niveles de fósforo [27]. Estos mismos autores citan que cuando falta Mo se forman más nódulos, pero son menos eficientes y su estructura se asemeja a la de los nódulos inactivos, es decir, no fijadores de nitrógeno. La dificultad para la asimilación de Mo parece ser una de las principales limitaciones para la fijación del N_2 en el frijol, especialmente en los suelos ácidos. Se ha demostrado que cuando se suministra a este tipo de suelo Mo y Ca, el frijol es capaz de obtener todo el nitrógeno necesario para producir 3000 kilogramos de semilla por hectárea.

Con excepción de unas cuantas cepas y solo bajo condiciones especiales, no se ha encontrado que fijen nitrógeno en vida libre. Algunas rizobias requieren de vitaminas para crecer. *Rhizobium* spp. pierden rápidamente su viabilidad en agua. El óptimo crecimiento de muchas cepas está en medios compuestos, con un rango de temperatura entre 25 y 30 grados centígrados y a un pH de 6.0-7.0. A pesar de su común metabolismo aeróbico, muchas cepas son capaces de crecer bien en condiciones microaerofílicas, a una tensión de oxígeno de menos de 0.01 atm.

Generalmente muchas rizobias producen colonias blancas, pero hay algunas que producen un pigmento rojo carotenoideo cuando se cultivan en medio YM. Otra característica interesante son sus reacciones de crecimiento en medio YM con azul bromotimol (pH 6.8), donde los rizobia de crecimiento lento (ahora designados como pertenecientes al género *Bradyrhizobium*) producen una reacción alcalina.

El análisis genético de la bacteria ha permitido identificar más de 30 genes, cuya función es necesaria para el desarrollo de un nódulo fijador de N_2 y que no se necesitan para el crecimiento vegetativo de la bacteria [25].

En *Rhizobium*, los genes para la formación de nódulos y para la fijación de nitrógeno se encuentran en plásmidos [?]. En general, las especies de *Mesorhizobium*, así como las de *Bradyrhizobium*, tienen su información genética para nodular y fijar nitrógeno en el cromosoma [26].

Clasificación de *Rhizobium*

Los grandes avances de los métodos de la Biología Molecular han contribuido a la clasificación de este grupo de organismos. Sin embargo, las clasificaciones propuestas de rizobia son muy complejas, y son revisadas periódicamente debido a nuevas publicaciones que proponen nuevos géneros y nuevas especies. Este problema se incrementa debido a que, a pesar de los grandes esfuerzos realizados en ésta área, hace falta más investigación, pues la visión que se tiene es muy fragmentada. El cuadro número tres se muestra una propuesta taxonómica para Rhizobia.

Cuadro 3: Taxonomía de Rhizobia (1999)

Género	Especie	Principal planta con la que se asocia	Referencia
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	De Lajudie et. al, 1998
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et. al., 1998
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>elkanii</i> <i>liaoningense</i> <i>japonicum</i>	soya soya soya	Kuykendall et. al., 1992 Xu et. al., 1995 Jordan 1982
<i>Mesorhizobium</i>	<i>amorphae</i> <i>ciceri</i> <i>huakuii</i> <i>loti</i> <i>mediterraneum</i> <i>plurifarium</i> <i>tianshanense</i>	<i>Amorpha fruticosa</i> <i>Cicer arietinum</i> <i>Astragalus</i> <i>Lotus</i> <i>Cicer arietinum</i> Acacia y <i>Leucaena</i> <i>Glycyrrhiza</i> , <i>Sophora</i> , <i>Glycine</i> y otros más	Wang et. al. 1999 Nour et. al., 1994 Chen et. al., 1991 Jordan 1984 Nour et. Al 1995 De Lajudie et. al., 1998 Chen et. al., 1995 Tan et. al., 1997
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i> <i>galegae</i> <i>gallicum</i> <i>giardinii</i> * <i>hainanense</i> <i>huautlense</i> <i>leguminosarum</i> <i>mongolense</i> <i>tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Galega</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Stylosanthes</i> , <i>Centrosema</i> , <i>Desmodium</i> , <i>Tephrosia</i> <i>Sesbania herbacea</i> <i>Vicia</i> , <i>Trifolium</i> y <i>P. vulgaris</i> <i>Medicago ruthenica</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Leucaena</i>	Segovia et. al., 1993 Lindström et. al, 1989 Amarger et. al., 1997 Amarger et. al., 1997 Chen et. al., 1997 Wang et. al., 1998 Jordan, 1984 Van Berkum et. al., 1998 Martínez-Romero et. al., 1991
<i>Sinorhizobium</i>	<i>fredii</i> <i>meliloti</i> <i>saheli</i> <i>terangae</i> <i>medicae</i>	soya <i>Medicago sativa</i> <i>Sesbania</i> <i>Sesbania</i> y <i>Acacia</i> <i>Medicago spp.</i>	Keyser et. al., 1992 Jordan, 1984, De Lajudie et. al., 1994 De Lajudie et. al., 1994 De Lajudie et. al., 1994 Rome et. al., 1996

* Esta es la rama más distantemente relacionada con *Rhizobium* y tal vez constituya un nuevo género en el futuro.

Se estima que se conoce entre el 1-5 % de los microorganismos que se hallan actualmente en la naturaleza, pues existen lugares que aún no han sido investigados, muchas plantas que aún no han sido analizadas, además, esto se potencializa debido a que muchas de las bacterias no son cultivables. Por lo tanto, se deben de buscar nuevos grupos de rizobia en plantas que están establecidas en sitios sin explorar y desarrollar nuevos métodos que permitan tanto estudiar la diversidad y las relaciones entre los microorganismos, así como, nuevas formas y condiciones de cultivo de los mismos. De tal manera que, el

estatus taxonómico de estos organismos sea revisado en un futuro y clarificado.

México es centro de origen del frijol *Phaseolus vulgaris*, y muchas otras leguminosas, de las cuales se han aislado bacterias que muestran la enorme diversidad genética, que suponen nuevas especies de *Rhizobium* nativas de México [37].

Los métodos de Biología Molecular han contribuido a elucidar con más detalle el estatus taxonómico de estos organismos. Entre los muchos métodos utilizados dentro de la Biología Molecular para el estudio de la diversidad y de las relaciones entre los organismos están los estudios de electroforesis de enzimas metabólicas, secuenciación, los ribotipos o patrones de digestión de genes ribosomales 16 o 23S, electroforesis, uso de sondas específicas e hibridaciones, análisis de los patrones formados en geles de agarosa por los fragmentos del DNA total de las bacterias utilizando enzimas de restricción, estudios comparativos de patrones de proteínas visualizados en geles de poliacrilamida; o bien, la visualización de plásmidos de menor tamaño o megaplásmidos en geles de agarosa, tomando en cuenta que mucha de la información genética de las bacterias se encuentra repartida en estos elementos genéticos extracromosomales.

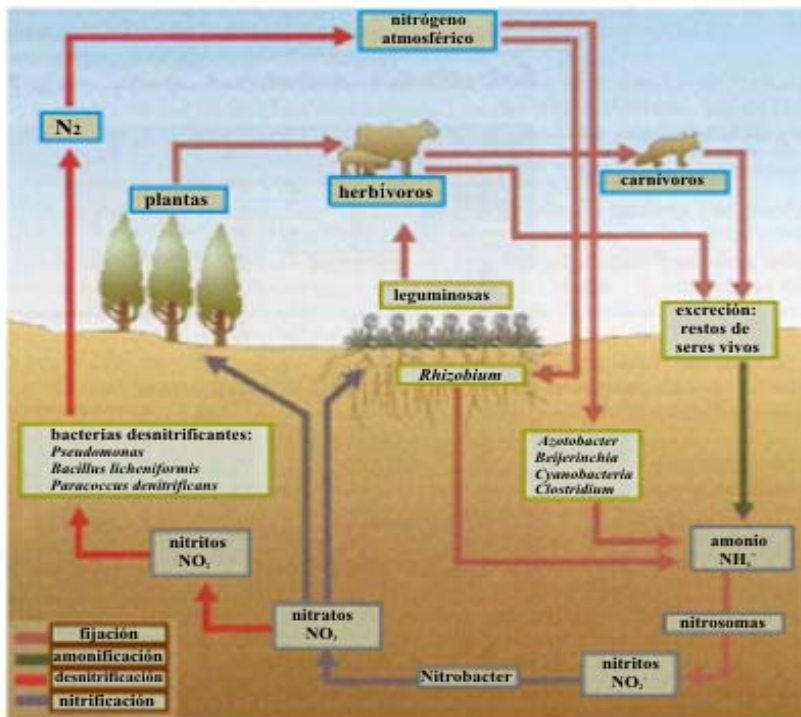
0.2.4. El nitrógeno y su importancia

Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno está ampliamente distribuido en la naturaleza en forma sólida, acuosa y gaseosa. Su concentración en rocas y minerales es demasiado pequeña en comparación con el que se encuentra en la litósfera. El nitrógeno gaseoso (N_2) es el principal componente de la atmósfera terrestre, representando alrededor de un 78% del total de los gases atmosféricos. La atmósfera es el principal reservorio de este elemento, con potencial para ser utilizado por los organismos vivos, debido a que el N_2 es desde un punto de vista termodinámico el tipo más estable del nitrógeno.

La vida, como nosotros la conocemos, no podría desarrollarse en la Tierra sin la fijación de nitrógeno, que es el proceso que permite pasar de una forma no utilizable del nitrógeno (para la mayoría de los organismos) a una utilizable. La concentración del nitrógeno fijado comprende un porcentaje pequeño del nitrógeno presente en la Tierra y en la atmósfera. Las formas fijadas de nitrógeno en todas las plantas y los animales vivos constituyen menos del 0.00001%, un porcentaje similar existe en la materia orgánica muerta, y aproximadamente el 0.00006% está en los océanos.

El ciclo del nitrógeno es probablemente uno de los más complicados, ya que el N_2 se encuentra en varias formas, donde los organismos son los responsables de estas conversiones. El ciclo del nitrógeno permite poner en circulación las diferentes formas del N, desde el N_2 atmosférico inerte, hasta el fijado, que puede ser utilizado por las plantas directamente. en la siguiente figura se muestra un diagrama esquemático del ciclo del nitrógeno.



El triple enlace que une ambos átomos de nitrógeno necesita de una gran cantidad de energía para romperse, y sólo unos cuantos microorganismos pueden utilizarlo de forma directa recurriendo a una reacción química denominada de fijación del nitrógeno. También las radiaciones cósmicas y la energía que producen los rayos en la atmósfera intervienen en este proceso en menor medida, combinando el

nitrógeno y oxígeno, que una vez transformado es enviado a la superficie terrestre por las precipitaciones.

En este proceso se reduce el nitrógeno (N_2) a amoníaco (NH_3), el cuál será empleado posteriormente para elaborar compuestos orgánicos. Esta reacción es catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, que está compuesto por dos enzimas: la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa reductasa se encarga de transferir electrones a la dinitrogenasa, que unida a un cofactor de hierro y molibdeno reduce el N_2 mediante una serie de reacciones. Para que esta reducción tenga lugar es necesaria la ausencia de O_2 , incluso en organismos aerobios, pues este gas inactiva la nitrogenasa.

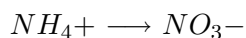
Asimilación: Una vez fijado el nitrógeno en forma de amoníaco (NH_3), los microorganismos lo usan para elaborar aminoácidos primordiales, sobre todo glutamato y alanina. En condiciones de bajas concentraciones de NH_3 se sintetiza glutamina y a partir de ésta glutamato. A través de la cadena alimenticia el nitrógeno irá llegando a todos los seres vivos.

Amonificación: los diversos procesos catabólicos dentro de los seres vivos y la descomposición de biomasa llevada a cabo por diversos microorganismos irán descomponiendo las biomoléculas hasta dejar de nuevo libre el nitrógeno en el medio en forma de amoníaco. Este proceso se conoce de forma general como amonificación.

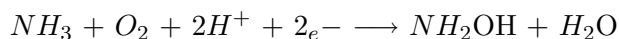
Diversas reacciones corporales, mayormente la descomposición de aminoácidos y de bases nitrogenadas, producen la liberación de moléculas de amoníaco. Éste es un compuesto muy tóxico para la gran mayoría de los organismos, que o bien lo excretan directamente o lo usan para sintetizar otros compuestos menos tóxicos como urea o ácido úrico, que son los que más tarde serán excretados.

La urea al descomponerse da lugar a dos moléculas de NH_3 y una de CO_2 , las cuales son liberadas al medio en forma de amoníaco o amonio.

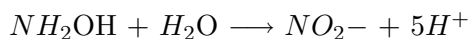
Nitrificación: El amoníaco libre en el medio puede ser usado por muchos microorganismos y plantas como fuente de nitrógeno. En medios alcalinos se puede liberar a la atmósfera en forma de amoníaco gaseoso. Otra gran parte del amoníaco sufre un proceso de nitrificación. La nitrificación es un proceso llevado a cabo por microorganismos aerobios quimiolitioautótrofos, en el que el amoníaco se oxida a iones nitrato:



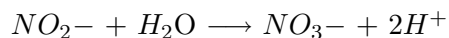
Hay un primer grupo de bacterias que oxidan el amoníaco a hidroxilamina:



Posteriormente, la hidroxilamina se oxida a nitrito:



Otro grupo de bacterias se encarga ahora de oxidar los nitritos a nitratos usando la nitrito oxidoreductasa:

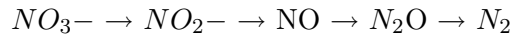


La cantidad de energía que obtienen estas bacterias a partir de estos procesos es

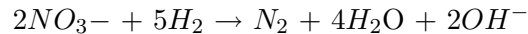
bastante baja, de ahí que sean especies con crecimiento lento.

Desnitrificación: Una gran cantidad de organismos pueden usar el nitrato producido por el proceso anteriormente descrito como fuente de nitrógeno. Muchas bacterias pueden usarlo también en la respiración anaerobia de la materia orgánica y como fuente de oxígeno, en un proceso de reducción del nitrógeno que finaliza con la liberación a la atmósfera de N_2 (o menos común, de NO o N_2O), durante el proceso conocido como desnitrificación.

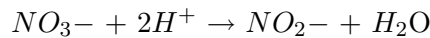
La enzima que inicia estas reacciones es la nitrato reductasa que se ve inhibida en presencia de O_2 . Esta enzima reduce el nitrato a nitrito. Luego el nitrito continúa un proceso de reducción que lo transforma en óxido nítrico (nitrito reductasa), óxido nitroso (óxido nítrico reductasa) y finalmente a gas nitrógeno (óxido nitroso reductasa):



Otras bacterias autótrofas usan el mismo nitrato como fuente de energía, usando la acumulada en los enlaces N-O, pero sin aprovechar el oxígeno que se libera. La reacción en este caso es:



Y así, con el retorno al nitrógeno gaseoso, se cierra el ciclo del nitrógeno. Las verdaderas bacterias desnitrificantes realizan todo este proceso. Sin embargo, muchas bacterias anaerobias facultativas (enterobacterias sobre todo) poseen únicamente la nitrato reductasa y sólo son capaces de realizar la reacción:



Por lo tanto, diversos microorganismos pueden asimilar el nitrógeno atmosférico y lo transforman. Este nitrógeno puede ahora pasar a individuos superiores a través de relaciones de simbiosis (como las que se dan entre *Rhizobium* y las leguminosas) o directamente a través de la cadena alimentaria. Las bacterias en asociación simbiótica con plantas leguminosas pueden fijar entre 5-9 veces más nitrógeno gaseoso por hectárea, en comparación con las bacterias de vida libre. Cuando las bacterias fijadoras mueren, sus células son atacadas por otras bacterias, los aminoácidos son metabolizados hasta amoníaco, que a su vez es transformado por bacterias en nitritos y nitratos.

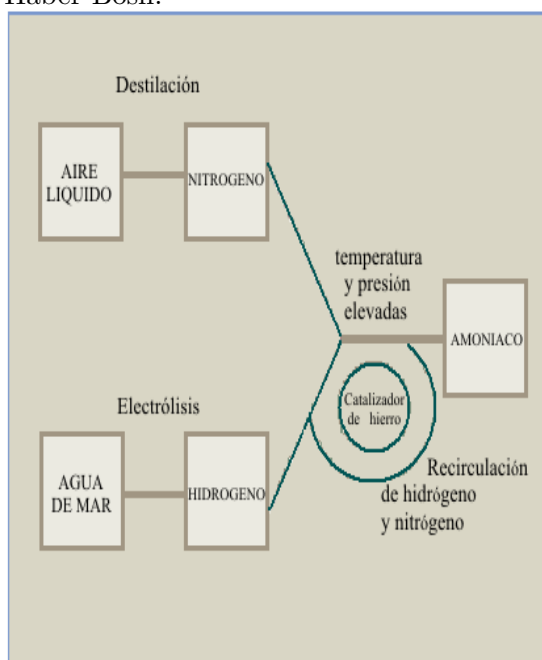
Además, podemos encontrar, por ejemplo, muy diversos tipos de cianobacterias, tanto de agua dulce como marinas. Muchas de éstas presentan en sus colonias algunas células especiales llamadas heterocistes, con un citoplasma anaerobio que contiene el complejo enzimático de la nitrogenasa. Por ejemplo, *Anabaena azollae*, que vive en simbiosis con diversos helechos acuáticos flotantes del género *Azolla* (Fam. Salviniaceae), a los que proporciona el nitrógeno en forma de NH_3 .

Importancia del nitrógeno

Los humanos influyen en el ciclo del nitrógeno y pueden sobrecargarlo. Esto puede ser observado en los cultivos intensivos (que obligan a añadir fertilizantes nitrogenados para fertilizar las tierras y la tala de árboles, que hacen descender el contenido de nitrógeno de los suelos.

El contrapunto a esta carestía de nitrógeno por exceso de cultivo se encuentra en las tierras que han sido demasiado fertilizadas; la lixiviación del nitrógeno de estas tierras añade un extra indeseable a los ecosistemas acuáticos cuando es arrastrado por las aguas fluviales. Este exceso de nitrógeno se agrava con la emisión a la atmósfera del dióxido de nitrógeno de las centrales térmicas y los automóviles; una vez descompuesto en la atmósfera es capaz de reaccionar con otros productos contaminantes, generando el conocido smog fotoquímico, que puede observarse sobre el cielo de muchas grandes ciudades con problemas de contaminación ambiental.

La fijación de la molécula de nitrógeno se lleva a cabo por varios procesos naturales entre los que están los sistemas biológicos y los no biológicos. Ejemplos de estos últimos pueden ser los rayos, la combustión y el vulcanismo; además hay procesos artificiales, como por ejemplo la producción industrial del amoníaco. Los procesos biológicos producen el 65 % de la fijación anual total, y los procesos industriales como el sistema Haber-Bosch el 25 %, pero esta proporción está cambiando, ya que año con año se producen más fertilizantes químicos. En la siguiente figura se esquematiza el proceso industrial Haber-Bosch.



Proceso Haber-Bosch: Durante el proceso se combina nitrógeno del aire e hidrógeno a temperatura (500-600°C) y presión elevadas, para formar el amoníaco. Se usa hierro como catalizador. Sólo una parte pequeña del nitrógeno y del hidrógeno reaccionan, por lo que estos gases se recirculan continuamente a lo largo de todo el proceso. Después el amoníaco se oxida a ácido nítrico, que al combinarse de nuevo con amoníaco, rinde nitrato de amonio, que se utiliza como explosivo o fertilizante. La producción de cianamida es otro proceso industrial de fijación de nitrógeno y se realiza pasando nitrógeno atmosférico sobre carburo de calcio caliente en presencia de un catalizador. La cianamida se emplea como fertilizante y para elaborar cianuro.

Existen varios procesos que promueven la remoción del nitrógeno en el suelo, contribuyendo, de esta manera, con el balance del nitrógeno. Entre los más significativos están la desnitrificación, la erosión, la volatilización y la lixiviación, los cuales, pueden tener diferentes grados de importancia, dependiendo del lugar en la Tierra. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que las alteraciones en los ecosistemas son las principales

causas de la pérdida de nitrógeno. Las áreas perturbadas ecológicamente y las áreas cultivadas son las que requieren de un mayor aporte de nitrógeno fijado. El cultivo intensivo del suelo conduce a pérdidas importantes de nitrógeno en los agrosistemas, con el consiguiente descenso de la productividad, así como una mayor aceleración de la descomposición de la materia orgánica, incrementándose, por lo tanto, la erosión del suelo producida por factores atmosféricos. Se supone que un porcentaje considerable de la pérdida de nitrógeno en los agrosistemas es causado por la lixiviación, por la ineficiente utilización del fertilizante por las plantas y por los organismos desnitrificantes.

Después de la evolución de la diazotrofia, el nitrógeno fijado dejó de ser uno de los compuestos limitantes en el balance de los ecosistemas. Así, otros nutrientes y presiones ambientales (incendios, vulcanismo, sequías, inundaciones, altas y bajas temperaturas) comienzan a ser determinantes en la productividad. Sin embargo, cuando los sistemas son perturbados, los nutrientes, incluyendo el nitrógeno, recirculan tal que, el nitrógeno fijado comienza a ser también un limitante. El resultado es que la productividad de la agricultura global comienza a determinarse por la disponibilidad de éste. Además, los animales incluyendo al humano, son muy ineficientes en el uso del nitrógeno fijado. A lo largo de los últimos siglos, la perturbación más persistente del ambiente natural ha sido determinada por la agricultura y la ganadería. A escala global, la productividad mundial de la industria agrícola esta determinada por la entrada de nitrógeno fijado en los suelos agrícolas y en los bosques cultivados.

La densidad poblacional ha experimentado un ascenso asombroso, esta explosión poblacional ha estado respaldada en los últimos tiempos por una combinación de procesos Haber-Bosch para la producción de amonio para fertilizar y por la Revolución Verde. Ambos con altos costos ambientales, por ejemplo, la contaminación superficial y de aguas subterráneas, y como resultado de esto, la eutroficación de ríos y lagos, producción de óxidos de nitrógeno, volatilización del amonio, y entre los más importantes, el consumo de energéticos no renovables. La entrada neta de fertilizante industrial nitrogenado mantiene aproximadamente una tercera parte de la población mundial. Si sigue incrementándose la población al mismo ritmo (asumiéndose que no intervenga una catástrofe global), se debería al menos de incrementar la entrada de nitrógeno en los suelos.

Las consideraciones para conseguir la entrada de nitrógeno en los suelos son muchas y muy importantes y, por lo tanto, no deben de dejarse pasar por alto. Lo que es claro es que se deben de buscar las formas más adecuadas para el aporte del nitrógeno y explotarlas. Tales consideraciones dan énfasis a la importancia práctica de los esfuerzos que se están realizando ahora en el estudio de la fijación de nitrógeno.

Los sistemas actuales de producción agrícola dependen mucho de la adición de fertilizantes nitrogenados, del nitrógeno orgánico (abonos animales) o de una eficiente simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. La fijación biológica de nitrógeno mediante una eficiente asociación *Rhizobium*-leguminosa, puede sustituir el uso de fertilizantes químicos en la agricultura, que demandan energéticos, y prevenir la pérdida de fertilidad del suelo. Este proceso también permite a leguminosas como el frijol poder colonizar los suelos pobres en nitrógeno sin necesidad de abusar de fertilizantes nitrogenados de origen industrial [2]. Este es un proceso limpio, ya que el nitrógeno fijado durante esta asociación es usado eficientemente por las plantas sin necesidad de que contamine o altere el medio ambiente, causando eutroficación en los depósitos de agua.

Existe un gran interés en la investigación de bacterias fijadoras de nitrógeno para poder utilizarlas en la agricultura y, gracias a sus propiedades particulares ayudar a promover la producción agrícola y la sustentabilidad de la misma. En cuanto a sistemas basados en propiedades biológicas, la simbiosis con leguminosas puede ser una de las mejores opciones que ofrece un incremento en la concentración de nitrógeno fijado. Otros sistemas que se han estado desarrollando incluyen: sistemas de abono verde como helechos acuáticos, *Azolla*, leguminosas semiacuáticas, *Sesbania*, *Aeschynomene*, y sus microsimbiontes, que proporcionan cantidades moderadas o altas de nitrógeno fijado.

Las interacciones endosimbióticas entre las raíces de las plantas y microorganismos, tal como la simbiosis que se da en los nódulos de raíz de leguminosas contribuyen a la nutrición de la planta y fijación de N_2 a una escala significativa.

Aproximadamente existen unos 50 loci que participan en la simbiosis y son indispensables para la formación y buen funcionamiento de un nódulo radicular. La clonación de estos genes facilita su secuenciación, y con el genoma secuenciado de ambos simbiontes, se puede tener una mejor comprensión de las bases biológicas de la simbiosis a nivel molecular [19].

0.3. Antecedentes

0.3.1. *Rhizobium* como inoculante de plantas de interés agrícola

Un poco de historia

El valor de las leguminosas en el mejoramiento y mantenimiento de la fertilidad del suelo es bien conocido por los agricultores desde hace mucho tiempo. Pero es sólo con el trabajo de Lawes y Gilbert en 1981 donde muestran que las leguminosas tienen la habilidad inherente para adicionar nitrógeno al suelo. En 1888, Hellriegel y Wilfarth demostraron que el nitrógeno “ganado” en los chícharos (*Pisum sativum*) tiene lugar solamente en la presencia de microorganismos del suelo y que los nódulos radicales de las leguminosas son necesarios para este proceso. Finalmente, en ese mismo año, Beijerinck aísla las bacterias fijadoras de nitrógeno de los nódulos de la raíz.

La asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios es de hecho el más importante contribuyente de todo el mundo para proporcionar N_2 fijado para la agricultura. Los investigadores aceptan el término “simbiosis efectiva” para describir la habilidad de formarse nódulos que fijen nitrógeno en las leguminosas, y ésta puede ser expresada cualitativamente (alta, moderada o intermedia e inefectiva) o cuantitativamente (total de nitrógeno en la planta, tamaño o peso seco de los nódulos, entre otros). La cuantificación de la eficiencia simbiótica es medida en comparación con la observada con cepas de rizobia estándar, con referencia a la leguminosa con la que se asocia, o en comparación con leguminosas no inoculadas. El proceso de fijación simbiótica de nitrógeno y su potencial para incrementar la producción de proteína inoculando leguminosas es uno de los medios que prometen mejorar la nutrición de países en desarrollo.

Hace más de 100 años se comenzaron a utilizar los inoculantes bacterianos, con el fin de que los cultivos de soya formaran nódulos fijadores de nitrógeno. La procedencia de las bacterias para usarse como inoculantes era de Asia, de donde la soya es nativa y donde existe una gran diversidad de bacterias con especificidad para soya. En Brasil se introdujeron los inoculantes para la soya hace 75 años, y en México hace 45 años. La respuesta a la inoculación con *Rhizobium* o *Bradyrhizobium* es muy buena cuando no existen bacterias específicas para la planta capaces de nodularla en los sitios donde se aplica el inoculante; tal es el caso de México y Estados Unidos donde no hay cepas nativas que nodulan soya. Los resultados de la inoculación son variables y poco exitosos cuando en los campos agrícolas ya existen rizobios nativos capaces de nodular a esas plantas. La inoculación es más efectiva cuando una nueva leguminosa es introducida especialmente en áreas donde no hay especies indígenas que forman parte del mismo grupo de inoculación cruzada. Esencialmente, un grupo de inoculación cruzada consiste en una colección de especies de leguminosas, que pueden desarrollar nódulos efectivos cuando se inoculan con los rizobios obtenidos de los nódulos de cualquier otro miembro del grupo de las leguminosas. La inoculación es, además, recomendada si el campo que se va a inocular no ha sido cultivado con leguminosas en 3-4 años anteriores.

En México, donde existen poblaciones naturales muy diversas capaces de nodular frijol, ya que éste es nativo de México, los ensayos de inoculación de esta planta han sido poco exitosos y se observa que las cepas nativas tienen una mayor capacidad competitiva para formar nódulos que las cepas de los inoculantes. Cuando la ocupación de nódulos

se ha cuantificado, se ha encontrado que sólo alrededor de un 5-20 % de los nódulos los forman las bacterias introducidas como inoculante. La falta de competitividad de los inoculantes frente a las cepas nativas ha llevado a proponer estrategias alternativas para contar con cepas más competitivas como inoculantes. El interés de inocular plantas cuando existen bacterias nativas en el suelo, es incrementar el aporte de fijación de nitrógeno con bacterias con alta capacidad para fijar nitrógeno. Para frijol, se han identificado cepas con esta capacidad pero son poco competitivas frente a cepas nativas en experimentos de inoculación [?].

Se ha propuesto que las cepas nativas, exitosas en un sitio agrícola, pudieran ser empleadas para mejorar su capacidad de fijación de nitrógeno y por lo tanto, ser utilizadas exitosamente como inoculantes de aplicación local. No existen ejemplos de que esto haya ocurrido.

Se ha realizado investigación para mejorar la capacidad competitiva o para entender las bases genéticas de la competencia de *Rhizobium*. Se encontró que cepas transconjugantes de *R. etli* que adquirieron un plásmido de *R. tropici* se volvieron más competitivas, pero sólo transitoriamente. Mutantes en genes de especificidad de nodulación o en genes que afectan el proceso de nodulación pierden su capacidad competitiva. Por otro lado, las cepas con una mayor capacidad para nodular pudieran tener una mayor capacidad competitiva.

Los beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno por las leguminosas pueden ser apreciados solamente cuando la mayor parte de los cultivos, en un lugar, muestran respuestas a la inoculación, que se expresa en un incremento en la producción de los campos experimentales y los cultivados por agricultores.

Competencia por la nodulación entre diferentes cepas de *Rhizobium*

Cuando muchas cepas de *Rhizobium* están en presencia de una leguminosa hospedera, para las que ellas son específicas, ciertas cepas forman nódulos preferentemente en relación a las demás. Las cepas de *Rhizobium* difieren unas de las otras en su habilidad para ser seleccionadas por la planta hospedera, esto es, en su capacidad competitiva. El número de nódulos formados por cada una de las cepas presentes depende no solo de la capacidad competitiva de ellas, sino también de su número. En estudios de competencia se ha observado que al incrementar la proporción de una cepa en una mezcla inoculada, el número de nódulos formados por esta cepa se incrementa, aunque no es una relación directamente proporcional.

Como ya se mencionó, cuando se inoculan las leguminosas, es frecuente que existan en el suelo poblaciones nativas de rizobios, que compitan con las cepas de los inoculantes para la formación de los nódulos. Para que las cepas de los inoculantes prosperen con éxito, es preciso inocular con cepas efectivas y competitivas frente a las del suelo. La inoculación con cepas efectivas y mejoradas en suelos con bajo contenido de nitrógeno, incrementaría los rendimientos del cultivo de plantas leguminosas, si pudieran desplazar en la nodulación a las poblaciones nativas del suelo, que normalmente son muy competitivas y en ocasiones se presentan en altas concentraciones, dependiendo de las condiciones ambientales. Inóculos preparados con cepas muy efectivas en la fijación de nitrógeno se ha visto que son incapaces de formar una proporción significativa de nódulos en condi-

ciones de campo debido a la presencia de las cepas autóctonas. En México y en otros países de centro y Sudamérica donde existe una diversidad enorme de cepas simbiotes capaces de nodular frijol (*Phaseolus vulgaris*), puesto que es nativo de esta área [11], esto es de trascendental importancia.

La competitividad y la persistencia son dos características importantes que deben de tener los inoculantes. La persistencia se define como la capacidad de que las cepas inoculadas se multipliquen y sobrevivan en el medio por largo tiempo. Por otra parte, la competencia es definida como la habilidad de las cepas para colonizar el suelo y sobrevivir frente a otros microorganismos. Para poder predecir la permanencia de una cepa con relación a otra, lo que se ha hecho es tratar de conocer la relación cuantitativa entre la proporción de la cepa en el inóculo y la proporción de los nódulos formados. La competitividad y la persistencia son dos características diferentes y, aunque están muy relacionadas, ambas propiedades pueden ir disociadas. Las cepas más competitivas suelen tener más posibilidades de persistencia; y viceversa, las que persisten mejor, al menos desde un punto de vista cuantitativo, podrían tener una mayor ventaja competitiva.

Desde un punto de vista agrícola, la competitividad es, en general, una propiedad deseable. Cuando se inocula un cultivo, lo que se pretende es que las cepas introducidas, sean más competitivas frente a las nativas, es decir, que produzcan una mayor cantidad de nódulos. Sin embargo, la persistencia en el suelo de las bacterias introducidas sólo puede ser relevante en algunos casos. En cultivos permanentes, la inoculación se realiza en el momento de la plantación, y lo deseable es que las cepas inoculadas persistan en el suelo, para cuando germinen las siguientes generaciones puedan nodular. En los cultivos anuales, como muchas leguminosas, la inoculación se puede realizar cada temporada, al momento de sembrar, y la persistencia no es imprescindible, incluso puede ser un problema, pues si en determinado momento se obtiene una cepa que proporcionara mejores beneficios para los cultivos, tendrían que competir con las nativas y con las introducidas anteriormente.

Son muchos los factores (ambientales, propios de la leguminosa hospedera, e intrínsecos a las poblaciones de rizobia) que influyen en la competitividad de las cepas de *Rhizobium*, por la nodulación. Los procesos de infección y de nodulación comprenden muchas etapas de gran complejidad, y prácticamente cualquier etapa que se vea modificada, en mayor o menor grado, se traducirá en cambios de la habilidad competitiva.

Factores que afectan la competitividad

El estudio de los factores que influyen en la competitividad de las cepas de *Rhizobium* es de gran complejidad. La formación de los nódulos es un proceso que comprende numerosas etapas y cualquiera que se vea afectada, en mayor o menor grado, se traducirá en cambios de la competitividad. A medida que se vaya conociendo más sobre la ecología de *Rhizobium* en el suelo, en la rizósfera y la fisiología de la nodulación, se podrá saber más sobre los factores que determinan la competitividad.

La competencia por la nodulación se puede, de manera general, dividir en dos etapas: En la primera las bacterias compiten para colonizar el suelo y la rizosfera; y en la segunda, la competencia que se da por la infección de la raíz y la formación de nódulos. En la primera etapa, tienen más influencia los factores ambientales-edáficos, y en la segunda,

tienen más influencia las características intrínsecas de *Rhizobium* y la planta. En el cuadro número 4 se describen los factores considerados como los más determinantes en la competitividad mostrada por las cepas de *Rhizobium*.

Cuadro 4: Factores más importantes que determinan la competitividad.

I. Suelo	Abióticos: temperatura, pH, humedad, salinidad Biológicos: bacterias, protistas, bacteriófagos, actinomicetos, otras plantas
II. Bacteria	Tamaño de las poblaciones de rizobios Producción de bacteriocinas Movilidad y quimiotaxis Afinidad por los lugares de infección Velocidad de infección y formación de nódulos Otras características
III. Planta	Especies y cultivares que nodulan preferentemente con algunas estirpes

El pH del suelo es un factor importante, ya que muchas leguminosas crecen en suelos alcalinos, y otras, pueden crecer bien en suelos con un pH de 5.6-6.8. Para los rizobios el pH es variable (5.8-7.2) dependiendo de la especie. Generalmente las rizobias tropicales sobreviven bien en suelos con pH entre 5.8-6.8.

Por otra parte, los microorganismos del suelo, aparte de las poblaciones nativas de rizobia, ejercen una gran influencia sobre la colonización de la rizósfera y la nodulación de las cepas inoculadas. Un estudio hecho en plantas de frijol por Chao W.L. (1981), muestra que no hubo algún efecto inhibitorio sobre *R. phaseoli* debido a la presencia de bacterias líticas, microorganismos productores de antibióticos, bacteriófagos, ni *Bdellovibrio*, en las condiciones que ellos manejaron. No obstante, la colonización del suelo por *R. phaseoli* se vió limitada por el aumento de protozoos. Controlando las poblaciones de protozoos, se logro aumentar las poblaciones de rizobias en la rizósfera de las plantas[31].

Dentro de los factores intrínsecos de *Rhizobium*, que son importantes para determinar la competitividad, está en primer lugar, el tamaño de las poblaciones nativas de rizobios en el suelo. En los suelos, las poblaciones de rizobios pueden llegar a alcanzar hasta 10^6 de bacterias por gramo de suelo, en estas condiciones es muy difícil la introducción exitosa de otras bacterias. Aumentando la dosis del inóculo, probablemente se puede desplazar a las poblaciones naturales, pero existe un límite práctico para ello. No obstante, con la inoculación sucesiva a lo largo de varios años o, el empleo de inoculantes líquidos y granulares aplicados directamente al suelo, se podría incrementar la nodulación de las cepas introducidas[31].

En la familia de las Rhizobiaceas es frecuente encontrar especies productoras y resistentes a bacteriocinas. Se han descrito diversos tipos de bacteriocinas con base a su peso molecular y propiedades químicas. Las cepas de *Rhizobium* que producen antibióticos tipo bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de otras cepas, son capaces de competir y desplazar a otras cepas. Los genes para la producción de una de estas bacteriocinas llamada trifolitoxina, se han clonado y se han introducido a otras cepas que no producen el

antibiótico, consiguiendo que las cepas receptoras produzcan la bacteriocina. En el caso en que estos genes se introdujeron a una cepa de *R. etli*, ésta se volvió más competitiva, pero no se probó en suelos con una gran diversidad de rizobias capaces de nodular frijol. La capacidad de sintetizar estas bacteriocinas pudiera conferirles una mayor capacidad competitiva. El uso de bacteriocinas puede llevar a la generación de cepas resistentes como ha ocurrido con el uso de antibióticos en casos clínicos de humanos y animales.

Puesto que la mayoría de las especies de *Rhizobium* poseen flagelos que les ayudan a moverse hacia las sustancias atractantes de distinta naturaleza química, es probable que la movilidad pueda ser un factor implicado en la competitividad entre las diferentes especies de *Rhizobium*, ya que facilita la colonización de la rizósfera. La quimiotaxis positiva y negativa hacia exudados radiculares, tanto de plantas leguminosas como de no leguminosas, varía según la especie de *Rhizobium*[31].

Otra posible ventaja competitiva podría ser la síntesis y actividad de determinadas enzimas hidrolíticas. Además, el buen funcionamiento y eficiencia de los genes implicados en el proceso de infección y nodulación son obviamente trascendentales.

Caba et al. (2001), señalan que el desarrollo y funcionamiento de los nódulos radiculares de las leguminosas están regulados principalmente por la planta, la cual excluye a determinados microsimbiontes, bloqueando alguna etapa del proceso de colonización y de nodulación; además de controlar el número de nódulos mediante un mecanismo endógeno de autorregulación. Básicamente consiste en que iniciado un número crítico de primordios nodulares se bloquea la división celular en el córtex radical inhibiéndose el desarrollo de nuevos nódulos. Una vez formado el hilo de infección, se induce en la planta una señal que evita la formación de un número excesivo de nódulos.

Las especies de *Rhizobium* pueden diferir en el tiempo que emplean en la formación de los nódulos desde los primeros estadios de la infección, de modo que las especies más rápidas en iniciar las infecciones tendrán una mayor capacidad competitiva. Así, la planta tiene un papel imperativo en la determinación de la capacidad competitiva de las diferentes especies de *Rhizobium*. De esta manera, no sólo la especie, sino el cultivar elegido, puede modificar sustancialmente esta característica[31].

En cierto sentido, es ventajoso el hecho de que la planta hospedera tenga una gran influencia en la expresión de la capacidad competitiva de *Rhizobium* ya que, la obtención de cultivares que limiten la nodulación de algunas cepas (normalmente poco efectivas pero muy competitivas) y que nodulen con las cepas de los inóculos, podría servir como una estrategia para incrementar los rendimientos agrícolas.

La nodulación también está controlada por factores externos entre los que el nitrato del suelo resulta de especial importancia. La inhibición de la nodulación por el nitrato no es un efecto nutricional como en un tiempo se pensó, sino que implica estadios tempranos en la ontogenia del nódulo de forma similar a la respuesta de autorregulación.

Montes (1999) señala que los fallos en la nodulación y fijación del cultivo de frijol se deben con cierta frecuencia al alto nivel de nitrógeno residual procedente de cultivos anteriores y a la fertilización mineral del suelo, lo que actúa inhibiendo la formación de los nódulos. La absorción de nitratos lleva aparejado un aumento del pH rizosférico que puede reducir la actividad de la nitrogenasa y la disponibilidad de algunos nutrientes como el fósforo, que a su vez, reducen la fijación de N_2 . También se reduce la absorción y transporte de nitratos desde las raíces a la parte aérea de la planta.

En plantas bien noduladas (en presencia de 1mM de NO_3) el principal aminoácido exportado por el xilema es la glutamina, y en menor cuantía aspartato y asparagina. El aumento del P incrementó de modo notable la concentración de glutamina, que junto con los ureidos, constituyen las principales formas de nitrógeno orgánico transportadas en una fijación simbiótica activa de N_2 . En plantas escasamente noduladas (en presencia de 10mM de NO_3), el aumento del P incrementó la concentración de asparagina en savia del xilema, al tiempo que se redujo la concentración de NO_3 . Además, las altas concentraciones de Al y Mn (encontrados en muchos suelos tropicales con un pH de 4.5 o más bajo) afectan la nodulación y la fijación. Suelos deficientes en Mo producen leguminosas con pocos nódulos inefectivos[5].

En los nódulos radicales de diversas leguminosas se pueden detectar cuatro tipos de hormonas vegetales (auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido absísico), todas ellas a concentraciones superiores a las existentes en las raíces vecinas. Los rizobios producen auxinas, citoquininas y giberelinas, aunque no se conoce la medida en la que éstas contribuyen al balance hormonal del nódulo; y por otra parte, no parece que el papel de algunas de estas hormonas en la nodulación sea muy significativo, ya que, mutaciones en la producción de auxinas, por ejemplo, no afectan la nodulación. Aunque, suministradas exógenamente, las fitohormonas pueden inhibir la formación de los nódulos, por lo que podría suponerse un probable papel inhibitor en la autorregulación de la nodulación. Otra evidencia en favor de la implicación de las fitohormonas en la organogénesis de los nódulos es el hecho de que determinadas fitohormonas, inducen la formación de estructuras parecidas a nódulos (nódulos vacíos o pseudonódulos). Inhibidores de auxinas, como el ácido naftil-ftalámico (NPA), inducen la formación de pseudonódulos en diferentes leguminosas, en ausencia de bacterias, y los cuales, expresan diferentes nodulinas tempranas, ENOD2, ENOD12, ENOD40, etc.[5].

Arcocha et al. (1994) señalan que la respuesta del cultivo del frijol a la inoculación con cepas comerciales de *Rhizobium* ha sido inconsistente, por lo cual se hace necesaria la evaluación de nuevas cepas, además de evaluar el efecto de la fertilización inorgánica con fósforo sobre éstas [5].

Según Aranda et al., (2000), la selección de cepas bacterianas con efecto aditivo se encuentra entre las tendencias actuales de la biotecnología agrícola. En respuesta a las bajas concentraciones de ión férrico en el medio, muchos microorganismos producen y secretan sideróforos. Éstos son metabolitos secundarios que aparecen en la fase estacionaria del crecimiento. Los sideróforos suprimen enfermedades fungosas por acoplamiento del hierro, convirtiéndose en factor limitante para el crecimiento del patógeno [5].

Para poder disfrutar de los beneficios que ofrece esta asociación, los rizobios introducidos no sólo deben de exhibir la capacidad de poder multiplicarse y colonizar la rizósfera de manera efectiva, sino además, tener la capacidad de poder competir por los sitios de infección ubicados en las raíces de las leguminosas. De esta manera, el potencial para una versatilidad fisiológica es un importante rasgo que contribuye a la adaptación de estas bacterias y a un incremento en la competitividad.

De todo lo expuesto anteriormente, se desprende la idea de que es muy importante tomar en cuenta, durante la selección de diferentes cepas de *Rhizobium* destinadas a la preparación de inoculantes comerciales la capacidad competitiva ante diferentes condiciones ambientales.

Siguiendo con este mismo razonamiento, lo que se pretende en el siguiente trabajo es evaluar la capacidad competitiva de diferentes cepas mutantes de *Rhizobium etli* en suelos de Cuernavaca, Mor. México. Éste país que se caracteriza por tener suelos con alta diversidad de bacterias indígenas noduladoras de frijol, y que pudieran estar ejerciendo una gran presión de selección hacia las bacterias introducidas en forma de inoculantes.

El siguiente trabajo está constituido de dos partes. La primera consta de llevar a cabo dos experimentos de competencia entre 9 cepas diferentes de *Rhizobium etli* mutantes, construidas en el laboratorio del Dr. Jos Vanderleyden de la Universidad Católica de Leuven en Bélgica, con bacterias que se encuentran viviendo de manera natural en suelos de México (Cuernavaca), con el objetivo de valorar su capacidad competitiva y su viabilidad como inoculantes. La segunda parte consta de un experimento, en el laboratorio, de mutagénesis al azar con un minitransposón Tn5-Gus kanamicina resistente (Km^r) en cepas tipo de *Rhizobium*, para obtener una “librería” de bacterias mutantes, y así mismo, evaluar su habilidad competitiva, con el propósito de saber si la mutagénesis al azar por transposición es una técnica adecuada para la obtención de mutantes con un incremento en su habilidad competitiva.

0.4. Objetivos e hipótesis

0.4.1. Objetivos e hipótesis de la primera parte del trabajo. Experimentos de competencia.

Objetivo general:

Comparar la capacidad competitiva, en términos de nodulación, de diferentes cepas mutantes de *Rhizobium etli* *bv. phaseoli*, con bacterias nativas de suelos de Cuernavaca, Mor., que nodulan frijol; con la finalidad de evaluar su potencial como inoculantes en suelos con gran diversidad de bacterias nativas formadoras de nódulos.

Objetivos particulares:

- Observar durante 3 meses las diferencias de nodulación que se producen, dependiendo del tiempo, en las cepas de interés.
- Observar las diferencias de nodulación que se producen en las cepas de interés dependiendo de las dos variedades de frijol (BAT477 y Negro Jamapa) usadas.
- Expresar dichas diferencias en términos de porcentaje de nodulación, y traducirlas en términos de capacidad competitiva.
- Determinar cuantitativamente el rendimiento de las plantas de frijol inoculadas, en términos de peso seco, de las dos variedades estudiadas.
- Determinar cuantitativamente la capacidad de fijación de nitrógeno para cada una de las cepas mutantes probadas, en términos de reducción de acetileno.

Hipótesis:

- HO= Si existe, en la muestra de nódulos examinada un mayor porcentaje ocupado por las cepas mutantes, en comparación con los ocupados por las rizobias nativas, entonces, las cepas mutantes inoculadas tendrán una mayor capacidad competitiva en esas condiciones, y podrán ser candidatas para la fabricación de inoculantes.
- HA= Si existe un mayor porcentaje de nódulos ocupados por las rizobias nativas, entonces las cepas mutantes inoculadas tendrán una menor capacidad competitiva, y por lo tanto, no podrán ser usadas bajo esas circunstancias, en la fabricación de inoculantes.

0.4.2. Objetivos e hipótesis de la segunda parte del trabajo. Mutagénesis por transposición.

Objetivo general:

Crear “bancos de cepas mutantes” de *R. etli* CFN42, *R. etli* CNPAF512 y *R. tropici* CIAT899, con ayuda de un minitransposón Tn5-Gus *Km^r*, con la intención de obtener mutantes de estas cepas tipo, que hayan incrementado su capacidad competitiva como resultado de la integración de dicho elemento genético.

Objetivos particulares:

- Mutar las cepas tipo de *Rhizobium* por medio de transposición, y obtener por éste método un “banco” de mutantes.
- Seleccionar las cepas que pudieran haber incrementado su capacidad competitiva, como resultado del evento de transposición, siguiendo el mismo método de la primera parte de este trabajo: inoculando plantas de frijol sembradas en suelo no estéril y seleccionando los nódulos por su resistencia a antibióticos.
- Poner a competir una muestra de las cepas mutantes obtenidas con sus respectivas cepas parentales, para observar si realmente existe un incremento en la capacidad competitiva.

Hipótesis:

- HO= Si existe, en la muestra examinada, un mayor porcentaje de nódulos resistentes a los antibióticos ácido nalidíxico (Nal_{20}) y neomicina (Nm_{60}), las cepas mutantes habrán incrementado su capacidad competitiva como resultado de la transposición. De esta manera, la mutagénesis por transposición podría ser un método alternativo a usar para la obtención de bacterias con un incremento en su habilidad competitiva.
- HA= Si en la muestra examinada existe un mayor porcentaje de nódulos sensibles a Nal_{20} Nm_{60} , las cepas mutantes obtenidas por transposición no habrán incrementado su capacidad competitiva en comparación con sus cepas parentales. De esta manera, la idea de incrementar la habilidad competitiva por transposición deberá de ser revalorada.

0.5. Método

0.5.1. Experimentos de competencia

Primer experimento de competencia

Para llevar a cabo los experimentos de competencia, se tuvieron que seleccionar primero las semillas que se iban a utilizar, se esterilizaron y germinaron. Posteriormente, se sembraron en tierra no estéril (Ver apéndice III) colectada en Cuernavaca, Mor., México (Ver apéndice II).

Se prepararon los inoculantes con las cepas mutantes de *Rhizobium* a probar y se vertieron a las plántulas de frijol (Ver apéndice V). En este primer experimento se inocularon un total de 486 plántulas de frijol, para los tres meses que duró el experimento: 27 plántulas de frijol Negro Jamapa y 27 plántulas de frijol BAT477 para cada cepa, en total, 243 plántulas de frijol Negro Jamapa y 243 plántulas de frijol BAT477.

Número de cepas mutantes probadas= 9

Variedades de frijol usadas = 2

Tamaño de la muestra mensual = 9

Meses que duró el experimento = 3

$9 \times 2 \times 9 \times 3 = 486$ plántulas de frijol.

Unidad experimental= 3 plantas por maceta.

Cuadro 5: Diseño experimental al azar. Primer experimento.

Mes	FAJ4006	FAJ1329	BRH2	FAJ4010	BRH1	FAJ4007	CNPAF512	PL41H	PL43C
1	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477
2	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477
3	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477

Número y variedad de frijol utilizado en el primer experimento de competencia

Al mes de haber inoculado las plantas, se sacó un lote de 162 plántulas: 9 plántulas de frijol Negro Jamapa y 9 plántulas de frijol BAT477 para cada cepa.

Se obtuvo una muestra de nódulos, en este caso, 10 por planta (Ver apéndice IV). Los nódulos colectados se esterilizaron, y se plaquearon en cajas de Petri que contenían medio PY con antibiótico cicloheximida (*Ciclo*₁₀) para eliminar microorganismos contaminantes como son los hongos, debido a que las cepas de *Rhizobium etli* son resistentes a éste antibiótico. Las colonias que crecieron en las placas con *Ciclo*₁₀, se plaquearon (Ver apéndice IV y VI) en cajas con diferentes antibióticos: ácido nalidíxico y neomicina (*Nal*₂₀*Nm*₆₀) para las cepas FAJ4006, FAJ1329, BRH2, BRH1, FAJ4007, CNPAF512, PL41H y PL43C, y para la cepa FAJ4010, ácido nalidíxico y espectinomicina (*Nal*₂₀*Sp*₆₀).

Las colonias que crecieron en $Nal_{20}Nm_{60}$ y $Nal_{20}Sp_{60}$ fueron contadas, y los resultados fueron analizados.

Se procedió de la misma manera para las muestras que se sacaron a los dos y tres meses.

Segundo experimento de competencia

Como se esperaba (con base a los resultados del primer experimento) que existiera una alta probabilidad de que las cepas BRH2, BRH1, FAJ4007, CNPAF512, PL41H y PL43C no mostraran habilidad competitiva alguna en las condiciones en las que se estaban estudiando, se creyó pertinente reducir el número de la muestra en el segundo experimento, para considerar principalmente las tres cepas que mostraban mayor habilidad para nodular, las cuales eran la FAJ4006, FAJ1329 y FAJ4010. El experimento se realizó de la misma manera que el primero.

Las plántulas de frijol inoculadas fueron: 9 Negro Jamapa y 9 BAT477 por mes para las cepas más competitivas. Y para las demás cepas (BRH2, BRH1, FAJ4007, CNPAF512, PL41H y PL43C) el número se redujo a 3 plántulas Negro Jamapa y 3 BAT477 por mes.

Número de cepas mutantes probadas = 9

Variedades de frijol usadas = 2

Tamaño de la muestra mensual = 9 de cada variedad de frijol para las cepas más competitivas y 3 para las demás.

Meses que duró el experimento = 3

$3 \times 9 \times 3 \times 2 = 162$ plántulas de frijol sembradas para las 3 cepas más competitivas.

$6 \times 3 \times 3 \times 2 = 108$ plántulas de frijol sembradas para las demás.

Total = 270 plántulas usadas para el segundo experimento.

Cuadro 6: Diseño experimental. Segundo experimento.

Mes	FAJ4006	FAJ1329	BRH2	FAJ4010	BRH1	FAJ4007	CNPAF512	PL41H	PL43C
1	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477
2	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477
3	9 NJ y 9 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	9 NJ y 9 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477	3 NJ y 3 BAT477

Número de plantas y variedad empleada en el segundo experimento.

Al mes de haber inoculado las plantas se sacó el primer lote, que consistía en un total de 45 plántulas Negro Jamapa y 45 BAT477, y Se hicieron los estudios correspondientes. Lo mismo en el segundo y tercer mes.

Durante el segundo experimento se midieron algunos parámetros adicionales que se creyeron convenientes. Tal es el caso de la determinación del número de bacterias contenidas en el inóculo que se estaba adicionando a las macetas y la estimación del número de bacterias formadoras de nódulos presentes en el suelo que se estaba utilizando.

Cuando se preparó el inóculo para desarrollar el segundo experimento, se tomó una muestra para elaborar un experimento que nos permitiera hacer una estimación del número de bacterias efectivas formadoras de nódulos que estuvieran presentes en el inóculo, ya que, el número de bacterias inoculadas es un factor importante a tomar en cuenta, debido a que se ha visto que tiene una relación generalmente directa con su capacidad competitiva (Ver apéndice XII).

Así mismo, se hizo otro experimento para estimar el número de bacterias nativas formadoras de nódulos presentes en la tierra utilizada, y que estuvieran compitiendo con las cepas mutantes inoculadas(Ver apéndice XII).

0.5.2. Experimentos de mutagénesis por transposición.

En esta segunda parte del trabajo se creó un banco de cepas mutantes de *R. etli* CFN42, *R. etli* CNPAF512 y *R. tropici* CIAT899, empleando un minitransposón Tn5-Gus *Km^r* que estaba contenido en una cepa de *Escherichia coli*. Posteriormente, se determinó la habilidad competitiva de las mutantes en relación comparación con sus cepas parentales (las cepas a partir de las cuales se obtuvieron), y de esta manera, evaluar si la hipótesis de que la mutagénesis por transposición puede ser un método alterno para obtener cepas de *Rhizobium* con un incremento en su habilidad competitiva (apéndice XIV).

Para ello se realizaron cruzas biparentales entre la cepa de *E. coli* Tn5-Gus *Km^r*, y las cepas de *Rhizobium*, con la finalidad de que el minitransposón de *E. coli* fuera transferido a las cepas de *Rhizobium*. Al ser transferido dicho elemento genético, en principio se inserta en diferentes lugares del genoma de *Rhizobium*, y de esta manera, se obtienen células mutadas “aleatoriamente”, entre las cuales, se podrían encontrar algunas que, como producto de dicho evento, incrementaran su habilidad competitiva.

Las cepas de *Rhizobium* que adquirieron el minitransposón fueron seleccionadas utilizando el método de resistencia a antibióticos, ya que después del evento de transposición, las bacterias que adquirieron el transposón también adquirieron resistencia a kanamicina o neomicina, y las que no lo adquirieron serían sensibles. Una vez seleccionadas las cepas por su resistencia, se tomó una pequeña muestra al azar de ellas y se les probó su capacidad competitiva siguiendo el mismo método de la primera parte de este trabajo: inoculando plántulas de frijol en suelo no estéril, extrayendo los nódulos y seleccionándolos con antibióticos en cajas de Petri.

Para probar si las cepas habían realmente incrementado su capacidad competitiva, se pusieron a competir con sus respectivas cepas parentales (es decir, las cepas de *Rhizobium* a partir de las cuáles se obtuvieron las mutantes) en matraces con un sustrato estéril. Después de 18 días los nódulos resultantes de esta inoculación se recuperaron, esterilizaron, y los bacteroides fueron plateados en cajas de Petri con antibióticos. Como las cepas parentales no tenían el minitransposón, tampoco tenían resistencia a la kanamicina (o neomicina), y de ésta manera es fácil diferenciar y seleccionar a las mutantes

plaqueandolas en cajas de Petri con PY+*Nal*₂₀*Nm*₆₀.

A las colonias resultantes, que en teoría serían de las cepas mutantes con el minitransposón, se les hicieron geles de electroforesis tipo Eckhardt para probar su autenticidad. Además, algunos geles fueron utilizados para transferirlos a membranas de nailon, y se hibridaron con una sonda (que contenía la secuencia del minitransposón marcado radiactivamente) con la finalidad de determinar el lugar de inserción del minitransposón dentro del genoma de la bacteria.

0.6. Resultados

0.6.1. Experimentos de competencia

Como ya se mencionó, la capacidad de resistencia de las cepas de *Rhizobium* a un particular antibiótico puede ser usada como un marcador, lo que significa que éstas pueden ser identificadas por su habilidad para crecer en medios que contengan dicho antibiótico. Si las cepas mutantes son usadas para inocular una leguminosa, los nódulos ocupados por dichas cepas pueden ser identificados plateándolos en un medio que contengan el respectivo antibiótico para el cual son resistentes, puesto que las cepas mutantes pueden crecer y las otras no. De esta manera, la capacidad simbiótica puede ser comparada entre las bacterias mutantes y las silvestres en diferentes tiempos, usando este sencillo método.

Resultados de nodulación del Experimento I en las tres cepas más competitivas.

Las siguientes tablas muestran los valores de nodulación arrojados por las tres cepas que mostraron mayor capacidad competitiva en las dos variedades de frijol durante el Experimento I, en paréntesis se muestran sus respectivos porcentajes relativos. Los resultados de todas las cepas probadas se encuentran en el Apéndice XIII.

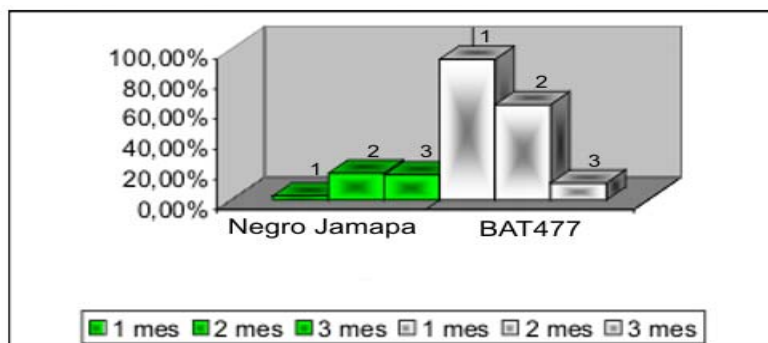
Las tablas 7 y 8 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 7: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	75 (100 %)	42 (65.33 %)	2 (2.66 %)
2	90 (100 %)	90 (100 %)	16 (17.77 %)
3	90 (100 %)	77 (85.50 %)	15 (16.66 %)

Cuadro 8: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100 %)	88 (97.77 %)	84 (93.33 %)
2	90 (100 %)	76 (84.44 %)	57 (63.33 %)
3	71 (100 %)	59 (83.10 %)	8 (11.26 %)



Graficación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ006 en las dos variedades de frijol.

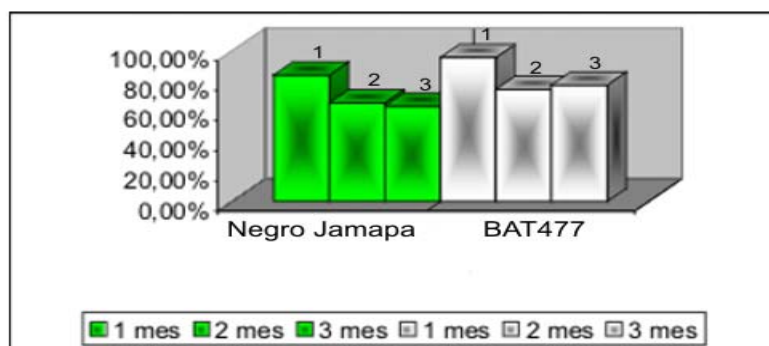
Las tablas 9 y 10 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 9: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	60 (100%)	58 (96.60%)	52 (83.87%)
2	90 (100%)	90 (100%)	59 (65.55%)
3	90 (100%)	90 (100%)	57 (63.33%)

Cuadro 10: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100%)	89 (98.80%)	86 (95.55%)
2	90 (100%)	80 (88.80%)	67 (74.44%)
3	66 (100%)	59 (89.39%)	51 (77.27%)



Graficación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ1329 en las dos variedades de frijol.

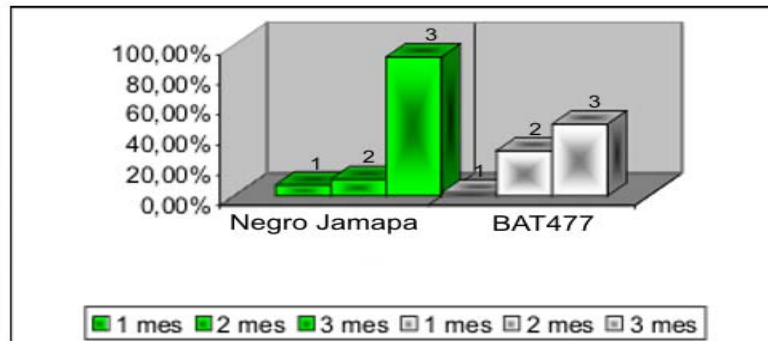
Las tablas 11 y 12 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 11: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Sp 60
1	68 (100 %)	35 (51.47 %)	5 (7.35 %)
2	90 (100 %)	72 (80.00 %)	10 (11.11 %)
3	90 (100 %)	85 (94.40 %)	83 (92.22 %)

Cuadro 12: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Sp 60
1	90 (100 %)	66 (73.33 %)	2 (2.22 %)
2	90 (100 %)	52 (57.77 %)	27 (30.00 %)
3	44 (100 %)	41 (93.10 %)	21 (47.72 %)



Graficación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ4010 en las dos variedades de frijol.

Resultados de nodulación del Experimento II en las tres cepas más competitivas.

Las siguientes tablas muestran los valores de nodulación arrojados por las tres cepas más competitivas en las dos variedades de frijol, durante el Experimento II, así como, sus respectivos porcentajes.

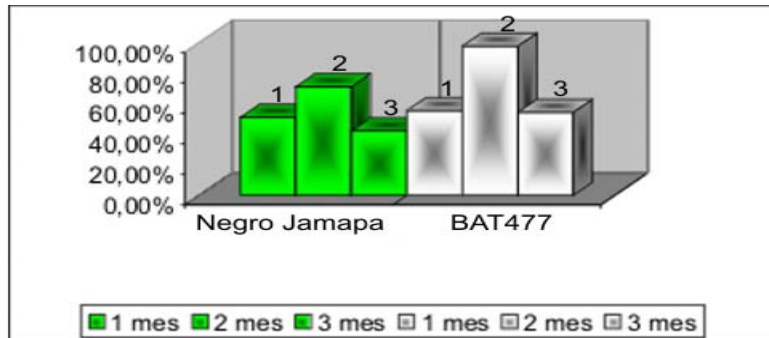
Las tablas 13 y 14 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 13: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100 %)	66 (73.33 %)	46 (51.11 %)
2	90 (100 %)	86 (96 %)	64 (71.11 %)
3	90 (100 %)	70 (77.77 %)	38 (42.22 %)

Cuadro 14: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4006 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100 %)	62 (68.88 %)	50 (55.55 %)
2	90 (100 %)	90 (100 %)	88 (97.77 %)
3	90 (100 %)	86 (95.55 %)	49 (54.44 %)



Grificación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ006 en las dos variedades de frijol.

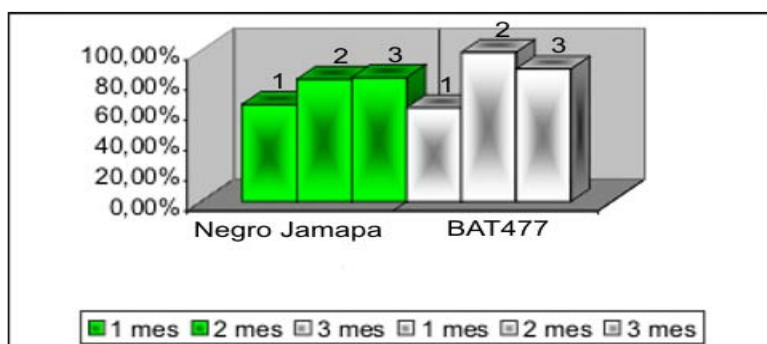
Las tablas 15 y 16 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 15: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100 %)	72 (80.00 %)	58 (64.44 %)
2	90 (100 %)	87 (97 %)	73 (81.11 %)
3	90 (100 %)	89 (99 %)	74 (82.22 %)

Cuadro 16: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ1329 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Nm 60
1	90 (100 %)	68 (75.55 %)	56 (62.22 %)
2	90 (100 %)	90 (100 %)	89 (98.88 %)
3	90 (100 %)	85 (94.44 %)	79 (87.77 %)



Graficación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ1329 en las dos variedades de frijol.

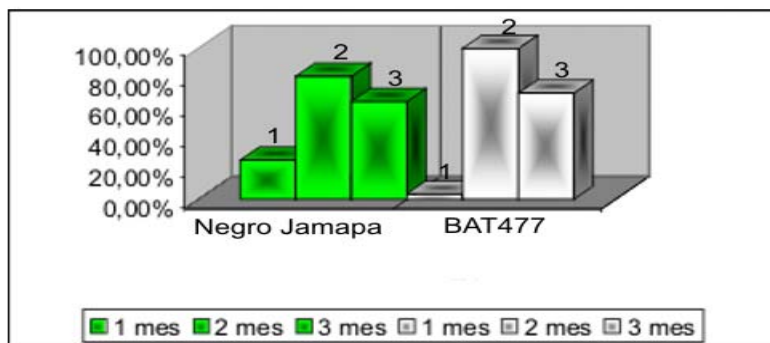
Las tablas 17 y 18 muestran los valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol Negro Jamapa y BAT44, respectivamente.

Cuadro 17: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol Negro Jamapa.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Sp 60
1	90 (100 %)	36 (40 %)	14 (15.55 %)
2	90 (100 %)	90 (100 %)	44 (48.88 %)
3	90 (100 %)	83 (92.22 %)	35 (38.88 %)

Cuadro 18: Valores de nodulación arrojados por la cepa FAJ4010 en frijol BAT477.

Mes	# de nódulos	PY + Ciclo 10	PY + Sp 60
1	90 (100 %)	35 (38.88 %)	2 (2.22 %)
2	90 (100 %)	86 (95.55 %)	54 (60 %)
3	90 (100 %)	85 (94.44 %)	38 (42.22 %)



Graficación de los porcentajes de nodulación de la cepa FAJ4010 en las dos variedades de frijol.

Como se puede observar en el apéndice XIII, las 3 cepas que mostraron una mayor capacidad competitiva durante los dos experimentos fueron FAJ4006, FAJ1329 y FAJ4010.

Es importante mencionar que en el primer experimento los nódulos extraídos en el primer mes de plantas Negro Jamapa no tuvieron un tiempo de esterilización superficial adecuado durante su procesamiento, ya que nuestro control de esterilidad nos estaba dando positivo, lo que pudo generarnos resultados falsos positivos (ver apéndice IV), por lo que decidimos incrementar el tiempo de esterilización inicial, que era de 5 minutos, a 7 minutos en los próximos muestreos. Dicho incremento nos resultó satisfactorio. Por lo tanto, los resultados en este mes, en esta variedad de frijol, deben de ser tomados con precaución.

Como se puede observar en los resultados de los cuadros 7-12 y sus respectivas gráficas, dentro de las cepas que mostraron una mayor capacidad competitiva existe una gran variabilidad en su nodulación dependiendo del tiempo y la variedad de frijol utilizada.

La cepa FAJ4010 presenta valores porcentuales de nodulación en frijol Negro Jamapa que van de los 7.35 % y 92.22 % en el primer experimento y de 15.55 % a 48.88 % en el segundo. En la variedad de frijol BAT477 los valores están entre 2.22 % y 47.72 % para el primer experimento y 2.22 % a 60.0 % en el segundo.

La cepa FAJ4006 presenta valores porcentuales de nodulación en frijol Negro Jamapa que van de los 2.66 % a 17.77 % en el primer experimento y 42.22 % a 71.11 % en el segundo. En esta misma cepa, para la variedad de frijol BAT477 se observa un incremento en los valores de nodulación, tanto en el primer experimento como en el segundo. En el primer experimento se presentan valores que van de 11.26 % a 93.33 % y en el segundo

experimento valores de 54.44 % a 97.77 %.

La cepa que presentó el mayor porcentaje de nodulación en ambas variedades de frijol fue FAJ1329. En frijol Negro Jamapa se observan valores que van de 63.3 % al 83.87 % de ocupación de los nódulos en el primer experimento y en el segundo valores de 64.4 % a 82.22 %. Para esta cepa en frijol BAT477 también se observa un ligero incremento en la nodulación en los 2 experimentos, cuando se compara con la variedad Negro Jamapa. En el primero los valores obtenidos fueron de 77.27 % a 95.55 % y en el segundo 62.22 % a 98.88 %. Estos porcentajes de nodulación obtenidos son superiores a lo que se ha observado en otros trabajos donde se ha cuantificado la ocupación de nódulos por cepas inoculadas versus las nativas, en los cuales se reportan que la nodulación de las cepas inoculadas es del 5-20 %.

0.6.2. Estimación del número de bacterias en los inóculos y en el suelo empleado.

Resultados de la estimación del número de bacterias formadoras de colonias en los inóculos utilizados.

Con el siguiente experimento se pretendió hacer una estimación sobre el número más probable de bacterias que estaban presentes en los inóculos utilizados para las plántulas de frijol. Para ello se llevaron a cabo diluciones de los diferentes inóculos, se estriaron en medios de cultivo y se hizo un conteo de las colonias crecidas (Ver Apéndice XII). Este tipo de ensayos nos proporciona información del valor aproximado del número de bacterias que se estaban inoculando, es decir, saber cuál era el tamaño de población inicial con que contaban las bacterias antes de comenzar el proceso competitivo por la nodulación. Además, observar si el número de bacterias inoculadas tiene alguna relación, en este caso, con los resultados obtenidos sobre la capacidad competitiva. La determinación del número de bacterias inoculadas es un factor importante, ya que se ha visto que tiene una relación directa con su respuesta competitiva.

Cuadro 19: Número de colonias resultantes que crecieron en PY con antibióticos, para tres diluciones (10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5}), y sus respectivas repeticiones, ésto es para las diferentes cepas mutantes.

Cepas	Dilución	No. de colonias en la 1ª repetición	No. de colonias en la 2ª repetición	No. de colonias en la 3ª repetición
FAJ4006	10^{-7}	3	4	
	10^{-6}	42	38	
	10^{-5}	404	406	
FAJ1329	10^{-7}	2	5	
	10^{-6}	41	47	
	10^{-5}	382	374	
BRH2	10^{-7}	15	17	
	10^{-6}	198	173	177
	10^{-5}	649	756	
FAJ4010	10^{-7}	5	7	
	10^{-6}	47	42	
	10^{-5}	440	466	
BRH1	10^{-7}	2	4	
	10^{-6}	18	17	
	10^{-5}	241	237	
FAJ4007	No determinado			
CNPAF512	No determinado			
PL41H	10^{-7}	3	0	
	10^{-6}	12	15	
	10^{-5}	363	340	
PL43C	10^{-7}	3	11	
	10^{-6}	70	65	
	10^{-5}	526	556	

Cuadro 20: Cálculos hechos para estimar el número de bacterias viables (UFC= unidades formadoras de colonias) contenidas por mililitro de inóculo y por maceta (es decir, cada 100ml) en la cepa FAJ4006.

Cepa	Dilución	Cálculos
FAJ4006	10^{-7}	Primera repetición: 3×10^7 UFC/ml de inóculo. Donde: 3= No.de bacterias que crecieron y 10^{-7} la dilución. Por lo tanto: $3 \times 10^7 \times 100\text{ml} = 3 \times 10^9$ UFC/maceta. Donde: 100ml= cantidad de inóculo vertido a cada maceta Segunda repetición: 4×10^7 UFC/ml de inóculo 4×10^9 UFC/maceta
	10^{-6}	Primera repetición: $4,2 \times 10^7$ UFC/ml de inóculo. $4,2 \times 10^9$ UFC/maceta Segunda repetición: $3,8 \times 10^7$ UFC/ml de inóculo. $3,8 \times 10^9$ UFC/maceta
	10^{-5}	Primera repetición: $4,04 \times 10^7$ UFC/ml de inóculo. $4,04 \times 10^9$ UFC/maceta Segunda repetición: $4,06 \times 10^7$ UFC/ml de inóculo. $4,06 \times 10^9$ UFC/maceta

El promedio de UFC/ml de la cepa FAJ4006 es: $3 \times 10^7 + 4 \times 10^7 + 4,2 \times 10^7 + 3,8 \times 10^7 + 4,04 \times 10^7 + 4,06 \times 10^7 = 23,1 \times 10^7$
 $23,1 \times 10^7 / 6\text{ml} = 3,85 \times 10^7$ UFC/ml.

Por lo tanto, el promedio de UFC/maceta es de: $3,85 \times 10^7 \times 100 = 3,85 \times 10^9$.

Cuadro 21: Promedio de bacterias contenidas por mililitro de inóculo y por maceta en las diferentes cepas.

Cepa	Promedio/ml	Promedio/maceta
FAJ4006	$3,85 \times 10^7$	$3,85 \times 10^9$
FAJ1329	$3,893 \times 10^7$	$3,893 \times 10^9$
BRH2	$1,4 \times 10^8$	$1,44 \times 10^{10}$
FAJ4010	$4,99 \times 10^7$	$4,99 \times 10^9$
BRH1	$2,38 \times 10^7$	$2,38 \times 10^9$
PL43C	$6,38 \times 10^7$	$6,38 \times 10^9$
PL41H	$2,546 \times 10^8$	$2,546 \times 10^{10}$

El número de bacterias promedio inoculado a las plantas en nuestros experimentos estaban alrededor de $4,0 \times 10^9$ para cada 3 plantas (es decir, por cada maceta), que es el valor recomendado como estándar para los experimentos de inoculación [33]. Solo los inóculo preparados con las cepas BRH2 y PL41H se fueron por arriba de este valor, sin embargo, no se observó que esto les confiriera alguna ventaja adicional que les permitiera formar un mayor número de nódulos frente a las nativas. Ni tampoco sobre las cepas que mostraron ser más competitivas (FAJ4006, FAJ1329 y FAJ4010).

Resultados de la estimación del número mas probable de bacterias formadoras de nodulos (NMP) contenidas en el suelo utilizado

Así como se hizo una estimación del número de bacterias contenidas en los inóculos preparados para los experimentos de competencia, se hizo otro experimento para estimar el número de bacterias presentes en el suelo utilizado, y que fueran capaces de formar nódulos en las variedades de frijol empleadas. Para los análisis de los datos se emplearon tablas estadísticas del número más probable.

Para esto, se hicieron diluciones en agua de 1g de tierra, que iban de 10^0 hasta 10^{-4} . Se pusieron a crecer plantas de frijol en matraces de manera aséptica, los cuáles, una vez listos, se inoculaban con las diluciones que se hicieron de la tierra, añadiendo 0.1ml por matraz. Posteriormente, después de 18 días se observaron las plantas para ver si habían nodulado (Ver apéndice XII).

Las siguientes tablas (22-31) muestran la presencia o la ausencia de la nodulación en las plantas de frijol, a diferentes diluciones. Así como, varias repeticiones.

Cuadro 22: Nodulación en frijol BAT477

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No

Cuadro 23: Nodulación en frijol Negro Jamapa

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No

Cuadro 24: Nodulación en frijol BAT477. Primera repetición

No. de matraz	Dilución 10 ⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴
1	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	No	No

Cuadro 25: Nodulación en frijol Negro Jamapa. Primera repetición

No. de matraz	Dilución 10 ⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴
1	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	No	No

Cuadro 26: Nodulación en frijol BAT477. Segunda repetición

No. de matraz	Dilución 10 ⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴
1	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
3	Noduló	Noduló	No	Noduló	No

Cuadro 27: Nodulación en frijol Negro Jamapa. Segunda repetición

No. de matraz	Dilución 10 ⁰	Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³	Dilución 10 ⁻⁴
1	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló
3	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No

Cuadro 28: Nodulación en BAT477. Tercera repetición

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	No	No	No

Cuadro 29: Nodulación en frijol Negro Jamapa. Tercera repetición

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
3	Noduló	Noduló	No	No	No

Cuadro 30: Nodulación en frijol BAT477. Cuarta repetición

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	No	No	No
2	Noduló	Noduló	Noduló	No	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	No	No

Cuadro 31: Nodulación en frijol Negro Jamapa. Cuarta repetición

No. de matraz	Dilución 10^0	Dilución 10^{-1}	Dilución 10^{-2}	Dilución 10^{-3}	Dilución 10^{-4}
1	Noduló	Noduló	Noduló	Noduló	No
2	Noduló	Noduló	No	Noduló	No
3	Noduló	Noduló	Noduló	No	No

Los datos fueron comparados y analizados mediante el uso de las tablas del número más probable [38]. El número estimado para cada una de las repeticiones se muestra en la siguiente tabla.

Estos números son una muestra de la abundancia de bacterias que están presentes en el suelo que utilizamos en nuestro estudio.

Se observa que existe un mayor número de bacterias nativas capaces de nodular frijol Negro Jamapa en comparación con BAT477, esto puede deberse a que esta variedad se

cultive más en México permitiendo que un número mayor de tipos bacterianos pueda haber generado una relación más específica con este tipo de frijol. Esto también podría explicar que las cepas probadas en este trabajo y que resultaron ser mejores competidoras por los sitios de infección mostraran una menor capacidad de nodulación cuando se probaron con el frijol Negro Jamapa que cuando se probaron con la variedad de frijol BAT477, el cual se siembra principalmente en Sudamérica.

0.6.3. Peso seco y Reducción de acetileno

Cálculos y expresión de la reducción de acetileno

Los resultados obtenidos en los ensayos de reducción de acetileno se expresan en moles de etileno producidos. Para poder expresar el área de reducción de acetileno en términos del potencial de fijación de nitrógeno se aplican los siguientes cálculos:

1- **Altura del pico = (área bajo la curva / 629)(Att integrador / Att inyección)**

2- **Total FID = (altura del pico)(Att inyección)(9.3 x 10⁻³)**

3- **χ = (total FID)(Vol. vial / Vol. Inyección)**

4- **nmol C₂H₄ / vial = (χ)(1h / horas de incubación)**

Ejemplo. La planta número 3 mostró una área de 325, por lo tanto:

Altura del pico = (325/629)(16/2) = 4.133 Total FID = (4.133)(2)(9.3⁻³) = 0.0768

χ = (0.0768)(39/1) = 2.9984 nmol C₂H₄/n vial = (2.9984)(1/5.5) = 0.5451

Los siguientes resultados corresponden a los datos de peso seco y de reducción de acetileno obtenidos de las plantas del primer mes inoculadas con las diferentes cepas mutantes en el Experimento II.

Cuadro 32: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante FAJ1329.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
1	NJ	0.28g	ND*	- - -
2	NJ	0.49g	ND*	- - -
3	NJ	0.30g	325	0.5451
4	NJ	0.43g	2237	3.7524
5	NJ	0.38g	9039	15.1626
6	NJ	0.25g	391	0.6558
7	NJ	0.41g	84	0.1409
8	NJ	0.29g	ND*	- - -
9	NJ	0.27g	148	0.2482
10	BAT477	0.36g	ND*	- - -
11	BAT477	0.31g	231	0.3874
12	BAT477	0.37g	1105	1.8536
13	BAT477	0.30g	229	0.3841
14	BAT477	0.35g	668	1.1205
15	BAT477	0.29g	224	0.3757
16	BAT477	0.38g	ND*	- - -
17	BAT477	0.37g	ND*	- - -
18	BAT477	0.20g	171	0.2868

*ND= No determinado

Cuadro 33: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante FAJ4006.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
19	BAT477	0.34g	359	0.6022
20	BAT477	0.36g	646	1.0836
21	BAT477	0.39g	2164	3.6300
22	BAT477	0.32g	1044	1.7512
23	BAT477	0.28g	418	0.7011
24	BAT477	0.45g	24830	41.6515
25	BAT477	0.38g	23464	39.3601
26	BAT477	0.29g	159.3204	
27	BAT477	0.39g	93227	143.3531
28	NJ	0.27g	784	1.3151
29	NJ	0.37g	568	0.9528
30	NJ	0.25g	993	1.6657
31	NJ	0.28g	10046	15.4475
32	NJ	0.42g	1425	2.3903
33	NJ	0.26g	168345	258.8605
34	NJ	0.34g	ND	- - -
35	NJ	0.27g	450	0.7548
36	NJ	0.23g	3485	5.8459

Cuadro 34: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante FAJ4010.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
37	BAT477	0.35g	19024	29.2528
38	BAT477	0.30g	5089	8.5366
39	BAT477	0.34g	164	0.2751
40	BAT477	0.35g	1990	3.3381
41	BAT477	0.28g	8650	14.5100
42	BAT477	0.29g	3796	6.3676
43	BAT477	0.28g	51925	79.8439
44	BAT477	0.24g	1863	2.8646
45	BAT477	0.39g	4920	8.2531
46	NJ	0.25g	16681	25.6500
47	NJ	0.32g	198	0.3321
48	NJ	0.32g	50961	78.3616
49	NJ	0.38g	44729	68.7788
50	NJ	0.37g	13799	21.2184
51	NJ	0.30g	1501	2.5178
52	NJ	0.29g	37451	57.5876
53	NJ	0.28g	424	0.7112
54	NJ	0.30g	22643	34.8176

Cuadro 35: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* CNPAF512.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
55	BAT477	0.42g	9129	14.0374
56	BAT477	0.29g	1154	1.9357
57	BAT477	0.41g	10758	16.5423
58	NJ	0.29g	4047	6.2229
59	NJ	0.34g	2029	3.1199
60	NJ	0.19g	ND	- - -

Cuadro 36: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante PL41H.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
61	NJ	0.60g	1617	2.4864
62	NJ	0.29g	8887	13.6653
63	NJ	0.50g	5944	9.1399
64	BAT477	0.28g	5252	8.0758
65	BAT477	0.33g	3329	5.1189
66	BAT477	0.35g	8041	12.3644

Cuadro 37: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante BRH2.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
67	NJ	0.33g	32208	49.5255
68	NJ	0.30g	3424	5.2650
69	NJ	0.34g	16631	25.5731
70	BAT477	0.37g	3929	6.0415
71	BAT477	0.35g	1575	2.4218
72	BAT477	0.27g	3838	5.9016

Cuadro 38: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante PL43C.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
73	BAT477	0.22	4503	6.9241
74	BAT477	0.31	2368	3.6412
75	BAT477	0.20	2097	3.2245
76	NJ	0.28	1432	2.2019
77	NJ0	0.40	2491	3.8303
78	NJ	0.29	1956	3.0076

Cuadro 39: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante BRH1.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
79	BAT477	0.29	2435	3.7442
80	BAT477	0.26	1125	1.7298
81	BAT477	0.38	8719	13.4070
82	NJ	0.29	9614	14.7832
83	NJ	0.23	7660	11.7786
84	NJ	0.25	13396	20.5987

Cuadro 40: Tabla que muestra los valores obtenidos de las plantas inoculadas con la cepa de *Rhizobium etli* mutante FAJ4007.

No. de planta	Variedad de frijol	Peso Seco (g)	Área de reducción de acetileno	nmol C ₂ H ₄ por vial
85	NJ	0.21	3926	6.0369
86	NJ	0.26	430	0.6612
87	NJ	0.39	1642	2.5248
88	BAT477	0.32	4235	6.5120
89	BAT477	0.37	3459	5.3188
90	BAT477	0.39	1269	1.9513

0.6.4. Mutagénesis por transposición.

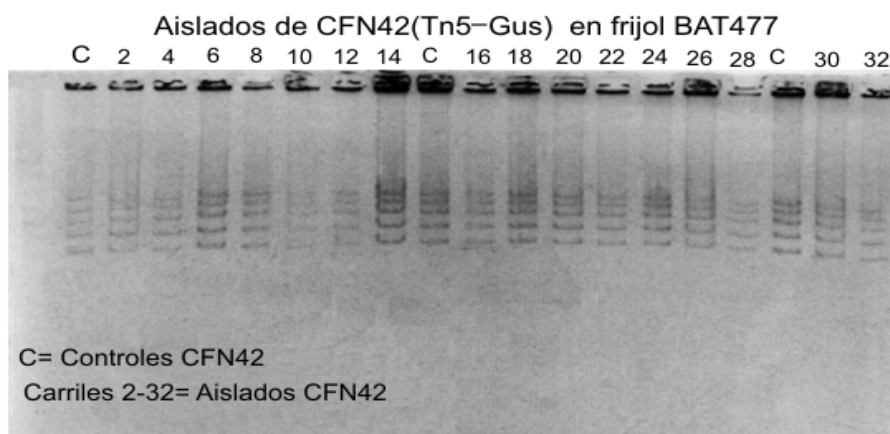
Para generar el banco de mutantes de *R. etli* cepa CFN42, se incubaron las cepas de *E. coli* TN5-Gus Km^r y *R. etli* (ver apéndice XIV) durante 14 horas y promover la inserción del minitransposón que porta *E. coli* en el genoma de *R. etli*. Pasado este tiempo, se colectaron todas las células correspondientes a la cruce y con ellas se inocularon 2ml de una solución de cloruro de sodio al 0.85 %. A partir de esa solución se hicieron diluciones seriadas de las cuales se tomaron 100 microlitros de cada una y se plaquearon en cajas de Petri PY+*Nal*₂₀*Nm*₆₀ con calcio para hacer una selección de las bacterias de *R. etli* que adquirieron el minitransposón. Después de incubar de 3-4 días las placas, se contaron las colonias crecidas que resultaron ser 5849. Las colonias se recolectaron en su totalidad y se disolvieron en 600ml de solución Fahraeuse para formar un inóculo y regar 9 plántulas de frijol Negro Jamapa y 9 de frijol BAT477 crecidas en tierra no estéril. Se analizaron 10 nódulos por planta. Los resultados de nodulación se presentan en la siguiente tabla.

Cuadro 41: Resultados de nodulación de *R. etli* CFN42.

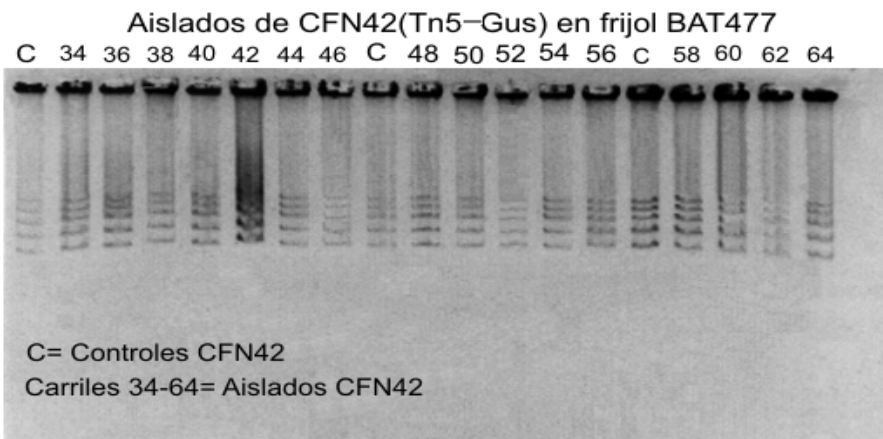
No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	<i>Nal</i> ₂₀ <i>Nm</i> ₆₀
9 Negro Jamapa	90	85	1
9 BAT477	90	87	82

De esta cruce se aislaron las cepas mutantes de 82 nódulos en frijol BAT477 y 1 en Negro Jamapa. Para probar su autenticidad, se tomó una muestra de estos aislados y se corrieron en geles de electroforesis tipo Eckhardt para observar el patrón de plásmidos.

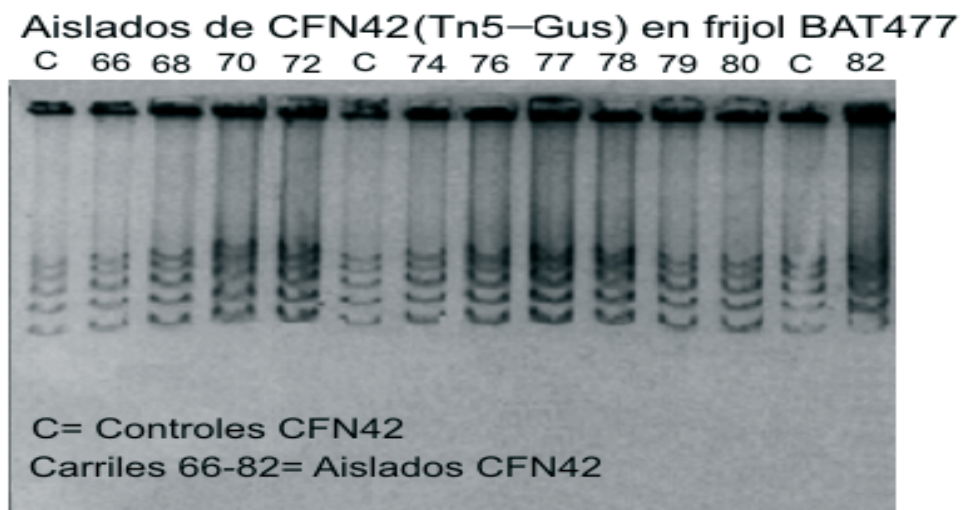
Las siguientes fotografías muestran los patrones de plásmido característicos de la cepa CFN42 que se obtuvieron de los aislados. Como control, el patrón de plásmidos de la cepa silvestre CFN42.



Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) con los obtenidos de los aislados en la cruce *E. coli-R. etli* CFN42, en frijol BAT477. Aislados 2-32.



Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) con los obtenidos de los aislados en la cruz *E. coli-R. etli* CFN42, en frijol BAT477. Aislados 34-64.



Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) con los obtenidos de los aislados en la cruz *E. coli-R. etli* CFN42, en frijol BAT477. Aislados 66-82.

Aislado de CFN42(Tn5-Gus)
en frijol Negro Jamapa

C 1



C= control CFN42
Carril 1= aislado CFN42

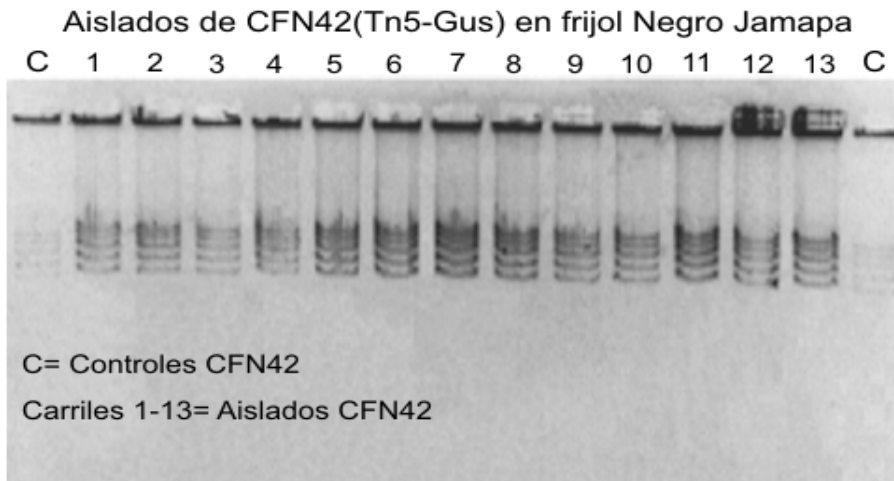
Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) con el obtenido del aislado en la cruzada *E. coli*-*R. etli* CFN42, en frijol Negro Jamapa. Aislado 1.

Se realizó una segunda cruzada para *R. etli* cepa CFN42, de la cual obtuvimos 13280 colonias. Con ellas se inocularon 15 plantas Negro Jamapa siguiendo el mismo método que las colonias resultantes de la cruzada anterior. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 42: Resultados de nodulación de *R. etli* CFN42.

No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
15 Negro Jamapa	95	15	13

De la segunda cruzada de *E. coli* y *R. etli* CFN42 se aislaron 13 cepas mutantes en frijol Negro Jamapa. La siguiente foto muestra los resultados de la electroforesis tipo Eckhardt de estos aislados donde se observa el patrón característico de *R. etli* CFN42.



Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) con los obtenidos de los aislados en la cruzada *E. coli*-*R. etli* CFN42, en frijol Negro Jamapa. Aislados 1-13.

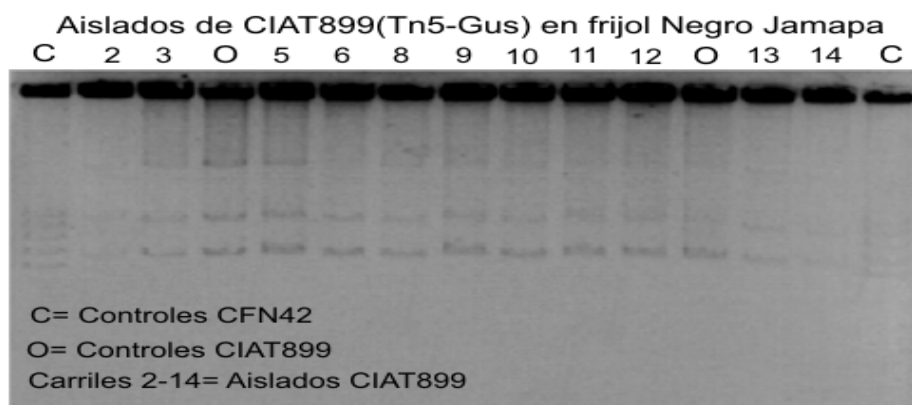
Para obtener el banco de mutantes de *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* CNPAF512 se siguió el mismo método.

En el caso de *R. tropici* CIAT899 se obtuvieron 7774 colonias que se usaron para inocular 15 plantas de frijol Negro Jamapa. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 43: Resultados de nodulación de *R. tropici* CIAT899.

No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
15 Negro Jamapa	103	28	15

De la cruzada de *E. coli* y *R. tropici* CIAT899 se aislaron 15 cepas mutantes en frijol Negro Jamapa. La siguiente fotografía muestra la autenticación de las cepas obtenidas mediante un gel tipo Eckhardt.



Gel tipo Eckhardt donde se compara el patrón característico de los plásmidos de la cepa *R. etli* CFN42 (C) y *R. tropici* CIAT899 (O) con los obtenidos de los aislados en la cruz *E. coli*-*R. tropici* CIAT899, en frijol Negro Jamapa. Aislados 2-14.

Para *R. etli* CNPAF512 se obtuvieron 3951 colonias que se probaron en 9 plantas Negro Jamapa y 9 plantas BAT477. Se aislaron 21 cepas en frijol BAT477 y 28 en Negro Jamapa. La autenticación por gel no la determinamos por problemas técnicos, no pudimos determinar las condiciones mediante las cuales se resuelven los plásmidos en esta cepa. Un resumen de los resultados de nodulación se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 44: Resultados de nodulación de *R. etli* CNPAF512

No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
9 Negro Jamapa	86	73	28
9 BAT477	90	80	21

Para determinar si las cepas habían realmente incrementado su capacidad competitiva, se pusieron a competir con sus respectivas cepas parentales (es decir, las cepas de *Rhizobium* a partir de las cuales se obtuvieron las mutantes) en matraces con un sustrato estéril. Después de 18 días los nódulos resultantes de ésta inoculación se recuperaron, esterilizaron, y los bacteroides fueron plaqueados en cajas de Petri con antibióticos. Como las cepas parentales no tenían el minitransposón, tampoco tenían resistencia a la kanamicina, de tal manera que diferenciábamos y seleccionábamos a las mutantes en cajas de Petri por la técnica de resistencia a antibióticos.

La tabla 45 muestra los valores netos y porcentuales arrojados de la nodulación observada al poner a competir los aislados mutantes con sus cepas parentales:

Cuadro 45: Nodulación de los aislados en presencia de su cepa parental.

	Aislado	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
<i>R. tropici</i> CIAT899	A	50 (100%)	48 (96%)	42 (84%)
	B	50 (100%)	32 (64%)	13 (26%)
	C	50 (100%)	46 (92%)	30 (60%)
<i>R. etli</i> CFN42	D	40 (100%)	24 (60%)	0 (0%)
	E	40 (100%)	22 (55%)	6 (15%)

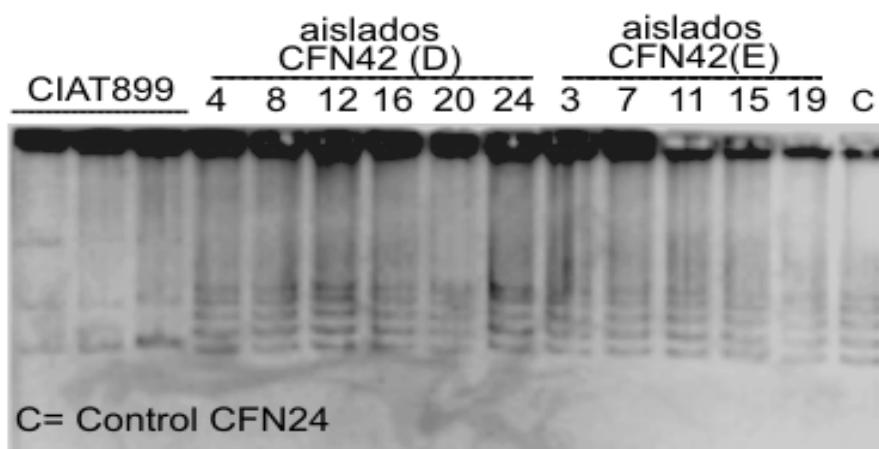
Los resultados anteriores indican que los aislados obtenidos por mutación de *R. tropici* CIAT899 muestran un mayor incremento en la nodulación en comparación con *R. etli* CFN42. Esto es congruente con observaciones anteriores donde se ha visto que *R. tropici* presenta una mayor plasticidad genómica.

De los 13 aislados de *R. etli* CFN42 Nal₂₀Nm₆₀, resultantes de la segunda cruza, se escogieron 2 (que se denominaron D y E) que corresponden a los aislados 1 y 11 respectivamente, y se pusieron a competir en tierra no estéril con las bacterias presentes en el suelo, tal como se hizo en la primera parte de este trabajo, observándose al mes los siguientes resultados:

Cuadro 46: Resultados de Nodulación de los aislados D y E (*R. etli* CFN42).

Aislado	Número de plantas	Número de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
D	8 Negro Jamapa	80 (100%)	41 (51.25%)	36 (45%)
E	8 Negro Jamapa	40 (100%)	31 (77.5%)	18 (45%)

A una muestra de los bacteroides aislados de los nódulos resultantes se les probó su autenticidad mediante Eckhardt. La siguiente fotografía muestra los patrones de plásmidos característicos de *R. etli* CFN42 obtenidos por Eckhardt:



Asímismo, de los 15 aislados de *R. tropici* CIAT899 Nal₂₀Nm₆₀, que se obtuvieron

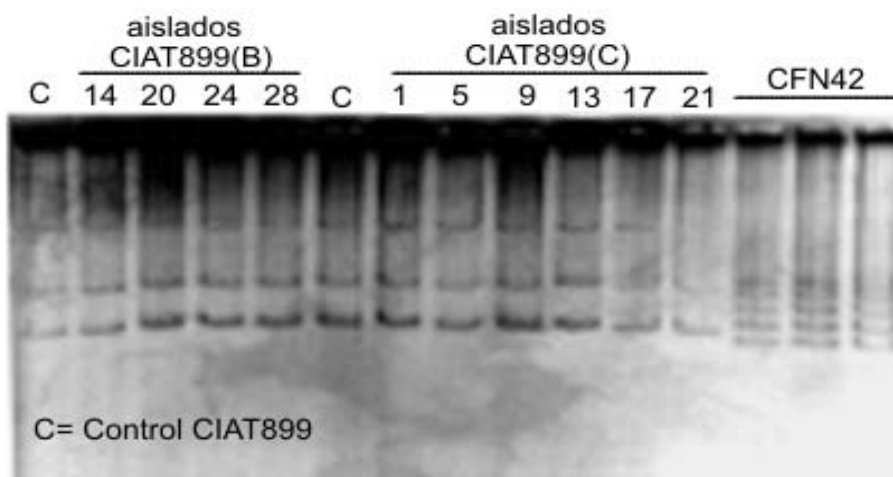
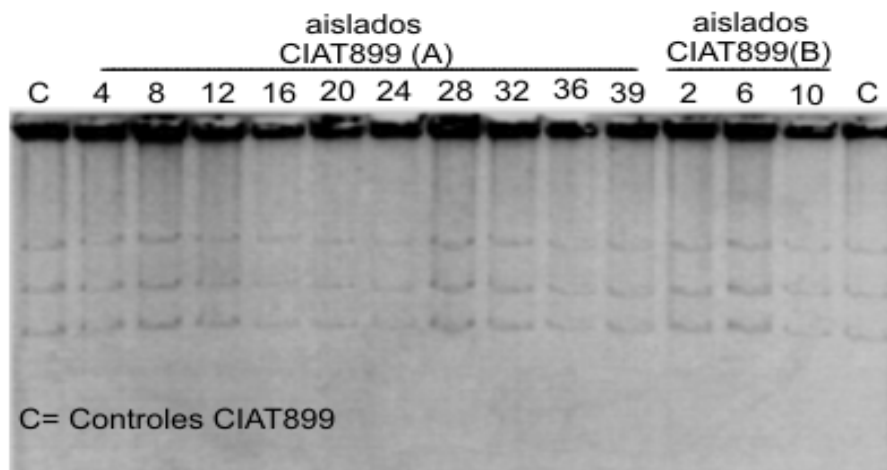
anteriormente, se escogieron 3 que denominamos A, B y C y que corresponden a los aislados 1, 7 y 14, respectivamente, y se pusieron a competir con cepas nativas en suelo no estéril. Los resultados fueron los siguientes:

Cuadro 47: Resultados de Nodulación de los aislados A, B y C (*R. tropici* CIAT899).

Aislado	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀
A		80 (100 %)	44 (55 %)	39 (48.75 %)
B		80 (100 %)	41 (51.25 %)	41 (51.25 %)
C		50 (100 %)	26 (52 %)	25 (50 %)

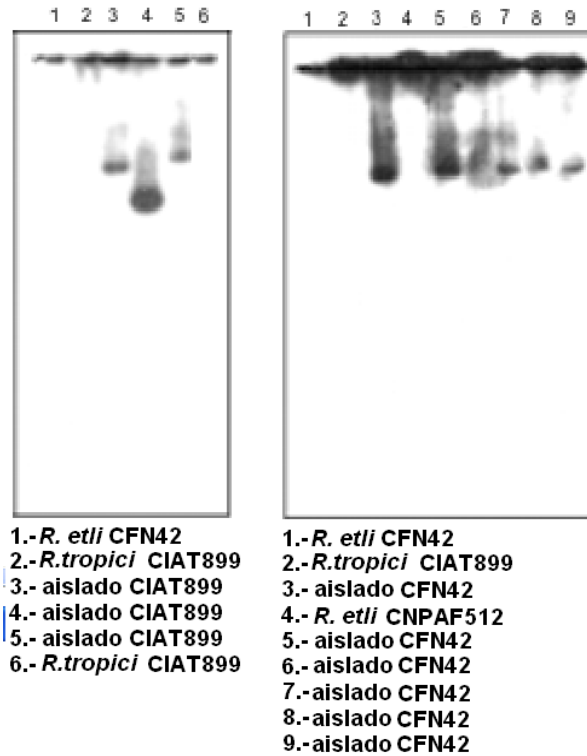
Estos resultados muestran que estas cepas, bajo estas condiciones, presentan un porcentaje de nodulación alrededor del 50 %.

Las siguientes fotografías muestran los patrones de plásmidos por electroforésis tipo Eckhard de algunos aislados obtenidos en este experimento, donde se observa el patrón característico de *R. tropici* CIAT899.



Finalmente, para determinar de manera gruesa que el minitransposón está presente en las cepas mutantes que se generaron y recuperaron de los nódulos, se tomó una pequeña muestra de los aislados y se corrieron en un gel de electroforésis tipo Eckhardt. El DNA de los plásmidos fué transferido a una membrana de nailon para después ser incubado con una sonda específica para el minitransposón marcada con fósforo radioactivo.

Las siguientes fotografías muestran los resultados de la hibridación con la sonda radioactiva:



Debido a que estos resultados nos sugieren un incremento en la capacidad de nodulación de las cepas mutantes generadas por inserción del minitransposón, nosotros sugerimos que el método aquí presentado de mutación por transposición puede ser de utilidad para la generación de cepas con un incremento en su capacidad competitiva.

0.7. Discusión

El nitrógeno es muy abundante en la Tierra, la principal reserva se encuentra en la atmósfera en forma de N_2 (nitrógeno molecular). El nitrógeno es un constituyente esencial e imprescindible de todos los seres vivos, sin embargo, el N_2 atmosférico no es directamente utilizado por las plantas o los animales, para que pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido.

El nitrógeno, junto con el agua, es uno de los factores limitantes más comunes de la producción vegetal. La contribución más importante en el suministro de nitrógeno a los ecosistemas se realiza a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), particularmente a través de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

El consumo mundial de fertilizantes químicos nitrogenados para incrementar la productividad de los cultivos es muy alto, y se predice un aumento en el futuro. Sin embargo, este tipo de fertilizantes resultan cada vez menos viables por presentar una serie de inconvenientes. Por más de 100 años, la FBN ha llamado la atención de las personas que estudian la nutrición vegetal y se ha hecho una enorme investigación en torno a ella aplicada a la agricultura.

Dentro del marco de una agricultura sostenible, FBN es un elemento clave ya que se considera como un proceso y un medio más efectivo, menos caro y no contaminante, para mejorar la fertilidad del suelo comparado con otras vías. Sin embargo, se sabe que este proceso biológico se lleva a cabo por una serie de mecanismos que a menudo son afectados por muchos factores que limitan su efectividad, dichos factores pueden ser tanto físicos, químicos y biológicos, los cuales, deben de ser primero identificados y después mitigados o eliminados. Es muy importante conocer las condiciones óptimas para que se realice la FBN, de manera que se obtengan los mejores beneficios para la planta, y en general, para la agricultura.

Por su capacidad de asociarse con bacterias fijadoras de nitrógeno, las leguminosas deberían de jugar un mayor papel (del que tienen actualmente) en los sistemas de cultivo, especialmente porque muchas de ellas son muy útiles en la rotación de cultivos. Particularmente, en México el frijol es de gran interés, principalmente a que es un alimento primario de la dieta del mexicano.

Cuando un suelo no contiene naturalmente los rizobios específicos para una leguminosa que se quiera cultivar, las cepas bacterianas necesarias pueden ser agregadas a ese suelo. La inoculación o bacterización es fácilmente llevada a cabo durante la siembra depositando los rizobios sobre la semilla o la plántula de leguminosa.

Cuando en el suelo existen muchas cepas de *Rhizobium* capaces de interactuar con una planta presente, aquellas que estén mejor adaptadas a las condiciones (las más competitivas) van a ser capaces de nodular.

La competitividad, en términos generales, se puede considerar como la capacidad para formar nódulos efectivos, con una determinada leguminosa, en presencia de otras cepas de rizobios. Por lo tanto, la competitividad entre diferentes cepas de *Rhizobium* puede expresarse como el porcentaje de nódulos producidos por cada una de ellas.

El objetivo de la inoculación es asociar las cepas de *Rhizobium* más eficientes a una leguminosa dada, de manera que el establecimiento de la simbiosis no sea un factor limitante para la fijación de nitrógeno o el rendimiento del cultivo.

En México que es considerado como centro de origen del frijol, es difícil la introducción de bacterias mejoradas de *Rhizobium*, ya que sus suelos tienen una alta diversidad y comúnmente un alto número de bacterias fijadoras de nitrógeno y que compiten con las bacterias de los inoculantes por los sitios de infección y por la nodulación de la planta.

Es precisamente *R. etli* el microsimbionte que seguramente co-evolucionó con el frijol (Segovia et al. 1993; citado por Martínez-Romero [37]) y el más eficiente en fijación de nitrógeno con las líneas Mesoamericanas de *Phaseolus vulgaris* (Martínez-Romero et al 1998; citado por Martínez-Romero [37]).

Para que los inoculantes sean exitosos, deben de contener bacterias efectivas y altamente competitivas. Si es así, es posible incrementar el rendimiento de los cultivos.

La capacidad competitiva es una propiedad intrínseca de cada cepa de *Rhizobium* y que puede ser influenciada por: las poblaciones presentes en el suelo, por el genotipo de la planta, las condiciones ambientales, etcétera.

¿Cuándo es necesario inocular?

Cuando se desea incrementar la producción agrícola mediante la FBN y en el suelo no existen bacterias fijadoras específicas para una determinada especie de planta, es necesaria la inoculación con cepas efectivas. En estas ocasiones, la introducción de bacterias nuevas, es relativamente más fácil, pues no existe competencia con otras cepas.

También es recomendable inocular los suelos cuando las rizobias están presentes en muy bajas cantidades, por ejemplo, en áreas donde no se han introducido anteriormente. En áreas donde el suelo es inapropiado para las rizobias existentes, se puede inocular con cepas resistentes a tales circunstancias. El límite inferior para el número de rizobios necesarios parece ser de 100-1000 bacterias por gramo de suelo (según la literatura), si es menor es necesario probar la inoculación.

Cuando los rizobios nativos no fijan nitrógeno de una manera óptima, entonces, la inoculación con cepas efectivas y mejoradas es una buena alternativa para incrementar la FBN, y por consecuencia el rendimiento del cultivo.

En el campo, la inoculación no tiene una regla definitiva. Si una planta es frecuentemente cultivada en una región y da un buen rendimiento, la inoculación con bacterias mejoradas tal vez sea inútil. Si se introduce una nueva leguminosa en una región, debe de verificarse la necesidad y viabilidad de inoculación para evitar un fracaso costoso.

¿Qué hace que una inoculación no sea efectiva?

Muchas veces la inoculación de cepas de *Rhizobium* para incrementar el rendimiento de un cultivo fracasa, esto puede ser debido a que la evaluación sobre la necesidad de inoculación haya sido mal estimada, que las bacterias introducidas no sean específicas para el cultivo tratado dando como resultado una inadecuada interacción entre la planta y la bacteria. También puede deberse a que las cepas introducidas no sean competitivas o que el inoculante tenga una cantidad insuficiente de bacterias viables y efectivas, esto conlleva a que la cepa introducida no sea capaz de formar nódulos, o si los forma sea en muy bajas proporciones. Otra razón puede ser que las bacterias introducidas no sean capaces de adaptarse a las condiciones ambientales presentes ya que el sitio experimental

es desfavorable para el establecimiento de la cepa.

Cuando las semillas de las plantas a inocular han sido tratadas químicamente con insecticidas o fungicidas, muchas veces esto afecta la respuesta de las rizobias. Cuando los inoculantes son expuestos a temperaturas mayores a 30-35°C durante su transporte y almacenamiento la eficiencia del inóculo disminuye.

Es importante recordar, que el éxito o el fracaso de una inoculación no dependen únicamente de las cepas bacterianas introducidas y de sus capacidades intrínsecas, sino también, y en gran medida, de la respuesta de la planta a la cual se quiere inocular, y que a su vez depende de los factores ambientales presentes.

Son muy interesantes los resultados encontrados en este trabajo, que muestran que 3 de las 9 cepas (FAJ4006, FAJ1329 y FAJ4010) de *R. etli* probadas, tienen un mayor capacidad competitiva para nodular frijol y desplazar a las cepas nativas del suelo; ya que generalmente son las cepas nativas las que ocupan la mayor parte de los nódulos. Se han reportado que las cepas introducidas como inóculo generalmente forman solo entre el 5-20% de los nódulos.

A pesar de las diferencias, las tendencias son muy claras y las variaciones pueden deberse a las fluctuaciones en las poblaciones de bacterias nativas en el tiempo, así como a las diferentes condiciones climáticas en el invernadero. Es importante también mencionar que hay variaciones considerables en algunos casos en la ocupación de los nódulos por las mutantes entre los cultivares de frijol probados.

¿Porqué se vuelven más competitivas algunas de las cepas mutantes probadas?

Estas mutantes parecen estar afectadas en el sistema “*Quorum sensing*”, o sea, en la capacidad de poder censar su densidad poblacional, que está mediada en *Rhizobium* por un tipo de moléculas autoinductoras tipo homoserinas lactonas. En la familia de las Rhizobaceas es frecuente encontrar especies productoras y, a su vez, resistentes a este tipo de moléculas. Se ha observado que en *Rhizobium*, estos autoinductores pueden tener efectos de bacteriocinas (como la trifolitoxina) que inhiben el crecimiento de otras cepas de *Rhizobium* sensibles. También se sabe que algunas bacterias, entre ellas muchas del género *Rhizobium*, sintetizan no solo una, sino varias homoserinas lactonas y, que éstas se sintetizan de una misma poza de precursores. Pudiera ser que una bacteria al ser mutante en uno de estos procesos, pudiera tener una poza más alta de precursores, y entonces, fluyera hacia la síntesis de otras moléculas, por ejemplo alguna bacteriocina. Si este fuera el caso, se sintetizaría en más alta concentración, entonces la cepa mutante podría inhibir la proliferación de cepas nativas y, así conferirle una mayor capacidad competitiva.

Si esto fuera cierto, se debería poder obtener inhibición con las cepas mutantes, pero no con la cepa silvestre, sobre el crecimiento de varias cepas de *Rhizobium*. Se tienen resultados experimentales que indican que esta pudiera ser la explicación correcta, comunicación personal de la Dra. María Esperanza Martínez Romero.

Existe también la posibilidad de que las 3 cepas más competitivas, al estar mutadas en el sistema “*Quorum sensing*”, se hayan visto afectadas en la manera de censar su densidad poblacional, las cuales, no necesitarían tener un número poblacional crítico (o quórum) para comenzar la producción de factores *nod* y el proceso de infección, de tal

manera que, dicho proceso comenzaría de manera más rápida, y por lo tanto, las cepas estarían ganando de manera más temprana los sitios de reconocimiento e infección, lo cual se podría traducir en una mayor capacidad competitiva.

En general, se observa una menor capacidad competitiva de estas 3 cepas en frijol Negro Jamapa, que en frijol BAT477. Esto podría deberse a que las bacterias nativas que se asocian a estas leguminosas están más relacionadas (adaptadas?) al Negro Jamapa que al BAT477, debido a que éste último es menormente sembrado en México. El hecho de que el frijol Negro Jamapa sea sembrado con mayor regularidad, podría dar como resultado, que existan más bacterias, en el suelo probado, que nodulan este frijol, de tal manera que, las bacterias inoculadas compiten con un mayor número de bacterias nativas en Negro Jamapa. Esto podría explicar las ligeras diferencias en competitividad. Dicha generalización se puede observar en los experimentos del NMP, donde se observa que existen más bacterias nativas en el suelo probado que nodulan Negro Jamapa que BAT477.

Sin embargo, desafortunadamente, estas mutantes tienen afectada su capacidad para poder fijar nitrógeno, son ineficientes, y se piensa que es debido a la misma mutación. Por lo tanto, el uso de estas cepas para inoculante agrícola, no podría de ninguna manera ser recomendado, por lo menos, de manera inmediata y con esta condición.

Es interesante mencionar que existe anteriormente la observación de que cepas de *Rhizobium Fix⁻*, son más competitivas. Esto se debe a que el amonio, aparte de ser el principal producto de la FBN, es el principal regulador de muchos estados de la simbiosis.

Los compuestos nitrogenados como el amonio cuando se adicionan en exceso disminuyen la nodulación, ya que reducen el número de los sitios infectivos y/o el número de infecciones sucesivas en las raíces primarias e inhiben el crecimiento del nódulo y su funcionalidad.

Además de que las plantas, en presencia de nódulos normales *Fix⁺*, inhiben la inducción posterior de nódulos en la raíz, se ha visto que cuando las plantas son inoculadas con rizobios *Fix⁻* forman un alto número de nódulos, en comparación con la nodulación normal, debido a que tiene lugar la reinfección de las raíces secundarias. De tal manera que, el amonio producido en el nódulo actúa localmente como un regulador positivo para el mantenimiento del nódulo y el simbiosoma (estructura que contiene a los bacteroides en el interior del nódulo), y a su vez, actúa como regulador negativo inhibiendo el proceso de reinfección.

¿Es posible que por mutación por transposición se pueda incrementar la capacidad competitiva en cepas de *R. etli*?

Para probar esto realizamos los experimentos de mutagénesis por transposición.

Las mutaciones constituyen la herramienta genética fundamental para establecer una correlación entre un gen, y un fenómeno afectado por la mutación de ese gen.

Una de las técnicas que se probaron en este trabajo para la adquisición de nuevas cepas bacterianas capaces de tener una mayor nodulación, fue la de mutagénesis al azar, utilizando un plásmido suicida que no se mantiene en *Rhizobium* y que porta un transposón con resistencia a antibióticos.

El transposón fue un Tn5-gusA, el cuál, por sus características mutagénicas, al in-

sertarse en el genoma de las cepas tipo, permitió que se generara un número alto de mutantes independientes, resultando un método importante para la adquisición de muchas mutantes diferentes, entre las cuales, varias de ellas tenían una mayor capacidad competitiva.

El establecimiento de una simbiosis de fijación de nitrógeno atmosférico entre bacteria (*Rhizobium*) y una leguminosa es un proceso complejo. La formación de nódulos es un proceso de etapas sucesivas, y cualquier paso que se vea afectado en mayor o menor medida, puede expresarse en una alteración en la capacidad competitiva, como ha sido demostrado por la existencia de bacterias mutantes y leguminosas que bloquean la nodulación en diferentes etapas de su desarrollo.

Perspectivas

Quedaría por establecer si es posible construir cepas de *Rhizobium etli* que sobreproduzcan las supuestas bacteriocinas, pero que no pierdan su habilidad para fijar nitrógeno, como nuestras mutantes.

En las mutantes adquiridas por transposición, y que tienen un incremento en competitividad en comparación con las parentales, quedaría por demostrar si estas mutantes son realmente competitivas en experimentos donde se compitan con bacterias silvestres, tal como los que realizamos en esta la primera parte de este trabajo para probar a las mutantes de *Rhizobium etli*.

De gran importancia es seguir con la búsqueda y aislamiento de bacterias de interés, en plantas y hábitats no estudiados.

Procurar la conservación de selvas, bosques..., para mantener la biodiversidad de especies y biovariedades de plantas, que a su vez, mantienen a los microorganismos del suelo.

0.8. Apéndices

0.8.1. Apéndice I. Genotipo y fenotipo de las cepas mutantes.

Cuadro 48: Genotipo y fenotipo de las cepas mutantes

Cepa	Genotipo	AB^r
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante FAJ4006	mutante cinI	$Nal^r Nm^r, Fix-$
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante FAJ1329	mutante raiR	$Nal^r Nm^r, Fix-$
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante BRH2	mutante polar nodH::gusKm	$Nal^r Km^r$
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante FAJ4010	mutante 8 rail	$Nal^r Sp^r, Fix-$
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante BRH1	mutante no polar nodH::gusKm	$Nal^r Km^r$
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512 mutante FAJ4007	mutante cinR	$Nal^r Nm^r$
CNPAF512	No determinado Wild type (tipo silvestre)	Nal^r Muy buena fijadora de nitrógeno Tolerante a altas temperaturas
PL41H	No determinado,	$Nal^r Nm^r$ Buena fijadora de nitrógeno
PL43C	No determinado,	$Nal^r Nm^r$ Buena fijadora de nitrógeno

0.8.2. Apéndice II. Zona de estudio.

Morelos.

Temochán es el lugar donde se establecieron los primeros grupos humanos, en lo que hoy conocemos como Morelos. Estuvo habitado por dos culturas: la Olmeca y la cultura del altiplano central. El estado libre y soberano de Morelos fue decretado el 16 de abril de 1869.

Morelos se ubica en la parte Central del país, en la vertiente sur del Ajusco, dentro de la cuenca del río Balsas, ocupando éste la mayor parte de la superficie del estado. Está accidentado sólo en el sector septentrional por la presencia de la Sierra del Ajusco. Morelos corresponde a las provincias Eje Neovolcánico Sierra Madre del Sur, con las subprovincias lagos y volcanes Anáhuac, sur de Puebla y sierras y valles guerrerenses (INEGI, 1995).

Colinda al norte con el D.F. y el Estado de México; al sur y sudoeste con Guerrero; al este y sureste con Puebla y al oeste con el Estado de México y Guerrero.

En el estado se distinguen fisiográficamente tres regiones diferentes: la montañosa del norte, la de los valles intermontanos y la montañosa del sur. La primera, formada por un gran valle dividido por una cordillera, da origen a dos porciones que son: Cuernavaca y Cuautla. Esta región se inicia en el pie de monte de la Serranía del Chichináutzin y llega hasta los cortes de pendientes al sur, presentando principalmente terrenos planos y algunos lomerios. En conjunto, esta parte del estado corresponde a la zona cálida.

Altitud. Varía desde los 4000m en los límites con el D.F., hasta los 850m en la parte de Huaxtla. Originalmente se encontraba cubierto por vegetación Selva Baja Caducifolia, actualmente, está limitada a unos pocos lomerios y cañadas. De acuerdo con el INEGI 1995 (Carta de climas 1:1'000,000), el 76.72 % de la superficie corresponde al subtipo cálido subhúmedo (parte sur) y 14.43 % al subtipo semicálido subhúmedo. A medida que aumenta la altitud hacia el norte, se vuelve semicálido y después templado en las laderas de la Sierra del Ajusco, semifrío entre los 2.800 y 4.000 metros, y frío en las cumbres del Popocatepetl. La precipitación está entre los 1000 y 1200mm al año (Monroy, et al., en Oswald, 1992)[9].

Los principales ríos son el Balsas, Amacuzac y Nexapa. En el estado predominan las rocas ígneas cuaternarias, mayoritariamente extrusivas, destacando los basaltos y las andesitas. Son comunes las rocas piroclásticas (arena y cenizas volcánicas). Rocas sedimentarias como calizas, conglomerados y lutitas cubren importantes regiones del estado. Las rocas metamórficas son escasas (Aguilar, 1990)[9].

Morelos tiene una superficie de 4.941 km² y una población de 1.552.878 habitantes (en 1990 había 281.294 habitantes), cuenta con 729 localidades en 33 municipios (2000). Las poblaciones más importantes son: Cuernavaca, Zacatepec, Jojutla de Juárez, Cuautla Morelos, Yautepec, Emiliano Zapata, Temixco, Tlaquiltenango y Puente de Ixtla[9].

Las actividades agrícolas y pecuarias de la región de los valles centrales de Morelos están vinculadas directamente con las características edafológicas y ecológicas del territorio. Los productos agrícolas principales son la caña de azúcar, arroz, sorgo, maíz, jitomate, algodón, cacahuete, cebolla, frijol, entre otros; y sus frutos: melón, aguacate, mango, limón agrio, papaya y plátano. Como producto de exportación están las flores y plantas de ornato. Las principales actividades están dadas por la industria automotriz,

de hilados, tejidos; además del turismo.

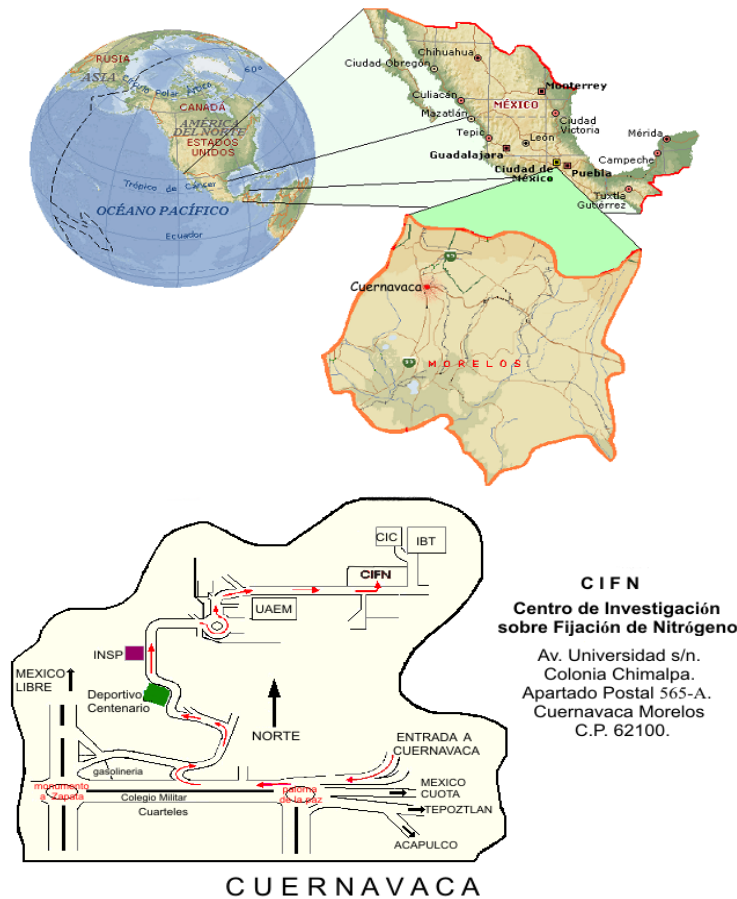
Cuernavaca.

Capital del estado de Morelos (Capital de México en 1855). Cuernavaca se ubica $19^{\circ} 07' 51''$, $18^{\circ} 20' 02''$ de latitud norte y $98^{\circ} 37' 21''$, $99^{\circ} 30' 21''$, de longitud oeste. Se encuentra al pie del Chichináyutzin que por su cubierta boscosa y su material superficial de origen volcánico, permite una gran captación y retención de agua[9].

Tiene un clima muy favorable, con escasas oscilaciones térmicas entre $17,5^{\circ}$ - $23,5^{\circ}\text{C}$, y una altitud de 1500m.

Al oriente y suroccidente de Cuernavaca existe un tipo de suelo denominado Feozems, el cual presenta un horizonte superficial oscuro, rico en materia orgánica. Se localiza en asociaciones de vegetación tropical seca, de cactáceas y de arbustos espinosos. Tienen gran capacidad para almacenar agua. Este tipo de suelo es el de mayor extensión en Morelos. También se presentan acrisoles en áreas con climas cálidos, con lluvias en verano, ligeramente húmedos y semihúmedos. Presentan bosques mixtos conservados, pastizales inducidos y agricultura de temporal[9].

Con una población de 327.162 habitantes (2000), cuenta con refinerías de azúcar, destilerías de alcohol y otras fábricas para actividades agropecuarias y manufactureras. Esta ciudad se ha convertido en uno de los principales centros turísticos del país[9].



0.8.3. Apéndice III. Esterilización de la superficie de la semilla, germinación y siembra.

Esterilización superficial de la semilla de frijol.

La esterilización de la superficie de la semilla de la leguminosa es dependiente de los propósitos y la naturaleza del experimento. Para la selección de cepas, la cuantificación del número más probable y para los experimentos de competencia, se requieren plantas de leguminosas que tengan su superficie perfectamente estéril, ya que deben de ser germinadas bajo un estricto control biológico. Por lo tanto, la esterilización de las semillas, así como de los nódulos, deben de realizarse dentro de una campana de flujo.

Frecuentemente los desinfectantes usados para la esterilización de semillas son soluciones de hipoclorito de sodio (2.5 % de blanqueador comercial), cloruro de mercurio (0.2 %), peróxido de hidrógeno (3 %), o ácido sulfúrico concentrado. Solamente las semillas que tienen una cobertura muy dura son tratadas con ácido sulfúrico concentrado, que ayuda al ablandamiento de la misma, ayudando así, a la esterilización efectiva. Las semillas tratadas con pesticidas o insecticidas deben de ser enjuagadas previamente con agua y secadas con papel o toallas absorbentes.

En la realización de este trabajo se utilizó una solución de hipoclorito de sodio para la esterilización de las semillas. Cuando se usa el peróxido de hidrógeno y cloruro de mercurio se sigue el mismo método, solo cambia la solución y la concentración de dicha solución.

1. Primero se escogieron las semillas, cuidando que no estuvieran dañadas de la testa y que tuvieran más o menos el mismo tamaño.

2. Se pusieron las semillas en una caja de Petri, o algún otro contenedor que se consideró conveniente (tal como un frasco de vidrio), que tuviera boca ancha, de un tamaño adecuado y que estuviera previamente esterilizado. Las semillas a esterilizar no debieron de haber ocupado un volumen máximo del 25 % del contenedor, debido a que, demasiadas semillas en un mismo contenedor pueden afectar la eficiencia de la esterilización.

3. Se le adicionó a las semillas una solución de etanol al 70 %, lo suficiente como para que quedaran todas perfectamente embebidas y se dejó durante 5 minutos, con la intención de remover el material ceroso de la superficie de la semilla, romper la tensión superficial y remover las burbujas de aire. De esta manera, se hace más efectiva la esterilización. Pasado este tiempo se decanta el alcohol.

4. Posteriormente, se le adicionó la solución de hipoclorito de sodio 1.5 % (v/v), también se puede usar cloruro de mercurio o peróxido de hidrógeno¹, en cantidad suficiente para poder sumergir las semillas completamente. Se agita el contenido suavemente para promover el contacto entre la semilla y el esterilizante. Después de 15 minutos se desecha el desinfectante. En el transcurso en el que está actuando el esterilizante, es común apreciar la aparición de frijoles dañados de la cobertura y que se les haya comenzado a meter la solución. Los frijoles dañados deben ser retirados con pinzas estériles y desechados.

Es importante que a la hora de comenzar a esterilizar las semillas, se pongan más de las que se piensan utilizar, por las que se echan a perder. La cantidad de semillas

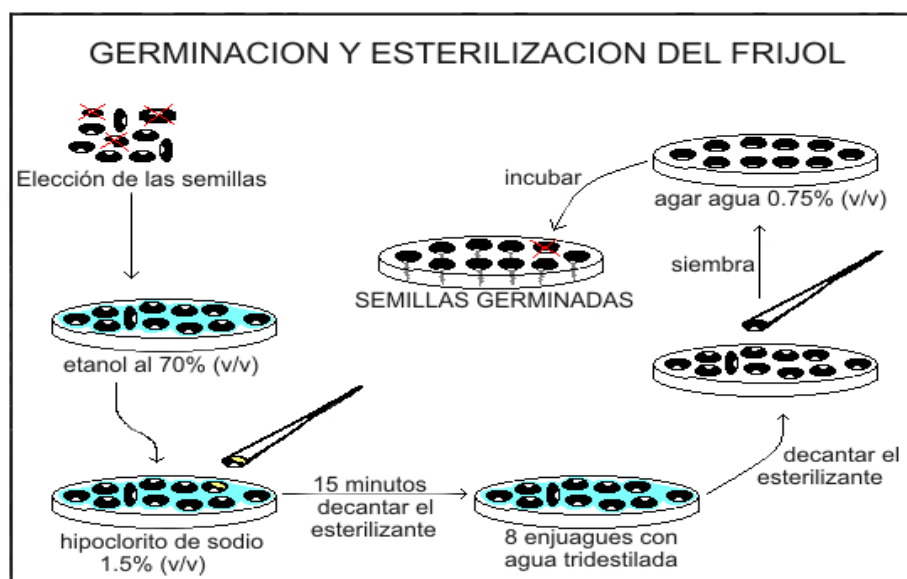
¹En el caso de que se use peróxido de hidrógeno como esterilizante, no son necesarias las enjuagadas con agua estéril.

que se pongan depende de la variedad de frijol, por ejemplo, en este trabajo, la variedad BAT477 era más resistente a la esterilización (aproximadamente entre el 80-90 %) en comparación con la Negro Jamapa (entre el 60-70 %), por lo tanto, debían de ponerse más frijoles para Negro Jamapa que para BAT477.

5. Se enjuagaron las semillas con un mínimo de 8 cambios de agua estéril tridestilada.

Germinación de las semillas de frijol.

Una vez que las semillas estuvieron bien enjuagadas, se colocaron de manera aseptica en una caja de Petri que contenía agar-agua al 0.75 % (p/v). Las semillas pudieron ser fácilmente transferidas fuera del contenedor para su germinación usando unas pinzas estériles. Eventualmente, se distribuyeron las semillas de frijol sobre la caja de Petri, aproximadamente entre unas 10-15 por caja.



Esterilización y germinación del frijol.

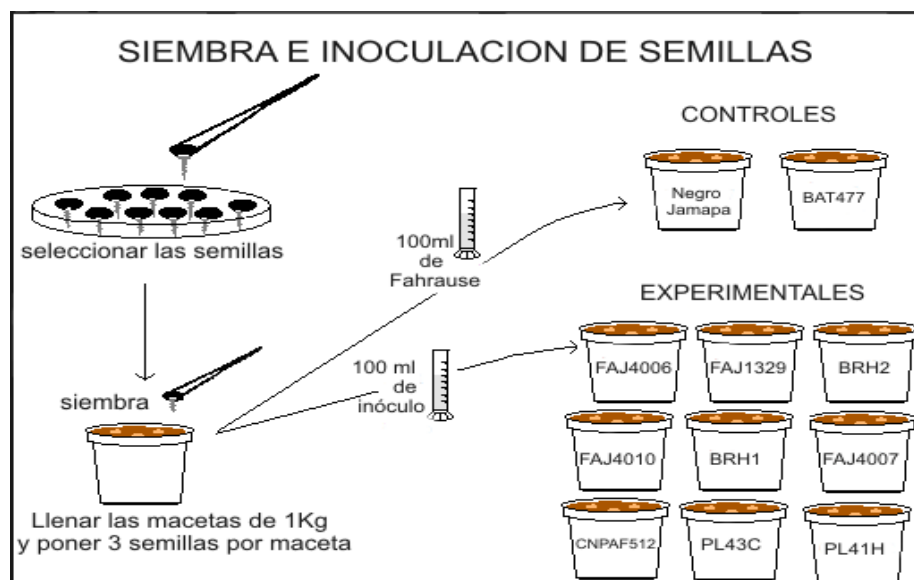
Se incubaron las cajas de manera invertida, alrededor de 48 horas, en una estufa a una temperatura de 30°C, en total oscuridad hasta que la raíz alcanzó una longitud aproximada entre 0.8-1.0cm.

Siembra de las semillas en tierra.

Ya que tenemos las semillas de frijol germinadas, listas para sembrar, se colectó la tierra que iba a ser utilizada para dicho propósito. Para este trabajo se utilizaron macetas de 1Kg, las cuales fueron llenadas completamente con tierra.

Cuando se tuvieron preparadas las macetas con la tierra, se hicieron tres hoyitos aproximadamente de 1cm de profundidad en la tierra de cada maceta. Se tomaron con mucho cuidado y con ayuda de unas pinzas, una a una, las semillas de frijol germinadas y se colocó una semilla en cada hoyito, después se cubrieron completamente con tierra. De este modo, se colocaron tres semillas por maceta, tratando que quedaran lo mejor

distribuidas, con la raíz hacia abajo y los cotiledones hacia arriba. Finalmente, se rotularon las macetas, se inocularon las semillas y se llevaron al invernadero.



Siembra e inoculación de las semillas.

Durante el tiempo que permanecieron en el invernadero el riego de las macetas era, por lo general, de 150ml de agua tridestilada por maceta, dos veces a la semana. Aunque los intervalos de tiempo y la cantidad adicionada de agua podían variar un poco dependiendo principalmente de la época de año y el tiempo que tenían las plantas de haber sido sembradas, siempre se procuró que fueran iguales para todo el lote de macetas y que eso no influyera en los resultados finales. Como en invierno casi no había evaporación el riego era menos frecuente. Además, las plantas que tenían alrededor de dos meses de edad demandaban más agua que cuando acababan de sembrarse. Asimismo, cada 15 días se regaban las macetas con solución Fahraeus (solución nutritiva libre de nitrógeno) en vez de agua.

Siembra de semillas en matraz.

Para hacer experimentos de nodulación en matraz, se prepararon primero los matraces de la siguiente manera: Se eligieron matraces Erlenmeyer de vidrio de 250ml perfectamente limpios, los necesarios. Posteriormente, se les introdujo con ayuda de unas pinzas 7.0g de algodón estéril, procurando que el algodón no quede muy apretado ya que sirve como soporte para las raíces de la planta. Después, se les adicionaron 170ml de solución Fahraeus, se les puso una tapa de aluminio, se sellaron perfectamente y se rotularon. Finalmente, se pusieron a esterilizar en la autoclave durante 20 minutos. Una vez que se enfriaron ya estaban listos para usarse.

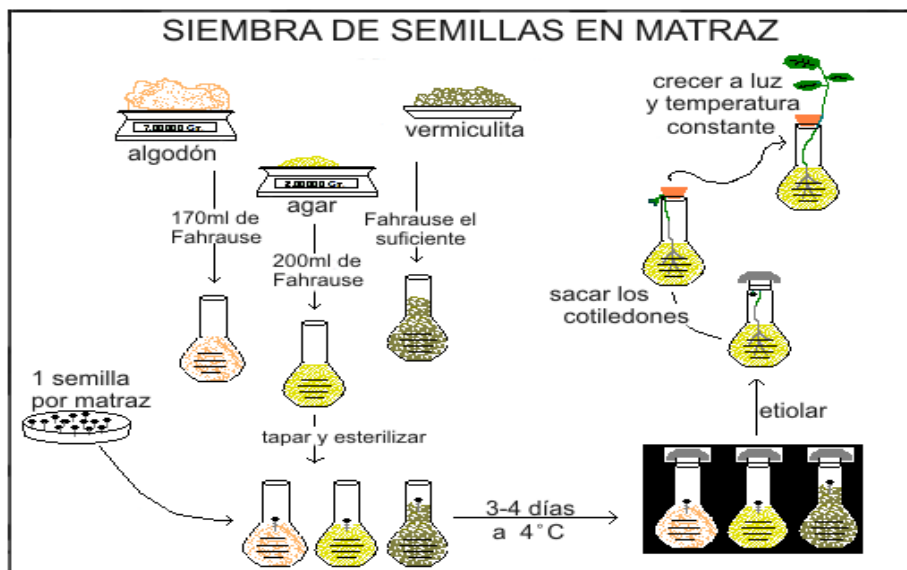
Para hacer los experimentos de nodulación, también se utilizó como soporte vermiculita o agar, en vez de algodón. En el caso de la vermiculita, se llenaron los matraces de vidrio con la vermiculita ya previamente lavada y seca, y después, se les adicionaron

solución Fahraeus, se taparon y esterilizaron. Para el caso del agar, se adicionaron a cada matraz 200ml de solución Fahraeus y 2.0g de agar, se agitaron hasta que se disolvió perfectamente el agar, se taparon los matraces y se esterilizaron.

Una vez que se tuvieron los matraces preparados, todo lo demás ya se debe de realizar en condiciones estériles.

Se destaparon los matraces, y con las pinzas se acomodaron las semillas de frijol previamente germinadas (sobre el algodón, vermiculita o gel de agar), procurando que la raíz quedara hacia abajo, nuevamente se taparon con el aluminio. Con mucho cuidado de que no se muevan las semillas, los matraces se transfirieron a un cuarto oscuro donde permanecieron alrededor de dos días, con la finalidad de que etiolaran (sobrecrecimiento del tallo) lo suficiente las plántulas, para que los cotiledones quedaran afuera del matraz.

Una vez que etiolaron las plántulas del frijol, se les quitó la tapa de aluminio, se acomodó la plántula de manera que los cotiledones queden por fuera y se les volvió a poner un tapón estéril de esponja. Por último, se forraron los matraces con plástico negro para evitar que a las raíces les de la luz, ya que son fotosensibles, y esto pudiera también afectar la nodulación. A continuación, se llevaron a un cuarto acondicionado con temperatura constante de 26°C, y con iluminación blanca e incandescente, con ciclos de 12hrs de luz y 12hrs de oscuridad, donde permanecieron todo el tiempo que duró el experimento.



Esterilización y germinación del frijol.

0.8.4. Apéndice IV. Colecta de los nódulos y recuperación de los bacteroides.

La distribución de los nódulos en las raíces, así como el tamaño y la forma, es dependiente de la especie de leguminosa y las cepas de *Rhizobium* que están infectándola, además de la estructura y la composición del suelo.

Un nódulo activo, capaz de fijar nitrógeno, contiene una proteína llamada leghemoglobina. Su presencia en el nódulo puede ser deducida a partir de una coloración rosa, roja o café, muy característica. Los nódulos activos también pueden ser de color negro, aunque estos no son muy comunes. Este tipo de nódulos ha sido reportado en *Lablab purpureus*, *Dolichos biflorus* y *Vigna unguiculata* cuando dichas plantas son inoculadas con algunas cepas de rizobia. Los nódulos senescentes son de un color verdoso. Cuando los nódulos en la superficie del suelo son expuestos a la luz del sol, ellos pueden desarrollar un color verde en la superficie, este color verde es debido al desarrollo de clorofila en la región cortical del nódulo. Muchos rizobia inefectivos producen nódulos con interiores blancos por la falta de leghemoglobina.



Nódulos fijadores de nitrógeno en raíces de frijol formados por la bacteria *Rhizobium etli* [7].

Recuperación de los nódulos de su leguminosa hospedera.

Para el aislamiento de los rizobia que se encontraban dentro de nódulos, primero se colectaron las plantas extrayéndolas del suelo o de los soportes (agar, vermiculita o algodón), y posteriormente se limpiaron las raíces removiéndoles la mayor cantidad de materiales a su alrededor con las manos, o bien, pueden ser lavadas con mucho cuidado procurando no dañar los nódulos. Se debe evitar despegar las raíces secundarias de las plantas, ya que los nódulos pueden ser encontrados en las raíces laterales. Una vez que se limpiaron perfectamente las raíces, se colectó una muestra determinada de nódulos por planta, generalmente diez, usando unas pinzas para reducir el riesgo de daño al nódulo. Para esto, se desprendieron los nódulos dejando aproximadamente 3mm de la raíz a la cual estaban sujetos, con el objeto de que no quedara el nódulo con alguna rasgadura y se contaminara su interior, ó que a la hora de esterilizar las soluciones entraran por esa parte. Los nódulos se fueron colocando en una caja de Petri de plástico o en un frasco pequeño de vidrio, para su posterior esterilización.

Esterilización de los nódulos.

Es importante mencionar antes de cualquier otra cosa, que todos los procedimientos para la esterilización, tanto de nódulos como de semillas, deben de realizarse dentro de una campana de flujo. Así mismo, todas las operaciones deben de llevarse a cabo cerca de

la flama del mechero. Además, se deben de estar enjuagando constantemente las manos con alcohol y secarlas al aire, para evitar contaminación del medio.

Cuando queremos esterilizar nódulos que fueron extraídos de la tierra es recomendable, antes de comenzar el proceso, dar varias enjuagadas con agua para quitar el exceso de tierra y hacer más eficiente la esterilización.

Durante la esterilización, se sumergieron dentro de un frasco ó caja de Petri los nódulos intactos (es decir, sin ningún daño), durante 2 minutos en etanol al 70 %, para romper la tensión superficial y remover las burbujas de aire presentes en el tejido. Posteriormente, se desechó el etanol y se añadió a los nódulos una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % (v/v), durante 7 minutos. Finalmente, se enjuagaron los nódulos con agua estéril 8 veces, dejándolos durante este procedimiento en el frasco ó la caja, sólo desechando el agua, ya sea por decantación, o con ayuda de una micropipeta y puntas estériles.

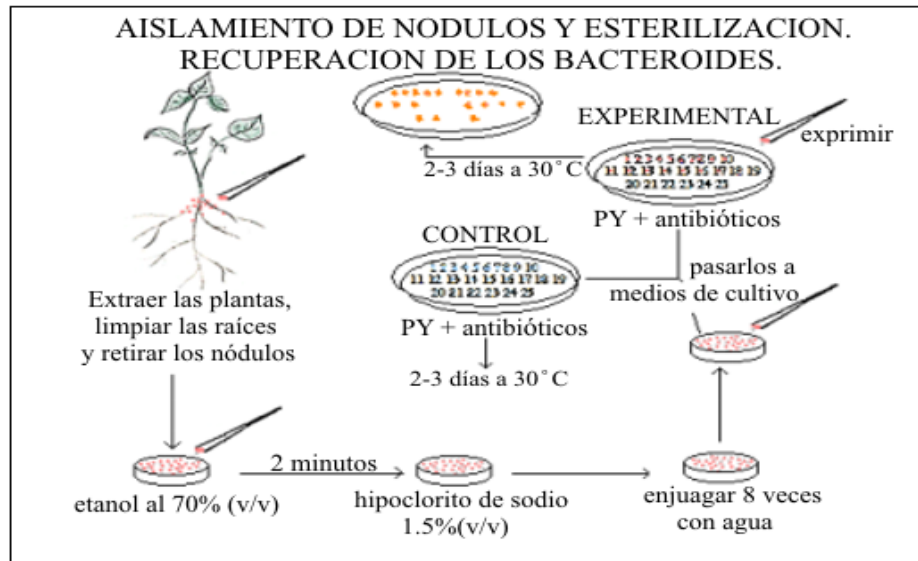
Para la esterilización de los nódulos también puede utilizarse una solución de cloruro de mercurio al 0.1 % (p/v) ó una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v). Sin embargo, la solución de cloruro de mercurio es altamente tóxica, y la solución de peróxido de hidrógeno es costosa, haciendo del hipoclorito de sodio (disponible como blanqueador comercial) la mejor opción. Cuando el peróxido de hidrógeno es usado, los cambios con agua estéril para enjuagar pueden ser omitidos.

Recuperación de los bacteroides del interior de los nódulos.

Para la recuperación de los bacteroides contenidos en el interior de los nódulos, previamente esterilizados de la superficie, primero se hizo una prueba de esterilización para cada nódulo. Esta prueba se realiza para constatar que la esterilización se llevó a cabo de manera efectiva y que los bacteroides que se aíslan posteriormente sean, efectivamente, del interior del nódulo y no de la superficie (ver más adelante prueba de esterilización). Después de ésta prueba se exprimieron los nódulos, uno por uno, con ayuda de unas pinzas estériles (las pinzas pueden ser esterilizadas de una manera rápida sumergiéndolas en alcohol y flameándolas), los bacteroides obtenidos de cada nódulo se fueron colocando por separado en cajas de Petri con medio PY sólido y con antibiótico *Ciclo*₁₀. Cabe mencionar, que las cepas de *Rhizobium* son de manera natural resistentes a la cicloheximida (*Ciclo*₁₀), no así los hongos que pudieron haber quedado en la superficie del nódulo después de la esterilización.

Se colocaron aproximadamente 50 nódulos por caja, con ayuda de una plantilla con números.

La prueba de esterilización de los nódulos esencialmente consta en colocar cada uno de los nódulos momentáneamente, antes de exprimirlos, en cajas de Petri con antibiótico *Ciclo*₁₀. Las cajas de Petri se dejan incubando en una estufa a 30°C y en la oscuridad. Después de 3 días se examina para ver si hay crecimiento de colonias típicas de *Rhizobium*. La idea es que no debe de haber ningún microorganismo en la superficie del nódulo, principalmente de *Rhizobium*.



Esterilización y germinación del frijol.

0.8.5. Apéndice V. Preparación del inoculante e inoculación.

La inoculación de las semillas se realiza incorporando una suspensión celular a una solución de Fahraeus (medio enriquecido libre de nitrógeno y carbono) y verterla a semillas previamente germinadas y sembradas.

Obtención del cultivo para la preparación del inoculante.

Con una asa bacteriológica estéril se tomó un poco del cultivo fresco de cada una de las cepas a inocular para estriarlo, por separado, en cajas con PY y antibióticos, de tal manera que, cuando crecieron, se observaron el crecimiento de colonias aisladas. Esto es, en unos tres días de estar a 30°C.

Con un asa bacteriológica se tomaron, una por una, las colonias aisladas que formaron las diferentes cepas y se estriaron de manera homogénea en otras cajas con PY y antibióticos correspondientes. El número de colonias estriadas por cepa dependió del número de macetas que se querían inocular. Se pusieron a crecer 3 colonias por separado (en 3 cajas), por cada 2 macetas que se querían inocular, dejándolas en una estufa a 30°C durante tres días. El contenido celular de esas cajas fue el que se utilizó para la inoculación.

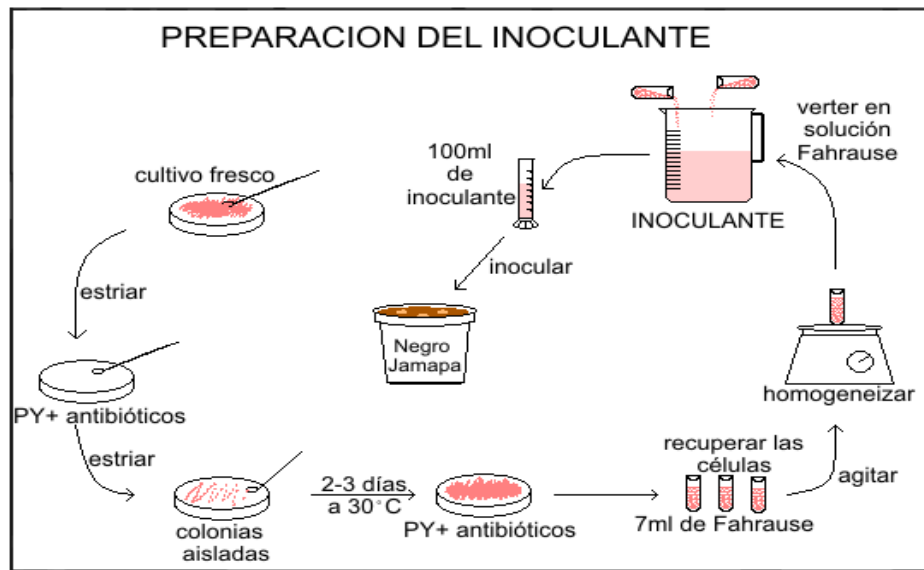
Obtención de la suspensión celular y preparación del inoculante.

Para la obtención del inoculante y de la suspensión celular, primero se preparó en una jarra solución Fahraeus (ver apéndice IV), 100ml por cada maceta que se iba a inocular.

Se tomaron 15 tubos medianos de ensayo estériles por cada cepa a inocular y se les adicionaron 7.0ml a cada uno de la solución Fahraeus estéril previamente preparada. Con ayuda de un asa bacteriológica o de vidrio, se fueron recuperando poco a poco todas las bacterias que habían crecido en las cajas que se iban a utilizar para inocular (descritas en el apartado anterior) y se fueron colocando en los tubos de ensayo, por separado. Se agitaron los tubos con ayuda de un vortex para obtener una suspensión celular homogénea.

El cultivo contenido en los 15 tubos (suspensión celular) de cada cepa se vierte en la jarra que contiene la solución Fahraeus restante. A continuación, se agitó perfectamente el contenido de la jarra para obtener un inoculante homogéneo. Finalmente, cada una de las macetas con sus tres semillas anteriormente germinadas y sembradas fueron inoculadas con 100ml de esta solución.

Aparte de las macetas que regamos con el inóculo, se prepararon un par de macetas de más que fueron usadas como control, y siempre regadas sólo con solución Fahraeus estéril.



Preparación del inoculante.

0.8.6. Apéndice VI. Preparación de medios de cultivo, soluciones nutritivas y antibióticos.

Medio LB (Luria-Bertani) para *Escherichia coli*:

.Tryptona	10g.
.Extracto de levadura	5g.
.NaCl	10g.
.Agua	cbp 1000ml.

Se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 1N. Si se desea en forma sólida, antes de meter el medio a la autoclave para esterilizar, se adicionan 15.0g de agar por cada litro de medio LB a preparar. *Escherichia coli* también puede crecer en PY.

Medio PY para cepas de *Rhizobium*:

.Peptona	5g.
.Extracto de levadura	3g
.Agua	cbp 1000ml

Se adicionan 15g de agar por litro de agua si se desea un medio sólido. Se esteriliza en la autoclave durante 20 minutos a 120°C. Una vez esterilizado, y cuando se vaya a usar, se le añade 1ml de una solución de calcio por cada 100ml de medio. La producción de exopolisacáridos en bacterias crecidas en este medio es limitada, lo que facilita su utilización en diversos tipos de ensayos bioquímicos y genéticos.

Solución de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$):

Para ello se ponen 10.47g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y se llevan a 100ml con agua tridestilada. Se esteriliza.

Medio Fahraeus libre de N y C (Fahraeus, 1957) para inocular y regar las plantas de frijol: Las soluciones a partir de las cuales se compone la solución Fahraeus se preparan de la siguiente manera:

. $CaCl_2$	10.0g/L de agua.
. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	12.0g/L de agua
. KH_2PO_4	10.0g/L litro de agua
. $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$	15.0g/L de agua
.Citrato Férrico	0.5g/L de agua

Solución *stock* de elementos traza:

. H_3BO_3	2.86g
. $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2.03g
. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.22g
. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.08g
. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.14g
.Agua Tridestilada	cbp 1000ml

Para la preparación de 1000ml de solución Fahraeus: Se mezcla 1ml de la solución de los elementos traza con 10ml de cada una de las demás soluciones y se llevan a 1000ml con agua tridestilada. Se ajusta el pH a 6.8-7.0 con NaOH. Finalmente se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

Medio agar-agua al 0.75 % para la germinación de las semillas:

.Agar 7.5g
.Agua Tridestilada cbp 1000ml

Se disuelve en un matraz el agar en agua y se esteriliza a 120°C por 20 minutos.

Antibióticos y su preparación.

Un antibiótico es cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos (del griego *anti*, “contra”; *bios*, “vida”). En un principio, el término sólo se utilizaba para referirse a los compuestos orgánicos producidos por bacterias u hongos que resultaban tóxicos para otros microorganismos. En la actualidad también se emplea para denominar compuestos sintéticos o semisintéticos.

Alexander Fleming en 1928 descubrió el efecto de la penicilina aunque nunca pudo aislar esa sustancia, tuvieron que pasar varios años para que se identificara. Se le llamó penicilina por el nombre del hongo que la produce: *Penicillium notatum*.

El éxito que tuvo la penicilina, hizo que se iniciara una gran búsqueda de organismos, especialmente del suelo, que produjeran antibióticos. En 1943 se descubre la estreptomycin, producida por la bacteria filiforme *Streptomyces griseus*.

Cuadro 49: Mecanismos de acción y clasificación de los antibióticos [24].

Bactericidas
.B-lactámicos (penicilinas y cafalosporinas).
.Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina).
.Aminoglucósidos (grupo estreptomycin).
.Quinolonas (grupo norfloxacin).
.Polimixinas.
Bacteriostáticos
.Macrólidos.
.Tetraciclinas.
.Cloramfenicol.
.Clindamicina, Lincomicina.
.Sulfamidas.

Los antibióticos pueden lesionar selectivamente la membrana celular en algunas especies de organismos; también, pueden bloquear la síntesis de diferentes compuestos celulares, importantes como el DNA, el RNA, los ribosomas y las proteínas.

Los antibióticos se pueden dividir en bactericidas (eliminan a las bacterias) y bacteriostáticos (bloquean el crecimiento y la multiplicación de las células). Estos últimos resultan eficaces, ya que, las bacterias morirán después de cierto tiempo, o bien, serán atacadas y aniquiladas por los mecanismos naturales de defensa del huésped.

El ácido nalidíxico es un bactericida, es del grupo de las quinolonas de segunda generación. La estreptomycin, kanamicina, neomicina, así como la amikacina, gentamicina, tobramicina, paramomicina y la aminosidina son aminoglucósidos (antibióticos formados

por glucósidos con 2 o 3 azúcares aminados), por lo tanto, son también bactericidas.

Preparación de antibióticos para los medios de cultivo:

.Cicloheximida (*Ciclo*₁₀): 10mg de cicloheximida/ml H_2O .

.Ácido nalidíxico (*Nal*₂₀): 20mg de ac. nalidíxico/ml.

.NaOH Neomicina (*Nm*₆₀): 60mg de neomicina/ml H_2O .

.Estreptomina (*Sp*₆₀): 60mg de estreptomina/ml H_2O .

Para preparar los antibióticos se pesa en una balanza analítica el antibiótico. Se mezcla con el agua o el disolvente correspondiente y se homogeniza la solución en un agitador o vortex. Como los antibióticos son muy sensibles al calor, no se pueden esterilizar en una autoclave, para esterilizarlos necesitamos hacerlo por filtración con *millipore*. En la punta de una jeringa se coloca un filtro que va a contener una membrana con poros de 0.22μ , al hacer pasar la solución por dicha membrana, se eliminan hongos y bacterias (Bergmeyer, 1965; Burns, 1978). Mientras no se utilice la solución debe de estar guardada en el refrigerador a $4^{\circ}C$ o a $-20^{\circ}C$.

La manera de añadir los antibióticos al medio de cultivo, es poniendo 0.1ml de solución por cada 100ml de medio.



Preparación de antibióticos.

Preservación de las cepas en una solución de glicerol al 30 % (v/v).

Para no estar resembrando continuamente las cepas que se utilizaron en el experimento mientras no se necesitaban, se guardaron a $-70^{\circ}C$, ya que a esta temperatura, el metabolismo de las bacterias disminuye y no crecen.

Como el glicerol es un crioprotector, cuando a las células las exponemos a temperaturas muy bajas ($-70^{\circ}C$), su integridad no se ve en peligro. El glicerol evita que el medio intercelular se congele y forme cristales de hielo, lo que provocaría la ruptura de

membranas, y por tanto, muerte celular.

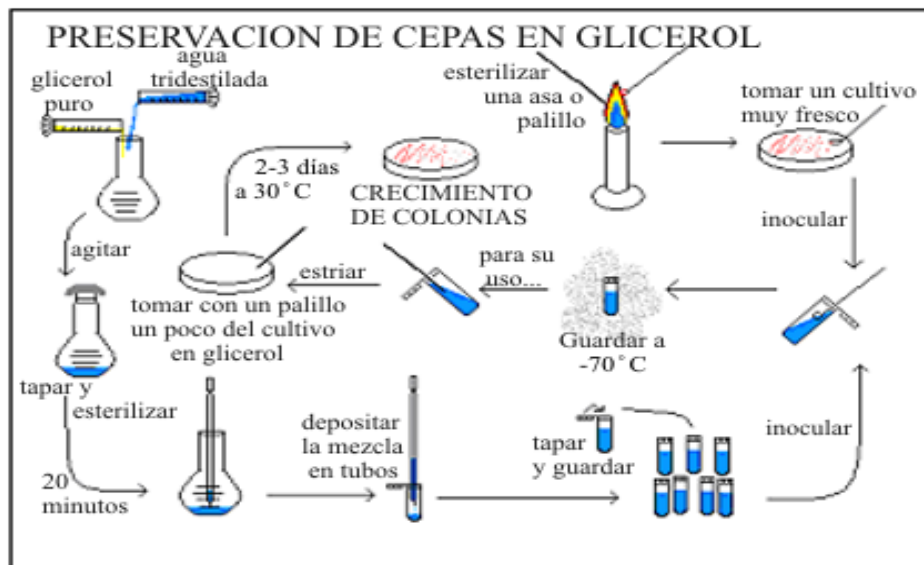
Para esto, se preparó una solución de glicerol al 30% (v/v) de la siguiente manera: En una probeta de 250ml, se colocaron 30ml de glicerol puro. Posteriormente se les añadieron 70ml de agua tridestilada. Se agitó la mezcla perfectamente y se colocó en un matraz de 250ml. Se le puso un tapón de algodón, se cerró perfectamente para después cubrirse con papel aluminio. A continuación, se metió a esterilizar durante 20 minutos en la autoclave.

Una vez esterilizada la solución, en un ambiente aséptico, se destapó el matraz y se fueron tomando con una micropipeta 1ml de la solución, y fue depositada en tubos eppendorf previamente esterilizados, de 1.5ml; O bien, 0.3ml en tubos de 0.5 mililitros. La solución que no se utilizó en ese momento se guardó en un refrigerador, para que se pudiera disponer de ella cuando se requiera, solamente hubo que esterilizarla de nuevo.

Posteriormente, se tomaron con ayuda de un asa bacteriológica, unas cuantas células del cultivo que se deseaban preservar y se deposita en los tubos eppendorf con la solución del glicerol. Es muy importante que el cultivo a preservar sea fresco, es decir, que se encuentre en la fase exponencial de su crecimiento.

Finalmente, se cierran muy bien los tubos, se rotulan y se ponen en un contenedor a -70°C .

Cuando se quisieron disponer de las bacterias, pasado un tiempo, lo primero que se hizo fue sacar del congelador los tubos con las diferentes cepas y tomar una pequeña muestra de la suspensión bacteriana, ya sea con una punta de plástico de una micropipeta ó con una asa bacteriológica estéril. Esa muestra fue depositada inmediatamente y esparcida en un medio de cultivo con antibióticos adecuados, contenido en las cajas de Petri. Posteriormente, se colocaron las cajas en una estufa a 30°C y se dejaron crecer alrededor de 3 días. Después de ese tiempo, se puede observar crecimiento bacteriano sobre el medio.



Preparación de células en glicerol.

0.8.7. Apéndice VII. electroforesis.

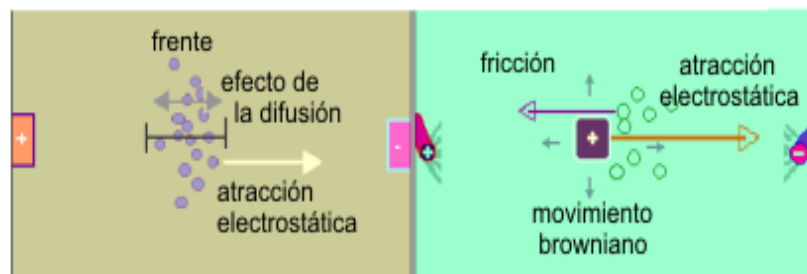
Existen diferentes técnicas de tipificación de rizobios gracias a que ellos tienen ciertas características particulares que nos ayudan a su identificación. Uno de los métodos, aunque poco específico, es la Tinción de Gram, ya que las bacterias del género *Rhizobium* son Gram negativas, con este método podemos eliminar a las Gram positivas. Otra forma de realizar su identificación es por su velocidad de crecimiento, *Rhizobium* es de crecimiento rápido, en comparación con *Bradyrhizobium*, de crecimiento lento. Es posible distinguir entre diferentes cepas de *Rhizobium* de acuerdo a su sensibilidad a varios fagos de diverso origen, o por métodos serológicos, o bien, a través de grupos de inoculación, gracias a que las diferentes cepas de *Rhizobium* pueden ser agrupadas de acuerdo a la especie de leguminosa que nodulan. Existe un método muy rápido para la identificación de cepas de *Rhizobium*: a través del aislamiento, determinación y estudio de plásmidos separados por electroforesis.

Introducción.

La palabra electroforesis proviene de la palabra griega “*phoresis*”= translación o desplazamiento, por electricidad. Ésta técnica nos permite el estudio del comportamiento de los iones, partículas o moléculas cargadas, cuando están bajo la acción de un campo eléctrico. En la actualidad, es el principal método de separación y análisis (caracterización y ensayo de pureza) de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, que toma en cuenta principalmente su carga eléctrica, aunque también algunas otras características, tales como, peso molecular, tamaño, forma y estructura secundaria.

La técnica es de gran importancia, ya que, permite hacer análisis moleculares dentro de diversas disciplinas, no es costosa, el aparato puede ser de construcción manual y los tiempos de corrimiento comúnmente son cortos. Así mismo, permite dividir e identificar una gran variedad de muestras del orden de microgramos, desde péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, glicoproteínas, lipoproteínas, enzimas, hormonas, vitaminas, hasta materiales radiactivos, entre otros.

Principio fisicoquímico.



Fuerzas presentes en un corrimiento de electroforesis [8].

Cualquier partícula cargada, al ser colocada bajo un campo eléctrico, migra por el principio de la atracción de cargas opuestas. Las proteínas, por ejemplo, están formadas

por aminoácidos, que están cargados eléctricamente, por lo que se desplazan en presencia de un campo eléctrico. Como resultado de la migración, se separarán en bandas o zonas que contienen moléculas con idéntica velocidad de migración y se distribuyen al pasar a través de una matriz o un solvente.

Electroforesis de ácidos nucleicos.

Durante los primeros años de la década de 1970 se descubrió que se podía determinar con exactitud la longitud y la pureza de las moléculas de DNA aplicando los mismos métodos de electroforesis en gel utilizados para el análisis de las cadenas proteicas. Actualmente este proceso es más sencillo que el utilizado para proteínas, dado que, en las moléculas de ácido nucleico cada nucleótido presenta una sola carga negativa que se la confiere su grupo fosfato.

Para separar fragmentos de DNA de diferente tamaño, que van de 100 a 60.000pb, se usan soportes semisólidos como geles de agarosa y poliacrilamida. Para fragmentos de DNA menores de 500 nucleótidos, se usan los geles de poliacrilamida.

En esta técnica, la muestra que se desea analizar se coloca en un extremo del gel, y al pasar una corriente eléctrica, se genera una diferencia de potencial. Debido a que la carga neta de los ácidos nucleicos es negativa, éstos migrarán a través del soporte (gel) hacia el ánodo o polo positivo, y su movimiento depende principalmente de su tamaño, conformación molecular, composición de bases, corriente aplicada al gel y porosidad, además, de la temperatura.

Un método sensible de tinción de ADN consiste en sumergir el gel, después de la electroforesis, en el colorante bromuro de etidio. Cuando se une al ADN, puede visualizarse mediante su exposición a la luz ultravioleta. Otro método de detección más sensible consiste en la incorporación de radioisótopos (P^{32}) a los fosfatos del ADN; que posteriormente se detectan por autorradiografía.

La técnica de Eckhardt. Una variación de la electroforesis para la obtención de plásmidos de gran tamaño.

La presencia o ausencia de moléculas de plásmido pueden usarse para diferenciar entre cepas bacterianas. Aunque es muy difícil definir un plásmido, en general, son moléculas de ADN extracromosomales, no esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos. Cada especie bacteriana tiene un número definido de plásmidos, los cuales, forman un patrón característico al correrlos en un gel de electroforesis, ya que, cada uno tiene un tamaño y peso molecular que condicionan su movilidad. La comparación de dicho patrón con los marcadores de peso molecular (o estándares de masa conocida) nos da una estimación de su peso. La técnica de Eckhardt es una variante de la electroforesis, con ella podemos detectar, identificar y caracterizar, de manera rápida y fácil, los patrones plasmídicos de las bacterias.

Este método (descrito originalmente por Eckhardt, 1978; y modificado por Rosenberg et al, 1982) permite una identificación rápida y relativamente económica del contenido de plásmidos de una pequeña cantidad de células. Más aún, los plásmidos de gran tamaño pueden ser detectados. En esta técnica, las células se lisan en los pozos directamente, una vez que las muestras con las bacterias ya fueron depositadas. Gracias a esto, los

plásmidos pueden ser obtenidos íntegros, y corridos en la matriz gelificada, sin que se rompan por los procesos convencionales de purificación.

Los plásmidos aislados pueden servir como marcadores específicos, ya que algunos tienen la habilidad de mantenerse estables dentro de una cepa bacteriana determinada, y “marcan o caracterizan” una cepa, esto es muy útil para los estudios de competitividad.

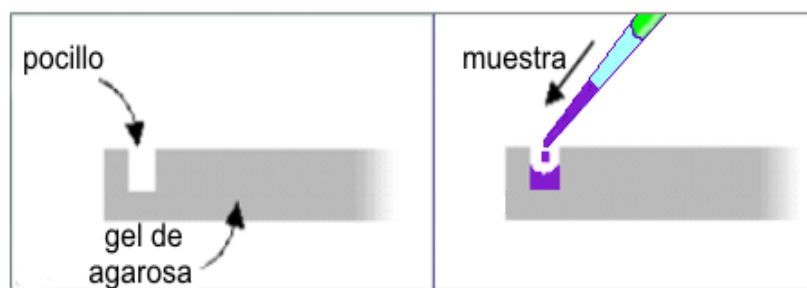
Esta técnica es muy utilizada para hacer estudios de diversidad bacteriana, o como en este caso, para identificar a diferentes especies bacterianas e incluso a cepas.

Protocolo de la técnica de Eckhardt.

Para la preparación de los geles se ponen en un matraz Erlenmeyer de 250ml, 90ml de una solución Tris-boratos 1X con 0.7g de agarosa Sigma tipo I. Enseguida, se agita la mezcla y se le coloca un tapón de algodón. Posteriormente, se calienta hasta que queda perfectamente disuelta y fundida, se sigue agitando nuevamente hasta que esté tibia y se le adicionan 10ml de detergente SDS en solución. En una charola (molde especial para electroforesis) se vierte la agarosa e inmediatamente después se le coloca un peine para electroforesis, cuya función es la de formar los pozos en donde va a depositarse la muestra. Se deja enfriar la agarosa hasta que gelifique por completo.

La agarosa es un polisacárido originalmente obtenido de algas, como el agar, pero de composición más homogénea, posee la propiedad de permanecer líquida a temperaturas por encima de los 50°C aproximadamente y formar un gel al enfriarse. Dicho gel está constituido por una trama tridimensional de fibras poliméricas, que embebidas en una gran cantidad de medio líquido (amortiguador en este caso) retarda el paso de las moléculas del ácido nucleico.

Mientras se espera que gelifique la agarosa, se prepara la cámara para electroforesis. Se conectan los dos polos de la cámara por medio de unos cables, a una fuente de voltaje. Además, se preparan 1800ml de amortiguador (una solución de Tris-boratos 1X), que una vez listo, se deposita en la cámara. Cuando la agarosa está lista, se le quita el peine con sumo cuidado para no romper los pozos, y se sumerge en el amortiguador contenido en la cámara. La intención de depositar la muestra en pozos, es que ésta se vea obligada a pasar por el seno del gel y no por encima, cuando se aplique el campo eléctrico.



Colocación de la muestra dentro del gel [10].

Antes de hacer los geles y preparar el material para la electroforesis, se ponen a crecer en un medio de cultivo líquido las cepas que se van a caracterizar. Para esto, en tubos de ensaye, se colocan 3ml de PY líquido con calcio y antibióticos (excepto en los

que se van a poner las cepas control CNPAF512, CIAT899 y CFN42). Se toman con un asa bacteriológica unas cuantas células, a partir de una caja de Petri con un cultivo muy fresco de bacterias, y se colocan en los tubos correspondientes. Se dejan crecer aproximadamente unas seis horas, hasta que llegan a media fase exponencial. Al pasar este tiempo, el contenido de los tubos se ve un poco turbio. Es importante poner aparte de las cepas que queremos caracterizar y las cepas control, otros tubos que contengan solo el medio de cultivo, para hacer una prueba de esterilización del medio.

Una vez que las bacterias de los tubos ya se han multiplicado lo suficiente, se toman 0.2ml de cultivo de cada tubo y se depositan por separado, en tubos eppendorf de 1.5ml previamente esterilizados. Posteriormente se le añade a cada tubo 0.8ml de solución Sarkosil 0.3 % en TBE.

Los tubos se tapan muy bien y se agitan suavemente para homogeneizar la muestra. Posteriormente, se centrifugan durante 40 segundos en una microcentrífuga a 13,000rpm. Se decanta el sobrenadante de los tubos, se secan con una toalla absorbente, con mucho cuidado de que no se salga la pastilla que se formó en la base del tubo debido a la sedimentación de las células.

Con una micropipeta se toman 20 μ l de solución E1 con lisozima, y se adicionan, por separado, a los tubos eppendorf que contienen las pastillas. Se disuelve en ésta solución la pastilla, bajando y subiendo por tres ocasiones el contenido con la punta de la micropipeta. Se hace lo mismo para todos los tubos, cambiando de punta cada vez que se pase a otro tubo. Enseguida, son depositadas las muestras en los pozos del gel, con cuidado de que no se salga la muestra.

Una vez colocadas todas las muestras en el gel, se prende la fuente de voltaje y se deja pasar a través de la cámara una corriente de 5 volts, durante 30 minutos. Después a 70 volts durante 9.5 horas.

Pasadas las diez horas de corrimiento, se saca el gel cuidando que no se rompa, pues es muy frágil, y se coloca en una charola de plástico. Se enjuaga dos veces con agua tridestilada. Posteriormente, se le adiciona una solución acuosa del colorante bromuro de etidio y se deja en agitación por unos cinco minutos. Después se saca de esta solución, se pone en agua y se agita durante 5 minutos para eliminar el exceso de colorante, se tira el agua y se vuelve a enjuagar por otros 5 minutos.

Finalmente, se toma el gel y se coloca en una cámara de luz ultravioleta. Este tipo de luz nos permite observar el patrón de bandas que resulta por el corrimiento. Se saca una foto. Y si es necesario, se guarda el gel para su posterior transferencia a membranas de nailon.

Soluciones para la técnica de Eckhardt.

Preparación de la agarosa al 0.7 %:

.Agarosa	0.7g
.Amortiguador TBE1X	90ml
.Detergente SDS al 10 %	10ml

Se colocan 0.7g de agarosa en 90ml de TBE 1X, contenidos en un matraz Erlenmeyer, y se agitan. Se calienta hasta que esté perfectamente fundida la agarosa. Posteriormente, se enfría un poco para añadirle los 10ml de solución SDS al 10 %.

Amortiguador TBE 10X (Tris-boratos 1X):

.Tris-Base	108g
. $Na_2EDTA.2H_2O$	9.3g
.ácido Bórico (H_3BO_3)	55g
.Agua destilada	cbp 1000ml

Se mezclan todos los reactivos en 800ml de agua destilada. Se ajusta el pH a 8.3 con HCl. Se ajusta el volumen final de 1000ml con agua tridestilada. Para obtener TBE 1X, se hace una dilución 1:10.

Preparación de una solución de detergente SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) al 10 %:

.SDS 10 %	10g
.TBE 1X	cbp 100ml

Se mezclan perfectamente los 10g de detergente en el amortiguador TBE 1X. Esta solución es muy importante ya que favorece la solubilización de las membranas bacterianas, especialmente para Gram-.

Solución de Sarkosil 0.3 %:

.N-Lauroylsarcosine	0.3g
.Agua	cbp 100ml

Se mezcla el reactivo en el agua. Esterilizar en autoclave. Guardar en el refrigerador. Esta solución remueve parcialmente el mucus y afecta la permeabilidad de la membrana externa.

Solución E1:

.Sacarosa	1g
.ARNasa	2mg
.Lisozima	0.006g
.TBE 1X	cbp 10ml

Primero se prepara una solución de sacarosa al 10 %. Para esto se coloca 1.0g de sacarosa y se le añade TBE 1X hasta llegar a los 10ml, se agita perfectamente. Finalmente se le añaden 0.2mg de ARNasa (para la degradación del ARN de las muestras) por cada mililitro de solución preparada. Cuando se vaya a utilizar la solución, se le agrega la lisozima, poniendo 0.0006g por cada ml de solución que se vaya a emplear.

Solución *stock* de bromuro de etidio:

Se adiciona 0.1g de bromuro de etidio a 10ml de agua destilada. Se agita hasta disolver en la oscuridad o en un lugar donde el ambiente tenga luz difusa. Se guarda bajo refrigeración. Para preparar una solución y teñir los geles de electrofóresis, se adicionan 100 μ l de la solución *stock* por cada 100ml de solución Tris Boratos 1X (TBE 1X). Se debe de tener precaución cuando se trabaja con bromuro de etidio, ya que es un poderoso agente mutagénico. Es indispensable el uso de guantes.

0.8.8. Apéndice VIII. Southern blotting.

Introducción.

Southern blotting es una de las técnicas centrales de la Biología Molecular y puede servir como preludeo para otras técnicas, tal como RFLP (Polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción). A la primera persona que se le ocurrió la idea de esta técnica fue a E. M. Southern en 1975. En esencia, el Southern blotting es un método para la detección de un fragmento específico de restricción, dentro de un grupo de muchos otros fragmentos.

La técnica del Southern blotting es el resultado de la transferencia por capilaridad de moléculas de DNA, generalmente fragmentos de restricción, de un gel de electroforesis (aunque también se puede realizar en solución) a una membrana. En él, los fragmentos de ADN separados en geles de agarosa o acrilamida, que forman patrones de bandas, son transferidos y fijados en una membrana de nitrocelulosa o nailon, lo cual, permite obtener una réplica exacta del gel.

Es necesario separar las dos hebras de ADN en el filtro antes de pasar al proceso de hibridación, lo que se consigue exponiendo el ADN a un tratamiento químico en condiciones alcalinas desnaturizantes. Estas hebras son usadas como sustrato para el análisis de hibridación, exponiéndolas, en condiciones adecuadas y durante algún tiempo, a sondas de DNA o RNA, marcadas enzimática o radiactivamente, que se unen de manera específica a los fragmentos de restricción de la membrana. Posteriormente, la membrana es lavada intensamente, de forma que sólo aquellas moléculas de ADN que están inmovilizadas en el filtro y que están hibridizadas con la sonda, aparecen como bandas marcadas en la membrana.

Principios del Southern Blot.

Una de las características más importantes de la doble cadena de DNA es su complementariedad de bases. La doble hélice de ADN está formada por dos cadenas antiparalelas en donde las bases nitrogenadas están apareadas, de tal forma que, una adenina (A) está siempre frente a una timina (T), y una citosina (C) frente a una guanina (G). La unión entre las bases se establece mediante puentes de hidrógeno, 2 en el par AT y 3 en el par GC, que confieren a la hélice una alta estabilidad. Experimentalmente se pueden separar estas dos cadenas, mediante un proceso que se denomina desnaturización, aplicando energía en forma de calor, rompiendo los enlaces químicamente o disminuyendo la concentración salina. En muchos casos, modificando estos parámetros en sentido inverso, podemos renaturalizar las dos moléculas de cadena sencilla y obtener nuevamente la cadena doble.

Si calentamos una solución acuosa de DNA a 100°C o la exponemos a un pH muy alto (≥ 13), las bases complementarias que la conforman se rompen disociando a las dos hebras complementarias que, normalmente unidas entre sí, forman una doble hélice. Durante muchos años se creyó que este proceso llamado de desnaturización era irreversible. Sin embargo en año de 1961 se descubrió que si se mantienen las hebras complementarias de DNA a 65°C durante un periodo prolongado, forman de nuevo una doble hélice, este proceso fue denominado renaturalización o hibridación del ADN. Estas reacciones de

hibridación son producidas entre dos cadenas cualesquiera de ácido nucleico de una sola hebra (ADN:ADN, ARN:ARN, ADN:ARN) siempre y cuando ambas cadenas tengan una secuencia de nucleótidos complementaria [35].

La velocidad de formación de la doble hélice está limitada por la velocidad a la que colisionan las dos cadenas complementarias de ácido nucleico, la cual depende de la concentración de las cadenas en solución. Por lo tanto, la velocidad de hibridación puede utilizarse para determinar la concentración de cualquier secuencia determinada de ADN o ARN en el seno de una mezcla de otras secuencias. Este tipo de ensayo requiere un fragmento puro de una cadena sencilla de DNA cuya secuencia sea complementaria a la del ácido nucleico (ADN o ARN) que se desee detectar. El fragmento de ADN debe de estar marcado (mediante radioisótopo o por un método químico) de modo que durante el curso de la reacción de hibridación se pueda seguir su incorporación para formar moléculas de doble cadena. La molécula de ADN de cadena sencilla utilizada de esta forma, como indicador, se denomina sonda de ADN (*probe*); una sola sonda de ADN puede comprender desde 5 hasta miles de nucleótidos de longitud [35].

La habilidad de la nitrocelulosa para unir moléculas de DNA ha sido bien conocida desde hace mucho tiempo y fue utilizada durante las décadas de los 50s y los 60s del siglo pasado, en varios estudios de hibridación de ácidos nucleicos. La introducción de las técnicas de electroforesis en gel a principios de los 70s, donde los fragmentos de restricción de DNA eran separados, propició el desarrollo de técnicas para la transferencia de fragmentos separados en gel, a soportes de nitrocelulosa. El procedimiento descrito por Southern en 1975, involucraba la transferencia capilar de DNA de un gel, a una capa de nitrocelulosa puesta encima, de una manera simple y efectiva. Aunque se ha ido modificando esta técnica con el transcurso de los años, solo ha sido ligeramente.

En el Southern Blotting se presenta una acción capilar sobre el amortiguador, producida por el papel filtro, el gel, la membrana y las toallas de papel. El amortiguador pasa a través del gel y los fragmentos de DNA son arrastrados hacia la membrana, donde se unen. Una transferencia efectiva de fragmentos de un tamaño arriba de 15Kb es efectiva aproximadamente en unas 18 horas, o lo equivalente a “*overnight*”.

Las modificaciones que se han realizado a esta técnica desde su inicio han sido principalmente para incrementar la eficiencia de transferencia del DNA a la membrana. La principal que se ha hecho es la introducción de membranas de nailon, las cuales tiene varias ventajas sobre la nitrocelulosa. Primero, bajo ciertas condiciones, el DNA puede formar enlaces covalentes con la membrana; esto no pasa con la nitrocelulosa, que desde el principio forma enlaces semipermanentes, y la inmovilización ocurre solamente cuando la membrana es sometida a 80°C, además, pierden eficiencia con el tiempo, pero pueden ser reactivadas hirviéndolas durante 10 minutos en agua. Segundo, con el uso de membranas de nailon el tiempo de transferencia puede ser reducido de 18 a 2 horas. Tercero, son menos frágiles.

Finalmente, las membranas de nailon se unen de manera más eficiente a los fragmentos de DNA menores de 50pb de longitud, donde las de nitrocelulosa son efectivas solamente con moléculas mayores a 500pb. Sin embargo, las membranas de nitrocelulosa no han sido descartadas totalmente, debido a que, tienen una ventaja significativa: una reducida cantidad de hibridación de fondo denominada “*background*”, especialmente con sondas que han sido bañadas con marcadores radiactivos. Existen membranas de nitro-

celulosa y nailon de distintas calidades y el protocolo de hibridación depende del tipo de membrana a utilizar.

Otras de las modificaciones que se han hecho son para incrementar la velocidad y la eficiencia de la transferencia, tales como cambiar la arquitectura del sistema capilar, pero estos arreglos alternativos son muy complicados y no proporcionan una mayor velocidad o eficiencia significativa del proceso. Se ha registrado el uso de transferencia no capilar, tal como, el “*electroblotting*” que emplea electroforesis para mover el DNA del gel a la membrana, aunque esta técnica es más rápida que la transferencia por capilaridad, tiene varios problemas. El desarrollo de “*blotting*” con vapor es el más famoso para geles de agarosa, donde la presión de vapor es usada para arrastrar el amortiguador a través del gel y de la membrana. Esta técnica es más rápida que por simple acción capilar y el tiempo de transferencia se reduce a menos de 30 minutos. Estas técnicas y otras han sido usadas para algunas aplicaciones, pero presentan altas señales “*background*” después de los análisis de hibridación.

Preparación del DNA para el Southern Blotting.

Las técnicas de preparación dependen del tipo de DNA que vaya a ser utilizado para el estudio. Para DNA bacteriano, en donde las células están rodeadas por una pared celular, ésta puede ser rota por un tratamiento con una combinación de lisozima y etilendiaminetetraacetato (EDTA), y la subsecuentemente adición de un detergente que cause la ruptura celular. La lisozima es una enzima que degrada algunos de los compuestos poliméricos que están presentes en la pared celular bacteriana y el EDTA es un agente quelante de iones de magnesio, los cuales son requeridos para la integridad de la estructura polimérica.

Después de la ruptura celular, el procedimiento continúa con el aislamiento del DNA. Una proteasa, tal como la proteinasa K, puede ser añadida al amortiguador que se usó para la ruptura celular y así comenzar con la destrucción de proteínas en el extracto. Para la desproteización es frecuentemente hacer una extracción con fenol, ya que su adición, o una mezcla de fenol y cloroformo 1:1, precipita las proteínas. Después de una centrifugación, las proteínas precipitadas migran a la interfase entre la fase orgánica y la fase acuosa y los ácidos nucleicos permanecerán en la fase acuosa. Para separar los carbohidratos se puede usar el detergente bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB), este compuesto se une a los ácidos nucleicos recubriéndolos durante la extracción con fenol. Muchos de los procesos de extracción incluyen la digestión de RNA con ribonucleasas y un final tratamiento con etanol, que precipita los polímeros de ácido nucleico restantes, permitiendo la remoción de ribonucleótidos y contaminantes de bajo peso molecular. El DNA precipitado es secado y resuspendido en agua o en un amortiguador Tris-EDTA.

Cuando lo que se quiere extraer son plásmidos, éstos pueden ser purificados por cualquiera de los muchos métodos (o “kits”) existentes con ese fin y que explotan las diferencias que hay entre los plásmidos y el genoma bacteriano. Después de la disrupción celular, el genoma termina en pequeños fragmentos y un popular método involucra el tratamiento del extracto celular con álcali, que precipita el DNA lineal pero muy poco los plásmidos súper helicoidales en solución.

Técnica blotting del DNA.

Después de haber purificado el DNA y de ser tratado con una o más endonucleasas de restricción, fraccionado (si es necesario) y separado por electroforesis, el gel debe de ser pretratado antes del Southern blott. El pretratamiento tiene dos objetivos principalmente: Abrir la molécula de DNA en bandas individuales dentro del gel. Esto se consigue primero embebiendo el gel en una solución 0.25N de HCL durante treinta minutos, como resultado se realizan unas cuantas depurinaciones (segmentación de los enlaces β -N-glucosídicos entre las purinas y el azúcar de los nucleótidos), de esta manera, se rompe la estructura de los azúcares y por lo tanto, la cadena polinucleotídica. El segundo tratamiento consiste en añadir una solución que desnaturaliza la doble cadena de DNA rompiendo sus enlaces de hidrógeno para formar DNA de cadena sencilla. Esto permite su transferencia y su posterior unión a la membrana, además de garantizar la posterior unión con una sonda. Si se usa una membrana de nitrocelulosa, después del pretratamiento con el álcali, se debe de dar una enjuagada al gel con un amortiguador Tris-sales. Este paso es esencial, debido a que, el DNA no se une a la nitrocelulosa a un pH mayor a 9.0.

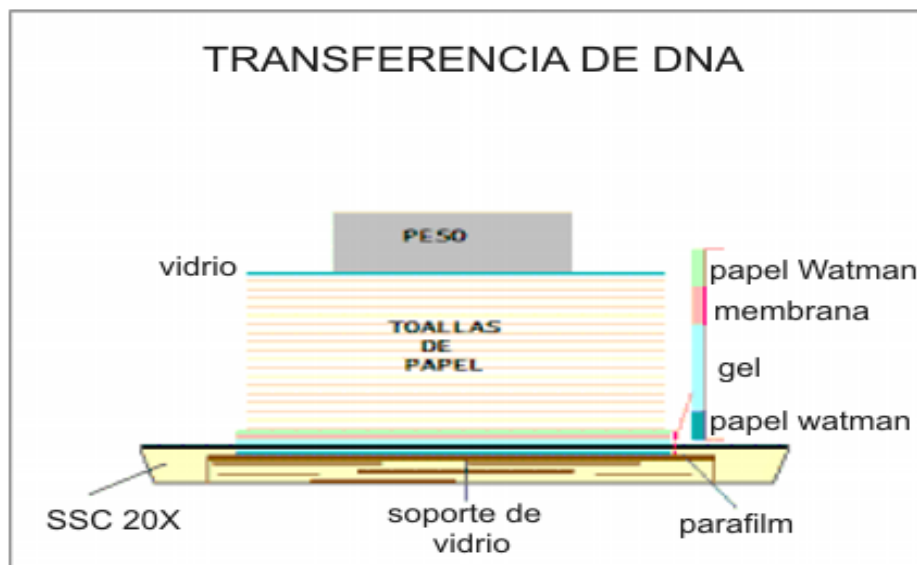
El siguiente paso es el Southern blott: Una vez que el montaje está hecho, se deja transcurriendo la transferencia en un amortiguador alto en sales, generalmente "20XSSC" (ver mas adelante). Después del *blotting*, la membrana se desmonta, se marca y se le dibujan los pozos. Posteriormente se enjuaga y se seca. Si el *blott* fue hecho con una membrana de nailon sin carga o con una de nitrocelulosa, el DNA se unirá solo ligeramente en este estado. Para obtener una inmovilización más efectiva debe de ser expuesta a una temperatura de 89°C durante 2 horas. Aunque este procedimiento no lleva a la formación de enlaces covalentes, hace que el DNA se una a la membrana de manera semipermanente. También se puede utilizar radiación UV, que promueve la formación de enlaces covalentes entre el DNA y la membrana de nailon.

Protocolo para la transferencia.

Lo primero que se hace es tener listo el gel de agarosa que se obtiene por electroforesis: Una vez que termina de correr, se enjuaga, se tiñe, se visualiza y se le saca una foto. Es muy importante que cuando un gel se va a utilizar para transferir, la exposición a la luz UV debe de ser la mínima posible, debido a que se produce un excesivo rompimiento del ácido nucleico. Para eliminar el exceso de colorante se enjuaga varias veces con agua tridestilada en un contenedor de plástico y se escurre. En el mismo contenedor, se le adicionan 250ml de HCl 0.25N y se pone a agitar ligeramente durante 15 minutos. Una vez que transcurre éste tiempo, se desecha la solución, y se repite el mismo procedimiento. En seguida, se lava con abundante agua tridestilada. Posteriormente, para desnaturalizar el DNA, se le adicionan 500ml de una solución que contiene NaOH 0.5N y NaCl 1.5M, se agita ligeramente durante 45 minutos. Se desecha la solución desnaturalizante y nuevamente se lava con agua tridestilada. El siguiente paso es poner el gel en 300ml de una solución SSC 6X e incubarlo a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Antes de que se termine éste tiempo, ya se debe tener cortada la membrana, al tamaño exacto del gel. También se pone amortiguador en un contenedor de plástico o de vidrio de tamaño conveniente (se requieren aproximadamente unos 800ml de *buffer* para un gel

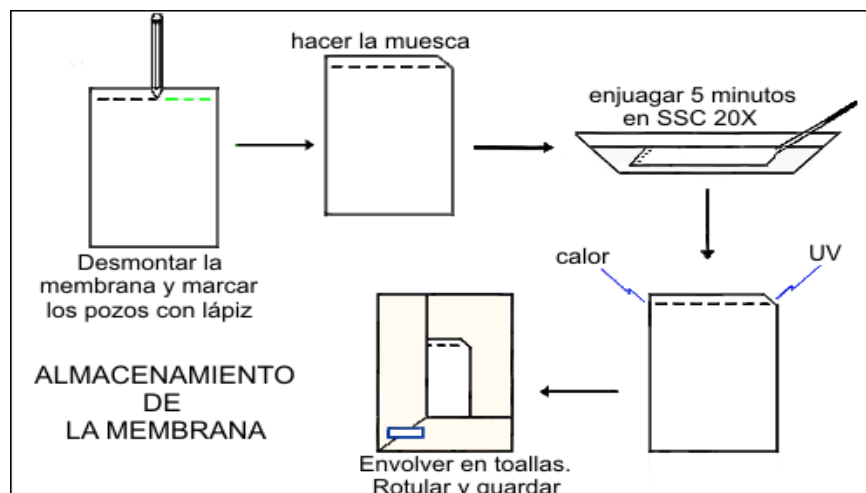
de 20X20cm en un contenedor de 24X24cm), de tal manera, que la membrana completa pueda quedar embebida en el. Finalmente, se monta el sistema de la siguiente manera:



Transferencia de DNA en gel de agarosa a membrana de nailon.

En una charola se pone un soporte de vidrio, a modo de puente, el cual se rodea con papel *Watman* absorbente, el papel debe estar en contacto con el fondo de la charola, posteriormente se ponen 500ml de amortiguador SSC 20X, el cual tiende a subir por capilaridad a través del papel. En seguida, se acomoda el gel (10X14cm) en el centro del soporte y sobre el papel *Watman* humedecido por el amortiguador. El papel *Watman* que no es cubierto por el gel se cubre con *parafilm*. Después, con mucho cuidado, se pone la membrana de nailon (11X15cm) sobre el gel. Nuevamente se pone otra capa de papel *Watman* de 12 X16cm. Encima se colocan toallas apiladas de papel absorbente, después un vidrio, y finalmente, un objeto pesado.

Al siguiente día, se retiran las toallas de papel humedecidas y se reemplazan por otras secas. Al segundo día, con ayuda de guantes, se retira la membrana, se marcan los pozos del gel con lápiz y se hace una muesca en la orilla, para que sirva como orientación y poder definir el derecho y el revés de la membrana. La membrana es lavada con 300ml de SSC 20X durante 5 minutos, después, se seca y se fija con rayos UV o con calor, se envuelve en toallas de papel. Se rotula y se guarda en un lugar seco a temperatura ambiente hasta la hibridación.



Soluciones para la transferencia.

Todos los productos químicos pueden ser considerados como potencialmente peligrosos. Es aconsejable manejar los agentes químicos usando ropa adecuada, gafas de seguridad y guantes, ya que estos pueden estar en contacto con la piel y los ojos, de ser así, se deben de lavar inmediatamente:

Solución de HCl 0.25N.

.HCl	10.4ml
.H ₂ O	cbp 500ml

Se ponen en una probeta 400ml de agua y se escurren por las paredes de la probeta, poco a poco, los 10.4ml de HCl y se agita. La solución se lleva a 500ml con agua y se vuelve a agitar. Para preparar una solución con ácido clorhídrico, nunca debe de ponerse primero el ácido y después el agua.

Solución desnaturalizante (NaOH 0.5N y NaCl 1.5M):

.NaOH	10gr
.NaCl	43.8gr
.H ₂ O	cbp 500ml

En un matraz de 1L se colocan 300ml de agua y se le adicionan los 10gr de NaOH y los 43.8gr de NaCl. Se disuelve perfectamente. Se lleva la solución a 500ml con agua tridestilada. Se agita.

Solución SSC (Cloruro de sodio, citrato de sodio) 20X:

.NaCl	175.2gr
.Citrato de sodio	84.2gr
.H ₂ O	cbp 1000ml

En un matraz con 600ml de agua se incorporan 175.2gr de NaCl y 84.2gr de citrato de sodio. Se agita y se lleva a 1L con agua tridestilada. Ya lista la solución, se mide el pH y se ajusta entre 7-8, con una solución de NaOH 4M.

0.8.9. Apéndice IX. Hibridación y autoradiografía.

Introducción.

El análisis de hibridación está basado bajo el principio de que dos polinucleótidos pueden formar un híbrido estable, si sus pares de bases son totalmente o parcialmente complementarios. De esta manera, un fragmento de restricción puede ser detectado después de un Southern blot, si la membrana es examinada con una sonda, que es una molécula etiquetada, con idéntica o similar secuencia a la del fragmento blanco.

Las reacciones de hibridación mediante sondas de DNA son tan sensibles y selectivas que pueden utilizarse para detectar secuencias complementarias cuya concentración sea incluso de una sola molécula por célula. Así, es posible determinar el número de copias de una secuencia particular de DNA (la contenida en la sonda) que se hayan presentes en el genoma celular. También se puede utilizar esta técnica para buscar genes relacionados pero no idénticos. Alternativamente, las sondas de ADN pueden utilizarse en reacciones de hibridación con ARN en vez de ADN, para detectar cuándo un gen se está expresando en una célula [35].

La hibridación.

La hibridación comienza cuando se empapa la membrana del Southern blot con un amortiguador que contiene la sonda para la hibridación, que generalmente se coloca en un tubo que está continuamente rotando, para que todas las diferentes partes de la membrana estén expuestas a la sonda, o bien, en un contenedor de plástico colocado en un agitador.

La hibridación se lleva a cabo en dos estados: Primero, la membrana es prehibridada en una solución designada para bloquear los sitios de unión a DNA libres. Si este paso se omite, puede que la sonda se adhiera de una manera no específica a la superficie de la membrana, y la señal resultante de la hibridación sea difícil o imposible de identificar. Dicha solución, generalmente contiene polímeros biológicos tal como el Ficol (un compuesto basado en carbohidratos), y/o compuestos poliméricos sintéticos como la polivinilpirrolidona, la albúmina sérica de bovino o leche en polvo. Además, se puede usar DNA de un organismo poco relacionado al estudiado, comúnmente se usa el de esperma de salmón. La prehibridación dura entre 15 minutos y 3 horas a 68°C, dependiendo del tipo de membrana.

El segundo estado es la hibridación real, cuando la membrana se somete a un amortiguador alto en sales que contienen un detergente, generalmente es SSC 2x con 1% SDS. Existen dos partes críticas en este estado: Primero, la sonda de DNA puede unirse al fragmento de restricción blanco, formando una señal clara, que puede ser discernida por algún sistema apropiado de detección de la etiqueta o marca que lleve la sonda. Aunque, puede haber problemas si se desea detectar una sola copia de un gen dentro de todo un genoma y alcanzar suficiente sensibilidad, si se deposita en el pozo del gel en la electroforesis la cantidad máxima de muestra genómica (en la práctica, alrededor de 10µg de DNA por carril) y la sonda ha sido hecha para su máxima actividad específica. Además, se pueden incrementar gravemente los problemas si se usa una sonda radiactiva diferente a ³²P, tal como ³⁵S, que generalmente se usa solo para sondear DNA menos complejo,

tal como, plásmidos restringidos o clones de bacteriófagos, o si una sonda no radiactiva es empleada. Bajo estas circunstancias, se puede obtener algún incremento en la sensibilidad utilizando un polímero inerte, tal como 10 % dextran sulfato u 8 % polietilenglicol 6000 en la solución hibridizadora. Estos polímeros son excelentes inductores de la sonda para formar redes, de tal manera que, grandes cantidades de DNA se unen al sitio blanco en la membrana. En la práctica, incrementan de 10-100 veces la sensibilidad.

El segundo factor crítico puede ser considerado durante la hibridación, en la especificidad de la reacción. La sonda utilizada puede tener regiones parcialmente o totalmente complementarias a los fragmentos de restricción. Si existen regiones en la sonda que no son totalmente complementaria a la blanco, pero tiene una región de fuerte similitud, puede formar híbridos estables. El problema es cuando la sonda tiene el potencial de hibridizar a cualquier otro fragmento de restricción del “blotten” que es parcialmente complementario. Estos inconvenientes se pueden reducir con la “astringencia”. La astringencia puede ser determinada por la composición del amortiguador de hibridación y la temperatura a la cuál se lleva a cabo el experimento. La composición del amortiguador es importante, debido a que la estabilidad del híbrido depende de la fuerza iónica y de los agentes desestabilizantes presentes, tal como la formamida que rompe los puentes de hidrógeno. La temperatura es relevante porque la T_m (máxima temperatura a la cual un híbrido es estable) es alta de un híbrido completamente apareado, en comparación con uno apareado parcialmente. Por lo tanto, la formación de un híbrido deseado y la desestabilización de un híbrido no específico, puede lograrse utilizando una adecuada combinación de la composición del amortiguador y la temperatura de la hibridación.

Se pueden realizar muchas estrategias, por ejemplo, si una sonda es mayor a 100pb de longitud, generalmente la hibridación se lleva a cabo a 68°C con un amortiguador alto en sales, esto representa altas condiciones de astringencia, bajo las cuales, solamente los híbridos estables se espera que se formen, con muy pocas o ninguna hibridación no específica. Sin embargo, si se usa una sonda pequeña (15-20 nucleótidos de longitud), las condiciones de hibridación se llevan a cabo en condiciones de baja astringencia (típicamente a una temperatura de varios grados centígrados por debajo de la T_m para los híbridos deseados), así que, todos los posibles híbridos, incluyendo algunos no específicos, son formados.

Después del lavado, las membranas son sometidas a un procedimiento de detección apropiado, dependiendo de la etiqueta que ha sido utilizada, por ejemplo, autoradiografía para una etiqueta radioactiva. Finalmente, la membrana puede ser reutilizada si se le despoja el DNA, por medio de lavados a alta temperatura y con un amortiguador que contiene álcali, además de un detergente para desestabilizar el DNA hibridizado. Este procedimiento no es totalmente satisfactorio debido a que es difícil remover algunas de las manchas de DNA.

Autoradiografía.

La detección de secuencias específicas, ya sean del genoma total o en moléculas recombinantes (fagos o plásmidos) es posible si se tiene una sonda apropiada y, además que sea reconocible.

Las técnicas más desarrolladas y puestas a punto son las que utilizan precursores

marcados radiactivamente, como son el ^{32}P ó el ^{125}I .

La mayoría de los elementos que se presentan en la naturaleza son una mezcla de isótopos ligeramente diferentes. Estos isótopos se diferencian entre si por la masa de sus núcleos atómicos, pero como tienen el mismo número de electrones, tienen las mismas propiedades químicas. Los núcleos de los isótopos radiactivos, o radioisótopos, son inestables y sufren desintegraciones, produciendo diferentes átomos. En el transcurso de estas desintegraciones emiten partículas energéticas subatómicas como electrones, o radiaciones como rayos γ .

Aunque los radioisótopos naturales son poco frecuentes (a causa de su inestabilidad), se pueden producir en grandes cantidades en reactores nucleares en los que diferentes átomos se bombardean con partículas de alta energía. Como resultado, hoy en día se dispone de formas marcadas radioisotópicamente de muchos compuestos importantes desde el punto de vista biológico, tal como el ^{32}P , que tiene una vida media de unos 8 días. La radiación que emiten se detecta de diferentes maneras y hacen posible la medida de la cantidad de un radioisótopo determinado en una muestra. Por ejemplo, los electrones (partículas β) pueden ser detectados con un *contador Geiger* por la ionización que producen en un gas. También es posible detectar la localización de un radioisótopo utilizando una autoradiografía.

Una de las aplicaciones importantes de la radiactividad a la biología consiste en la localización de compuestos radiactivos en determinadas muestras. En este caso, en membranas de nailon que fueron previamente hibridadas con una sonda (molécula) con ^{32}P . Sin embargo, su uso se extiende a una gran diversidad de muestras, incluso a células completas o tejidos.

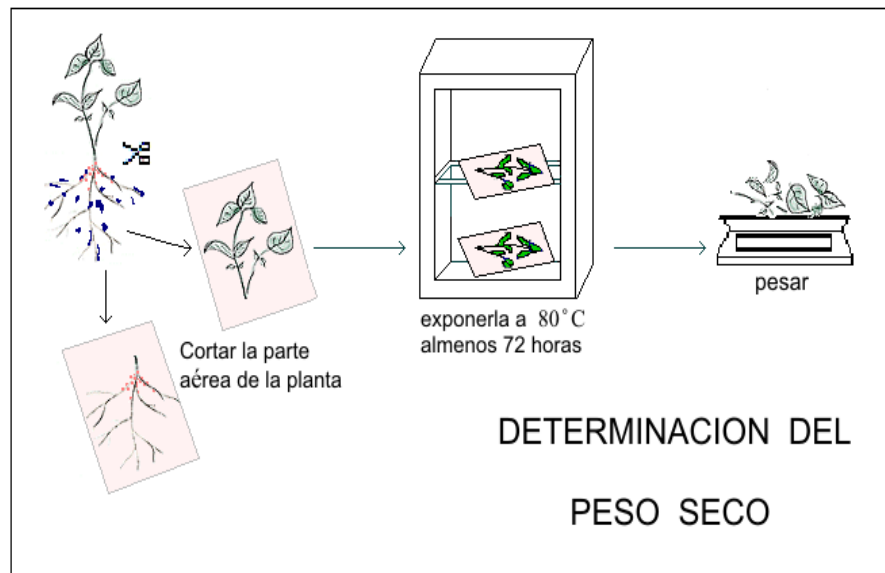
En la autoradiografía, las muestras (membranas) son incubadas durante un período variable de tiempo con un compuesto radiactivo determinado, para permitir que el compuesto se incorpore. Después, la membrana es cubierta por una delgada placa fotográfica, y se deja varios días, durante este tiempo, el isótopo se desintegra emitiendo energía de radiación. Posteriormente, la placa se revela y se determina la posición de la radiactividad.

Por lo tanto, cuando se utilizan moléculas de ácidos nucleicos marcadas radiactivamente como sondas para buscar moléculas de ácidos nucleicos complementarias a ellas, se utiliza la autoradiografía para detectar la posición y la cantidad de estas moléculas que se hibridan con la sonda en una membrana de nailon.

0.8.10. Apéndice X. Determinación del peso seco.

La materia seca se cuantifica deshidratando el material vegetal en una estufa a 80°C. Esto se logra en un periodo mínimo de 72 horas, quedando el material vegetal con un 4-8% de humedad residual. Con esta temperatura (80°C) se busca que el tejido vivo muera en corto tiempo. No se recomienda el secado a temperaturas menores (por ejemplo 40°C) porque la disminución en peso del material puede deberse en parte a la pérdida de peso por estímulo de la respiración debido a la temperatura. Tampoco se recomiendan temperaturas mayores porque se desnaturalizan los azúcares y las proteínas.

Una vez que las plantas se deshidrataron, se colocaron en una balanza analítica, y se pesaron.



0.8.11. Apéndice XI. Ensayos de reducción de acetileno para medir la actividad de la nitrogenasa.

Introducción.

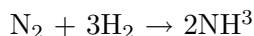
Todos los microorganismos que convierten el N_2 en amoníaco lo hacen gracias al complejo enzimático de la nitrogenasa, la cual, necesita de la colaboración de otras dos proteínas, la ferredoxina y la flavodoxina. La nitrogenasa está constituida por dos metaloproteínas (la proteína I, dinitrogenasa, o bien, la proteína-Fierro-Molibdeno; y la proteína II, dinitrogenasa reductasa o Fierro-proteína) y contiene tres tipos de grupos prostéticos. La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso que requiere un gasto considerable de energía, de ahí que su biosíntesis este sometida a una estricta regulación, además es sumamente lábil a la inactivación por el O_2 .

Los genes de fijación de nitrógeno codifican a las proteínas involucradas. Los que codifican para la enzima nitrogenasa (*nif*) son muy similares dentro de los diferentes rizobios. En los rizobios de crecimiento rápido, la nitrogenasa sólo se expresa en los bacteroides. En los de crecimiento lento se ha detectado en cultivo puro, bajo anaerobiosis. También existe otro grupo pequeño de genes (*fix*) que contribuyen a la diferenciación y funcionalidad del nódulo. En los rizobios, los genes de la nitrogenasa y muchos genes *fix* están localizados en las proximidades de los genes *nod*.

Existen diferentes métodos para estimar la actividad de la nitrogenasa, es decir, la fijación de nitrógeno, como son, la determinación del peso seco de las partes aéreas de la planta, el uso de isótopos (^{15}N), o bien, la determinación de la reducción de acetileno por cromatografía de gases. Entre las razones por las cuales el análisis de la reducción de acetileno es ampliamente utilizado están: Es relativamente fácil de medir, es muy sensible, no es destructivo, provee una respuesta inmediata y cuantitativa para determinar la actividad de la nitrogenasa, además de que puede ser usado en experimentos de campo y laboratorio para comparar varios tratamientos.

Principios fisicoquímicos.

El complejo enzimático de la nitrogenasa, es el responsable de la fijación biológica de nitrógeno (reducción del nitrógeno molecular) de acuerdo a la siguiente reacción:



y tiene lugar en el citoplasma de los bacteroides. Este complejo enzimático consiste de dos diferentes proteínas que comúnmente ambas tienen átomos de Fe, y el molibdeno (Mo) está presente sólo en una de ellas. Estas dos proteínas, la que contiene sólo Fe y la proteína Fe-Mo, son esenciales para el perfecto funcionamiento de la nitrogenasa.

Durante el proceso, el N_2 es convertido a NH_3 a través de una serie de pasos que involucra un alto gasto de ATP. El H^+ y el N_2 son los sustratos naturales de la nitrogenasa. Sin embargo, otros “análogos del nitrógeno”, caracterizados por tener un triple enlace, como es acetileno ($HC-CH$), cianuro ($H-C-N$), óxido nitroso ($N-N-O$), y metil isocianuro (CH_3-N-C) pueden, además, ser reducidos por la nitrogenasa.

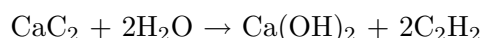
Debido a la falta de toxicidad y la fácil disponibilidad, el acetileno es frecuentemente usado para los ensayos donde se necesita medir la actividad de la nitrogenasa. El acetileno

es reducido a etileno de acuerdo a la siguiente reacción:



En este ensayo, los nódulos son expuestos a una mezcla de gas acetileno en aire. Cuando órganos fijadores de nitrógeno se incuban en una atmósfera con al menos 10 % de C_2H_2 , otros sustratos para la nitrogenasa son inhibidos por el acetileno. Por lo tanto, la cantidad de etileno formado en estas condiciones, en un periodo de tiempo determinado, corresponde a la actividad total de la nitrogenasa. Los resultados obtenidos se expresan en moles de etileno producidas.

El acetileno está disponible comercialmente, en ensayos de laboratorio donde se requieren pequeñas cantidades de este gas, es conveniente obtenerlas por la reacción de piedras de carburo de calcio con agua. El carburo de calcio al entrar en contacto con el agua, produce una reacción exotérmica que libera gas acetileno:

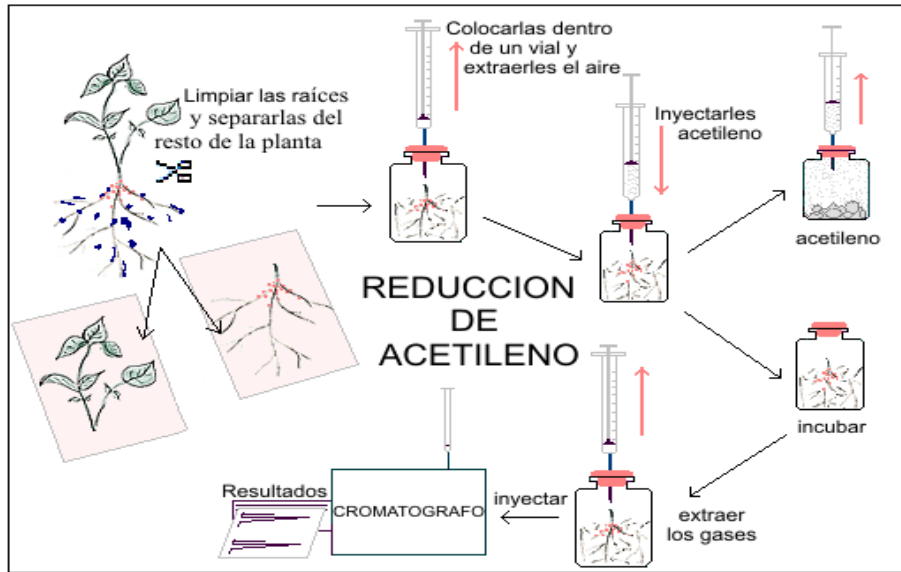


Para garantizar que el acetileno y la nitrogenasa entren en contacto, las raíces de las plantas con los nódulos deben de ser colocados en un vial o contenedor de vidrio que con tapa hermética de látex, dentro del cual, el acetileno debe de ser liberado. Después de un periodo de incubación específico, se extraen muestras de aire del interior del vial, que enseguida, son analizadas por un cromatógrafo de gases.

Protocolo del ensayo de reducción de acetileno.

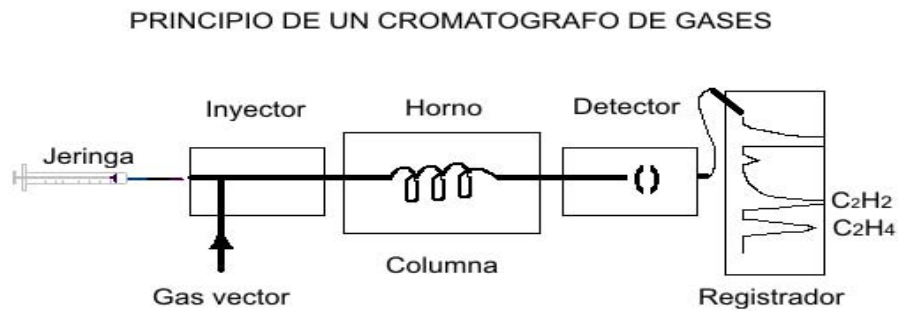
Para preparar la incubación de los nódulos. Primero se extrajeron cuidadosamente las raíces de las plantas, de tal manera, que no se maltrataran ni se cayeran los nódulos. Se cortaron las raíces hasta donde se encontraban las cicatrices de los cotiledones. Los tallos y las hojas de las plantas se etiquetaron y guardaron, para ser secadas y determinar el peso seco. Se removieron los restos de suelo o del medio, donde fueron crecidas las plantas, que quedaron adheridos a las raíces, antes de ponerlas en los viales para la incubación. Se recuperaron e incluyeron los nódulos que se llegaron a desprender de la raíz al momento de extraer las plantas, o a la hora de la limpieza. Para los ensayos de reducción de acetileno no deben de lavarse las raíces, y si están mojadas, se les debe de secar lo mejor posible antes de ser puestos en el vial, ya que, la humedad puede reducir significativamente la actividad de la nitrogenasa. Un nódulo húmedo probablemente atrapa el acetileno en la superficie, reduciendo la exposición del acetileno a la nitrogenasa del nódulo.

Una vez colocadas las raíces en los viales se les ponen sus tapones de látex. Inmediatamente, con una jeringa de 1ml se tomó cierta cantidad de aire del interior de cada uno de los viales (0.4-1.0ml) para compensar la presión a la hora de inyectar el acetileno. Después, se le inyectó a cada vial gas acetileno, la misma cantidad que fue extraída de aire (0.4-1.0ml) y se incubaron en la oscuridad a 30°C, durante 1 hora.



Medición de la reducción de acetileno.

El análisis de etileno-acetileno se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases. Terminado el tiempo de incubación, se extraía una muestra de la mezcla de gases que contenía el vial, de la siguiente manera: se pasaba una jeringa especial para el cromatógrafo de 1ml, a través del tapón de látex, el émbolo se subía y se bajaba 3 veces de manera rápida (para mezclar la atmósfera de adentro), luego se tomaba una muestra de 0.4ml de los gases contenidos en el vial. La muestra se inyectaba rápidamente y de manera directa al cromatógrafo. En seguida, el registrador mostraba la altura de pico de etileno, el cuál se leyó; Finalmente, se calcula el número de moles de etileno producidos a partir de los 0.4ml de acetileno inyectados.



Principio de un cromatógrafo de gases.

0.8.12. Apéndice XII. Métodos de conteo de rizobios.

Existen diferentes métodos para cuantificar rizobios, como por ejemplo:

Cuadro 50: Metodos de conteo de Rizobios.

Técnica	Resultados obtenidos	Especificidad	Utilización	Observaciones	Diferenciación vivo/muerto
Conteo al microscopio	Inmediata: Observación directa	No específica	Cultivos Puros	Simple y económica	No
Densidad Óptica	Inmediata	No Específica	Cultivos Puros	Simple y requiere estandarización	No
Dilución en placas	No inmediata, requiere crecimiento de colonias	No específica	Cultivos Puros	Mucha manipulación	Sí
Infección de plantas	No inmediata, requiere nodulación	Específica a nivel de especie	cualquier tipo de muestra	Mucha manipulación	Sí

Técnica D.O (densidad óptica).

La densidad óptica (DO) de un cultivo es proporcional a la cantidad de bacterias y su medición permite estimar la población bacteriana. Para llevar a cabo este método, se toma asépticamente una muestra de cultivo (1ml) y se coloca en una de las cubetas de espectrofotómetro; la D.O. se mide a una longitud de onda de 600 nm. Esta técnica se usa sólo para cultivos puros, y no determina directamente la cantidad de bacterias. Sin embargo, si se realiza una estandarización entre D.O. y número de bacterias, puede estimarse el número de bacterias existentes en el cultivo, esta estandarización tiene que ser hecha para cada cepa en estudio y cada medio de cultivo.

Este método permite generalmente una buena estimación a partir de bajas cantidades de muestra (10^5 - 10^9 microorganismos por mililitro), este rango varia de acuerdo a la cepa, si produce mucus o no, y de la precisión técnica del espectrofotómetro. Esta técnica es buena si se quiere hacer un seguimiento rápido del crecimiento de cultivo de rizobios, siempre y cuando sean puros, ya que cuando el cultivo envejece, la opacidad del medio no permite obtener resultados precisos.

Técnica de conteo por dilución en cajas de Petri, para determinar el número de bacterias presentes en el inóculo.

Con el siguiente experimento, se hizo una estimación sobre el número de bacterias que estaban presentes en el inóculo utilizado para las plántulas de frijol. Este tipo de ensayos nos proporciona información del valor aproximado del número de bacterias que se estaban inoculando, es decir, saber cuál era el tamaño de población inicial con que contaban las bacterias antes de comenzar el proceso competitivo por la nodulación. Además, observar

si el número de bacterias inoculadas tiene alguna relación, en este caso, con los resultados obtenidos sobre la capacidad competitiva.

La determinación del número de bacterias inoculadas es un factor importante, ya que se ha visto que tiene una relación directa con su respuesta competitiva. Esta técnica se realiza siempre dentro de una campana de flujo laminar, con material perfectamente estéril y cerca de la flama de un mechero, lo suficiente como para mantener condiciones de esterilidad y sin acercarse mucho para no matar a las bacterias.

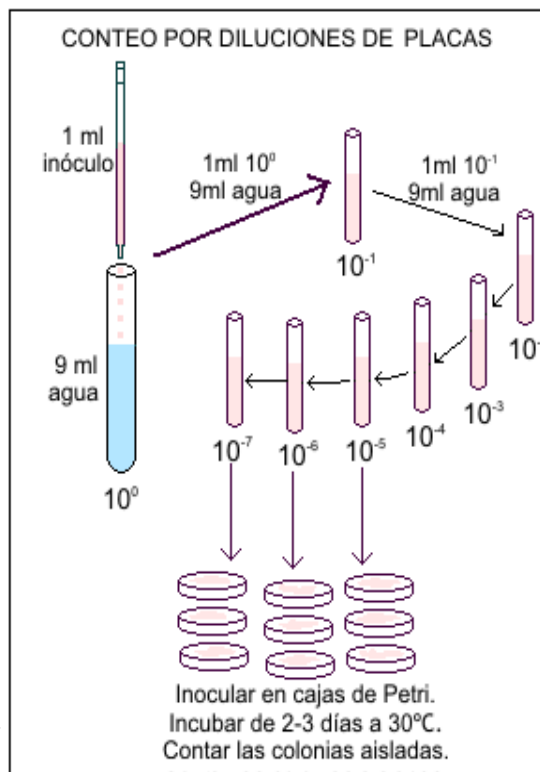
Una vez que ya se tenían preparados los inoculantes líquidos, y antes de verterlos en las macetas, se tomó 1ml de cada uno de ellos y se colocaron por separado en tubos de ensayo, previamente esterilizados y rotulados, que contenían 9ml de agua estéril. Se agitó para que se homogeneizara. Así se obtuvieron las diluciones 10^0 . Posteriormente, se hicieron varias diluciones decimales sucesivas (hasta 10^{-7}) de estas muestras.

Para hacer las diluciones, se tomaron 7 tubos de ensayo por cepa, previamente esterilizados y se rotularon. Se le añadió a cada uno de ellos 9ml de agua estéril. Luego, con ayuda de una micropipeta se tomaba 1ml de la dilución 10^0 y se le añadía a otro tubo, se agitaba, así se obtuvo la dilución 10^{-1} . Para hacer la dilución 10^{-2} se tomaba 1ml de la dilución 10^{-1} , y se vertía en otro tubo que contenía los 9ml de agua, se agitaba. Así sucesivamente, hasta llegar a la dilución 10^{-7} . Esto se hizo para todas las cepas.

Una vez que ya se tenían las diluciones, se inocularon las cajas de Petri. Para esto, se tomaron sólo las últimas diluciones hechas (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) y se iban tomando de $100\mu\text{l}$ para ponerlas por separado en cajas, con medio sólido PY+Ca⁺⁺ y antibióticos (Nal₂₀Nm₆₀ ó Nal₂₀Sp₆₀), dependiendo del tipo de cepa). Enseguida, los $100\mu\text{l}$ se distribuían con ayuda de una asa de vidrio, de manera uniforme, en toda la superficie del medio, hasta que se secase completamente el inóculo. Se tapaban las cajas, y se ponían de manera invertida a crecer a 30°C , en la oscuridad, durante 3 días.

Finalmente, pasado este tiempo, en las cajas se debían de haber formado colonias aisladas, las cuales, se contaron y se realizaron las respectivas operaciones de correspondencia. Se registran los resultados como unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml) [34].

Es importante mencionar que, se parte del supuesto que cada colonia representa un rizobio vivo, del inóculo utilizado para sembrar la placa, por lo tanto, podemos calcular el número de rizobios en el cultivo original.



Protocolo de la técnica del NMP, para estimar el número de bacterias de bacterias formadoras de nódulos en el suelo utilizado.

El recuento de *Rhizobium* en el suelo se llevó a cabo con la técnica de infección de plantas y la determinación del número más probable (NMP). El NMP es un método probabilístico e inventado por McCrady, quien demostró que el resultado tiene una fiabilidad del 95 %, y permite la determinación del número probable de bacterias específicas para una planta dada, presentes en un suelo o en un inoculante.

El método del número más probable (NMP) es una estrategia eficiente para estimar en general las densidades poblacionales de microorganismos, especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en determinar, en réplicas de diluciones consecutivas, la presencia o ausencia de algún atributo particular de los microorganismos presentes en muestras de suelo u otros ambientes.

Un requisito importante de este método es la necesidad de poder reconocer un atributo particular de la(s) población(es) en el medio de crecimiento a utilizarse, ya que, la estimación de la densidad poblacional se obtiene del patrón de ocurrencia de ese atributo en las diluciones seriadas, con ayuda de una tabla probabilística.

Algunas de las ventajas del NMP son: Tiene la capacidad de estimar tamaños poblacionales basados en atributos relacionados a un proceso (selectividad); por ejemplo se puede determinar la densidad poblacional de organismos que pueden nodular leguminosas en una muestra de suelo usando el método de infección de plantas. Es específico. Determina sólo organismos vivos y activos metabólicamente. Además, suele ser más rápido y casi igual de confiable que los métodos tradicionales de esparcimiento en placas de cultivo, entre otros.

La técnica de número más probable se basa en la determinación de un título. Es decir, en determinar la menor cantidad posible de inóculo que pueda originar crecimiento cuando se deposita en un medio adecuado.

Para tener una aproximación exacta y precisa de un título real, la prueba se basa en repeticiones, es decir, en siembras e inoculaciones paralelas de plantas en matraz. En este caso, se efectuaron 5 inoculaciones paralelas (por quintuplicado).

Como al final de la prueba lo que se detecta es el crecimiento (nodulación), es necesario poner una serie de plantas o matraces testigo, sin inocular, los cuales servirán como control.

El título final encontrado puede convertirse o expresarse como el número de microorganismos por unidad de volumen de la muestra, a través de las tablas del número más probable.

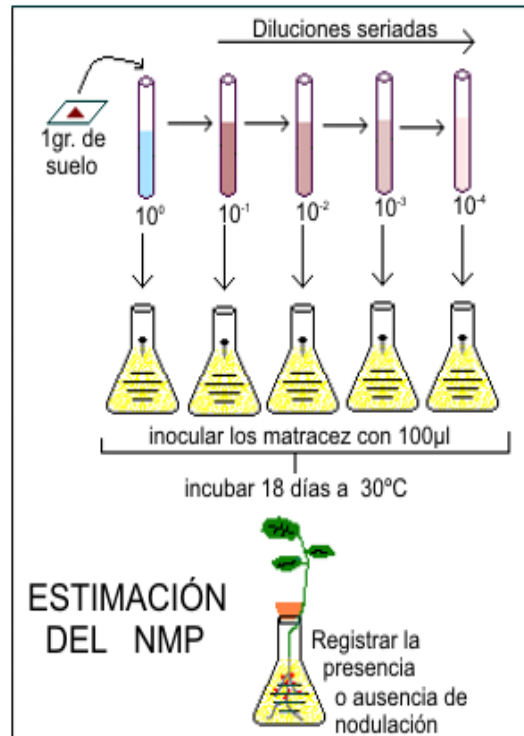
Para llevar a cabo el método del NMP, se colectó una muestra fresca de 1gr del suelo en estudio, y se depositó en un tubo de ensayo. En seguida se le añadió a la muestra 9ml de una solución 0.85 % de NaCl. Se agitó la muestra en un vortex hasta que quedó homogeneizada la mezcla (esta fué la dilución 10^0). Es importante agitar durante un largo tiempo la muestra como para separar a las bacterias presentes, y que estén distribuidas aleatoriamente dentro de ésta.

Posteriormente, con la muestra se hicieron diluciones decimales en serie: El extracto del suelo fue diluido seriadamente transfiriendo 1ml de la mezcla a un tubo de ensayo y añadiéndole 9 ml de una solución 0.85 % de NaCl. Cada transferencia corresponde a

una dilución de 1 en 10. Se repitió el procedimiento de dilución en serie hasta alcanzar la dilución 10^{-4} .

Estas diluciones sirvieron para inocular matraces que contenían plántulas de frijol Negro Jamapa y BAT477 en algodón (Ver apéndice III). Los matraces se inocularon con alícuotas de $100\mu\text{l}$.

Después de 18 días incubados a 30°C se registró la nodulación en los matraces, y se volvieron a incubar por algunos días más a aquellos matraces que no mostraron nodulación alguna. Pasados unos 10 días, se examinaron nuevamente para detectar si había nodulación positiva. Finalmente, se aplicaron las tablas del NMP y se expresaron los resultados en términos de número de microorganismos/gr de suelo [34].



0.8.13. Apéndice XIII. Nodulación en el primero y segundo experimento.

Primer experimento.

Cuadro 51: Nodulación en Negro Jamapa. Primer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	75	49	2	
FAJ1329	9	60	58	52	
BRH2	9	74	39	15	
FAJ4010	9	68	35		5
BRH1	9	50	30	9	
FAJ4007	9	84	89	5	
CNPAF512	9	80	59	5	
PL41H	9	90	90	1	
PL43C	9	90	90	0	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Primer mes.

Cuadro 52: Nodulación en Negro Jamapa. Segundo mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	90	16	
FAJ1329	9	90	90	59	
BRH2	9	90	90	0	
FAJ4010	8	80	71		10
BRH1	9	90	14	0	
FAJ4007	9	90	90	3	
CNPAF512	9	90	90	3	
PL41H	9	90	90	0	
PL43C	9	90	80	0	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Segundo mes.

Cuadro 53: Nodulación en Negro Jamapa. Tercer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	77	15	
FAJ1329	9	90	90	57	
BRH2	9	90	80	0	
FAJ4010	9	90	85		83
BRH1	9	88	82	4	
FAJ4007	9	90	86	0	
CNPAF512	9	90	88	2	
PL41H	9	35	33	0	
PL43C	9	36	36	2	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Tercer mes.

Cuadro 54: Nodulación en BAT477. Primer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	88	84	
FAJ1329	9	90	89	86	
BRH2	9	90	85	0	
FAJ4010	9	90	66		2
BRH1	9	90	72	5	
FAJ4007	9	90	90	2	
CNPAF512	9	90	85	0	
PL41H	8	80	8	1	
PL43C	8	82	47	1	

Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Primer mes.

Cuadro 55: Nodulación en BAT477. Segundo mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	76	57	
FAJ1329	9	90	80	67	
BRH2	9	90	63	0	
FAJ4010	9	90	54		27
BRH1	9	90	65	0	
FAJ4007	7	70	54	0	
CNPAF512	9	90	72	5	
PL41H	9	90	16	0	
PL43C	9	90	10	2	

Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Segundo mes.

Cuadro 56: Nodulación en BAT477. Tercer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	71	59	8	
FAJ1329	9	66	59	51	
BRH2	9	47	39	0	
FAJ4010	9	44	41		21
BRH1	9	30	24	0	
FAJ4007	9	32	32	0	
CNPAF512	9	34	27	0	
PL41H	7	28	25	0	
PL43C	7	45	40	0	

Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Tercer mes.

Segundo experimento.

Cuadro 57: Nodulación en Negro Jamapa. Primer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	62	50	
FAJ1329	9	90	72	58	
BRH2	3	30	23	0	
FAJ4010	9	90	36		14
BRH1	3	30	5	0	
FAJ4007	3	30	20	0	
CNPAF512	3	30	10		
PL41H	3	30	11	0	
PL43C	3	30	13	0	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Primer mes.

Cuadro 58: Nodulación en Negro Jamapa. Segundo mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	86	64	
FAJ1329	9	90	87	73	
BRH2	3	30	28	0	
FAJ4010	9	90	90		44
BRH1	3	30	23	0	
FAJ4007	3	30	29	0	
CNPAF512	3	30	30		
PL41H	3	30	17	0	
PL43C	3	30	22	0	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Segundo mes.

Cuadro 59: Nodulación en Negro Jamapa. Tercer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	70	38	
FAJ1329	9	90	89	74	
BRH2	3	30	23	0	
FAJ4010	9	90	83		35
BRH1	3	30	27	0	
FAJ4007	3	30	24	0	
CNPAF512	3	30	25	2	
PL41H	3	30	15	0	
PL43C	3	30	29	0	

Crecimiento de las 9 cepas en Negro Jamapa. Tercer mes.

Cuadro 60: Nodulación en BAT477. Primer mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	66	46	
FAJ1329	9	90	68	56	
BRH2	3	30	11	0	
FAJ4010	9	90	35		2
BRH1	3	30	17	0	
FAJ4007	3	30	16	0	
CNPAF512	3	30	14		
PL41H	3	30	26	0	
PL43C	3	30	18	0	

Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Primer mes.

Cuadro 61: Nodulación en BAT477. Segundo mes.

Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	90	88	
FAJ1329	9	90	90	89	
BRH2	3	30	20	0	
FAJ4010	9	90	86		54
BRH1	3	30	16	0	
FAJ4007	3	30	30	0	
CNPAF512	3	30	29		
PL41H	3	30	25	0	
PL43C	3	30	21		

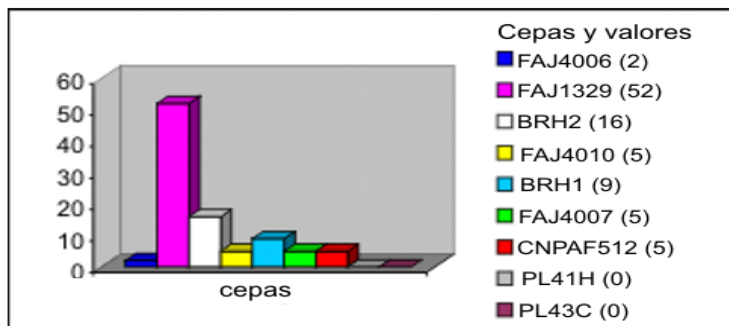
Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Segundo mes.

Cuadro 62: Nodulación en BAT477. Tercer mes.

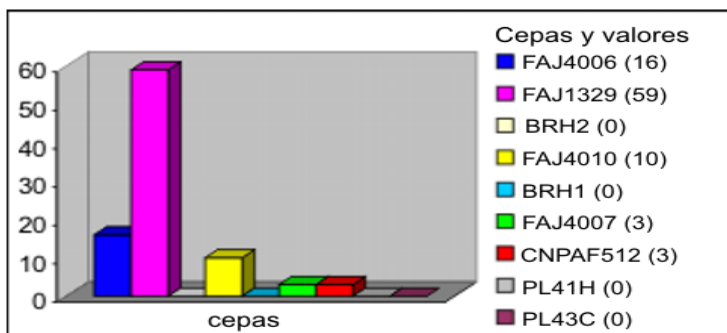
Cepas	No. de plantas	No. de nódulos	Ciclo ₁₀	Nal ₂₀ Nm ₆₀	Nal ₂₀ Sp ₆₀
FAJ4006	9	90	86	49	
FAJ1329	9	90	85	79	
BRH2	3	30	29	0	
FAJ4010	9	90	85		38
BRH1	3	30	24	0	
FAJ4007	3	30	22	0	
CNPAF512	3	30	28	0	
PL41H	3	30	26	0	
PL43C	3	30	25	0	

Crecimiento de las 9 cepas en BAT477. Tercer mes.

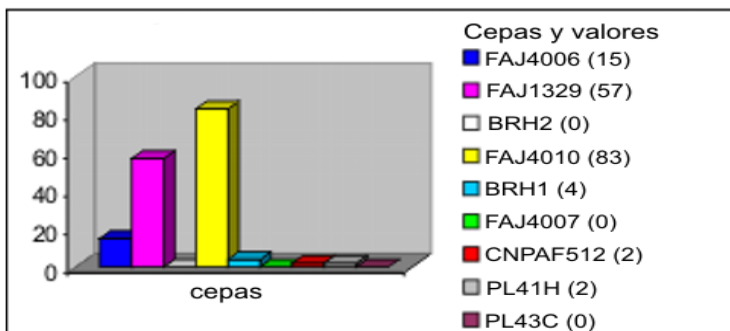
Gráficas de nodulación. Primer experimento.



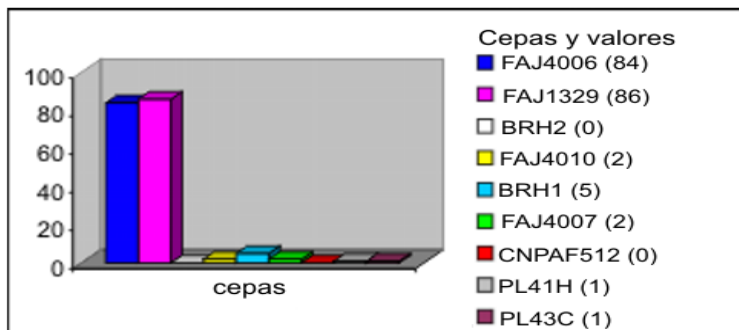
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el primer mes en frijol Negro Jamapa.



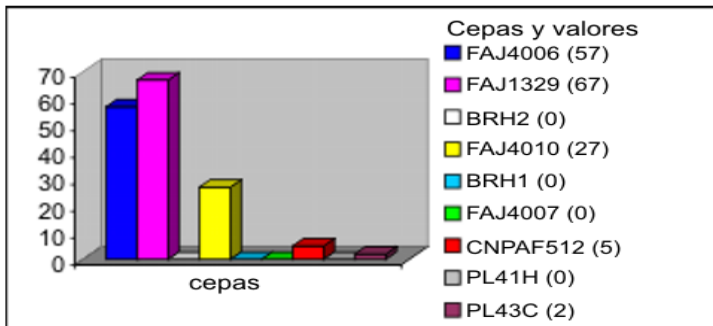
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el segundo mes en frijol Negro Jamapa.



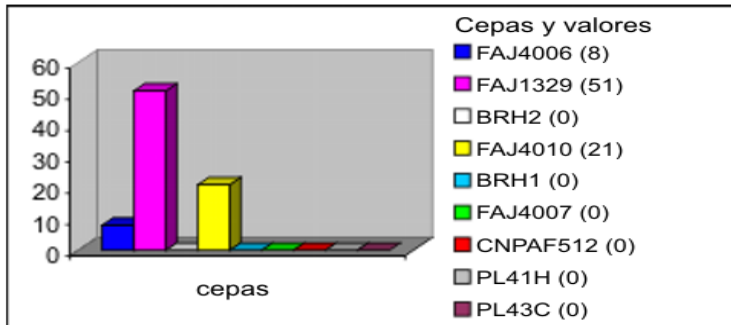
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el tercer mes en frijol Negro Jamapa.



Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el primer mes en frijol BAT477.

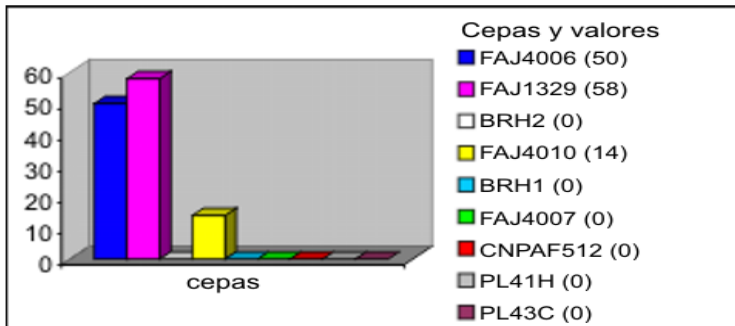


Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el segundo mes en frijol BAT477.

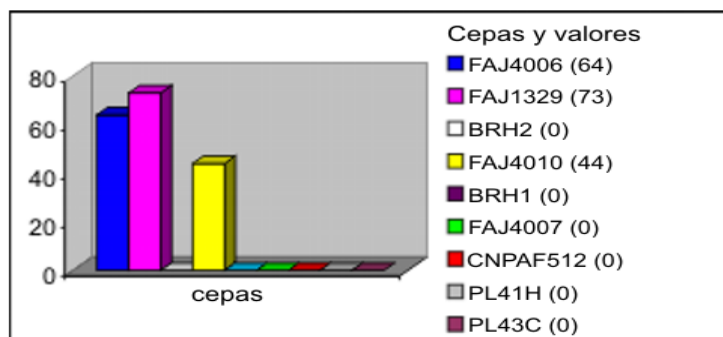


Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el tercer mes en frijol BAT477.

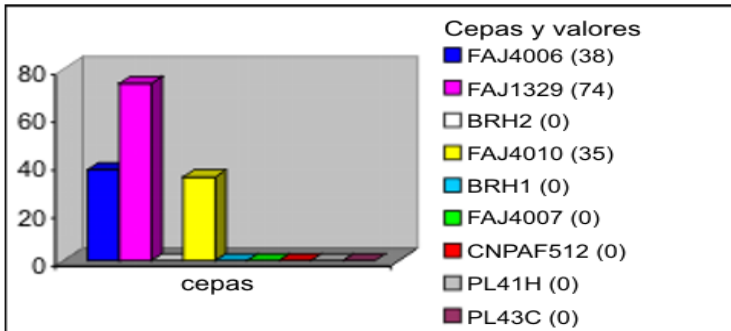
Gráficas de nodulación. Segundo experimento.



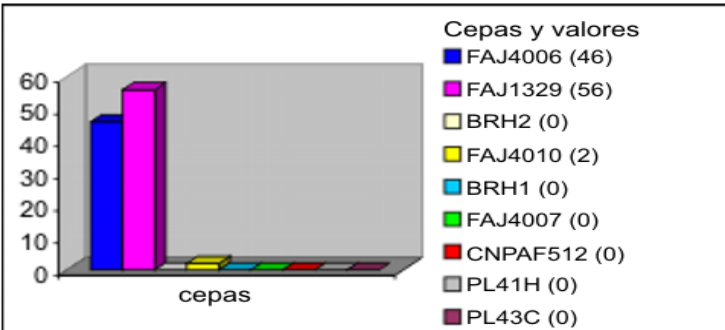
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el primer mes en frijol Negro Jamapa.



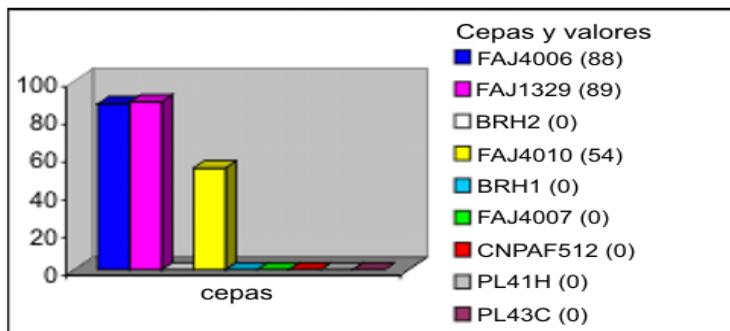
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el segundo mes en frijol Negro Jamapa.



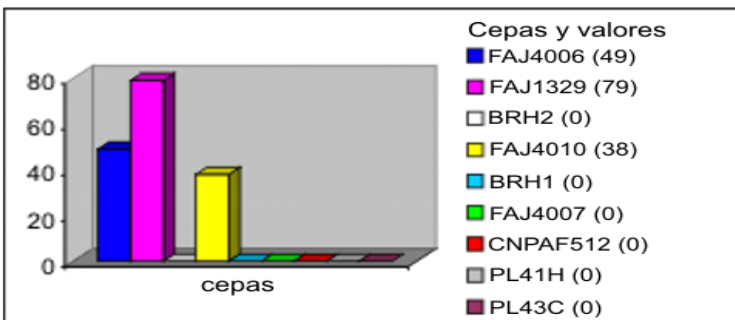
Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el tercer mes en frijol Negro Jamapa.



Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el primer mes en frijol BAT477.



Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el segundo mes en frijol BAT477.



Número de nódulos formados por las diferentes cepas en el tercer mes en frijol BAT477.

0.8.14. Apéndice XIV. Mutagénesis con transposones.

Introducción.

En términos generales, el genotipo de un organismo puede ser considerado como más o menos estable, que puede modificarse por la capacidad de perder o adquirir elementos genéticos (tal como plásmidos o elementos móviles) u otro tipo de mutaciones.

De todos los genes existentes en un organismo, solamente una fracción puede ser expresada bajo determinadas condiciones, dando como resultado al fenotipo de un organismo, bajo esas condiciones. El fenotipo se refiere a lo “visible”, a la expresión, a los rasgos del organismo. Si se cambian las condiciones, el fenotipo puede cambiar debido a los cambios en los niveles de expresión de algunos genes. Así, el fenotipo es un conjunto de características intrínsecamente variables.

Un mutante es definido como una especie, una cepa u organismo dado, que tiene alguna modificación en una o muchas características, y que transmite sus nuevos rasgos a su progenie. Una mutación es una modificación en la organización química del material genético de un organismo, en el genotipo. Las mutaciones son repentinas, no tienen alguna transición entre el estado inicial y el final del organismo. Una vez establecida, puede estar presente permanentemente [28].

El organismo aislado inicialmente, obtenido de poblaciones “normales y naturales”, es llamado “wild type” o tipo silvestre. Aunque es claro que, esta definición es puramente arbitraria, imprecisa, ya que depende del organismo que se haya aislado y purificado por primera vez. Es importante definir el estado inicial, o el más cercano posible, ya que sirve como referencia. Del tipo silvestre pueden salir muchos tipos de mutantes, muchos tipos modificados.

Varios eventos pueden terminar en severas modificaciones en la molécula de DNA, dando origen a una mutación. Las consecuencias genéticas y funcionales dependen de la naturaleza del cambio, de la ubicación dentro del genoma y del papel de la región genómica afectada. Las mutaciones se pueden clasificar de muchas maneras. Por ejemplo, las que afectan a nivel molecular y las que lo hacen a nivel fisiológico. Aunque las consecuencias de las mutaciones se perciben considerando principalmente las de regiones de DNA que codifican proteínas, existen muchas otras menos obvias y que pueden tener importantes consecuencias; Por ejemplo, las que expresan sólo RNA (por ejemplo RNAs de transferencia, o RNA ribosomal) o que no se expresan, pero que son importantes porque sirven como reconocimiento de señales, como las secuencias promotoras.

Existe una clase de mutación espontánea muy diseminada, y es la producida por los elementos transponibles. Su particular modo de movilidad los hace capaces de alterar las secuencias normales de los genes e inducir una mutación. La importancia relativa de estas mutaciones depende del organismo y de los genes implicados.

Recombinación.

La recombinación es el término general usado para describir el reemplazamiento de una secuencia de DNA por otra, generalmente de un diferente, pero relacionado, genoma. El tamaño de las secuencias involucradas es variable, pero generalmente permite el intercambio entre un gen y su respectivo alelo (otra versión del gen). La “recombinación

homóloga” implica reconocimiento, hibridación, recombinación de moléculas homólogas, y liberación de las moléculas recombinantes [28].

Existe otro tipo de recombinación que no requiere, o casi no, homología entre los elementos genéticos involucrados, y se denomina “no homóloga”. Ejemplo de esto, es el proceso utilizado por algunas secuencias móviles durante su proceso de transposición e integración de profagos. Debido a que los transposones (tipo de elemento genético transponible) la presentan, han sido ampliamente usados en una gran cantidad de estudios de genética *in vivo* [28].

Elementos transponibles.

El primer descubrimiento de elementos transponibles en bacterias fue en 1968. El interés en estos elementos se incrementó cuando en 1974, se descubrieron transposones que llevaban genes de resistencia a antibióticos, y se les atribuyó un importante papel en la diseminación de estos genes entre bacterias patógenas. De ahí en adelante, el interés se ha incrementado principalmente por dos razones: por el estudio en los mecanismos de transposición y la utilización de transposones con propósitos genéticos [28].

Se han descrito un gran número de elementos transponibles en bacterias Gram⁻ (y en sus respectivos virus y plásmidos) y son los más estudiados, aunque los hay también en bacterias Gram⁺. Los elementos transponibles en bacterias fueron originalmente clasificados formando dos grupos, las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn). Analizando sus estructuras y los mecanismos de transposición, se ha propuesto una diferente clasificación [28].

De manera general, existe 4 clases principales de elementos transponibles en bacterias Gram⁻, y están basadas en la organización genética, propiedades mecánicas y homología de secuencia de DNA de los elementos[28].

Transposones.

Cuando los plásmidos de resistencia son descubiertos por primera vez, hay mucha especulación de cómo estos elementos extracromosomales pueden llevar un número diferente de genes de resistencia contra antibióticos y cómo aparentemente plásmidos relacionados pueden tener diferentes combinaciones de tales genes, o inversamente, cómo plásmidos muy diferentes pueden llevar genes de resistencia relacionados.

Los genes de resistencia a ampicilina se mueven de un plásmido a otro. El término transposón es usado para referirse a un elemento capaz de tal comportamiento. Este movimiento de genes de resistencia puede no solo ocurrir entre dos plásmidos, sino además de plásmido a cromosoma, y viceversa.

En 1971 se demuestra que el determinante para la β -lactamasa, que confiere resistencia ante antibióticos β -lactámicos (ampicilina o penicilina), es capaz de moverse dentro de la misma célula de un plásmido a otro compatible. Por ese mismo tiempo, se demostró que tal determinante era capaz de insertarse en el cromosoma de *E. coli*. Se ha demostrado que genes de resistencia a antibióticos de muchos plásmidos son capaces de “saltar” o transponerse a otros plásmidos no relacionados. Estos genes “saltarines” han sido llamados transposones [28].

Los transposones son elementos genéticos transferibles de una región del genoma a otra, y de un organismo a otro. Son una herramienta muy útil en biología para la obtención de mutaciones. Generalmente se utilizan transposones que confieran resistencia a antibióticos para poder rastrear su presencia en las bacterias que los adquieren. Aparte de llevar genes de resistencia a antibióticos, también llevan para muchas otras funciones, tal como, la resistencia a metales pesados, la producción de β -galactosidasa ...

La mutagénesis con transposones permite la identificación de la información genética afectada, mediante la localización del transposón. Existen transposones que están al mismo tiempo fusionados con genes reporteros, cuya actividad bioquímica es fácil de identificar, como son los genes de la β -galactosidasa y la β -glucoronidasa.

El rango de tamaño de los transposones es muy grande. Muchos de los transposones están compuestos por secuencias IS, que son las responsables de su capacidad de transposición, y al mismo tiempo con una secuencia de DNA responsable del fenotipo, pero que no es necesaria para la transposición (transposón compuesto). Aunque son muy variables en cuanto a su estructura, los transposones se pueden definir como unidades autocontenidas que codifican para una o mas funciones y que regulan su actividad de transposición. Los pequeños elementos transponibles, las ISs, codifican solo los determinantes genéticos involucrados en la regulación y promoción de la transposición. Los elementos más grandes (Tn), codifican determinantes genéticos adicionales, tal como, resistencia a antibióticos, funciones de bacteriofagos o nuevas capacidades metabólicas [28].

Los transposones inducen mutación.

En 1977, Kleckner *et al.* anticipó muchas de las propiedades de los transposones que pueden ser de gran utilidad para los genetistas. La construcción de transposones modificados permitió usos más elaborados de los que se pensaban.

Los transposones tienen varias ventajas durante la construcción de mutantes, en comparación con otros mutágenos[28]:

- Frecuencia de mutación alta, en comparación con otros agentes mutagénicos. Si se asume que la inserción es aleatoria, la probabilidad de mutación para un gen determinado es igual a la proporción, en tamaño, de este gen en comparación con todo el genoma.
- Muchos elementos transponibles pueden aumentar la actividad de la transcripción de genes, a través de promotores móviles.
- En muchos de los casos, muestran una sola inserción por célula, quitando el riesgo de obtener dobles mutantes.
- La presencia del transposón cercanamente asociado al gen mutado, proporciona caminos directos de selección, ya sea genéticamente (usando un marcador en el transposón) o bioquímicamente (usando al transposón como una sonda).

Entre los elementos transponibles, los mejores candidatos para la mutagénesis por transposición son esos que son aleatorios y con inserciones estables.

Plásmidos.

Los plásmidos se consideran elementos facultativos, de replicación autónoma, auto-transferibles, muchos son circulares, otros abiertos donde una de las cadenas está es-

cindida, superhelicoidales de doble cadena de DNA, pero también los hay lineales de cadena sencilla. Sus tamaños son extremadamente variables, desde cientos de pares de bases a muchos miles de pares de kilobases. El porcentaje contenido de G+C es variable. Pueden contener genes para una gran variedad de rasgos fenotípicos, tal como, la resistencia, la virulencia, o actividades metabólicas, aunque algunos plásmidos contienen genes que confieren un fenotipo no detectable, por eso son llamados “crípticos” [29].

Por esta razón en estudios modernos, los plásmidos tienen un gran interés médico, ecológico y práctico, y son usualmente investigados debido a los fenotipos que confieren a la bacteria portadora. En tales estudios, los análisis de los plásmidos son combinados con el Southern blotting e hibridación con sondas específicas de DNA para determinar la localización de los genes de interés, p.e. genes de resistencia a antibióticos y genes para toxinas.

Se sabe que los plásmidos se pueden replicar en muchas de las bacterias tipo Gram⁻, generalmente en una o pocas bacterias hospederas, de la misma especie o relacionadas. Pero también están los plásmidos promiscuos, que tienen un amplio rango de especies, hecho que les da muchas ventajas para numerosos propósitos.

Los plásmidos contienen orígenes específicos de replicación, que son susceptibles a regulación, y las funciones necesarias para la regulación. La replicación de un plásmido se puede sincronizar con la división celular. Los plásmidos son dependientes (en diferentes grados) de su hospedero para replicarse, ya que muchas estructuras necesarias para este proceso son codificadas por el hospedero. Existe un reconocimiento (autorización de replicación) y de eso depende el rasgo de hospedero del plásmido. La determinación del rango de hospedero puede involucrar proteínas implicadas en la replicación [29].

Un estudio completo de la replicación requiere principalmente: un análisis de *oriV*, del origen de replicación, de las proteínas implicadas, genes *rep*, genes *cop* que determinan el número de copias y genes *inc* de incompatibilidad [29].

Muchos plásmidos promueven su transferencia autónoma a una bacteria de la misma o diferente especie, desprovista de una copia del mismo plásmido, aunque pueda o no replicarse. Algunos plásmidos -muchas veces muy pequeños- poseen un *oriT* (origen de transferencia) pero sin su completa región *tra* (transferencia). Dicha falta debe de ser completada por su respectivo plásmido conjugativo [29].

Algunos plásmidos (autotransferibles o conjugativos) tienen la habilidad de transferir copias de ellos mismos a otras cepas bacterianas o especies; Este rasgo es codificado por los genes *tra*. Además, algunos plásmidos son capaces de autotransferirse, pero necesitan utilizar las funciones *tra* de plásmidos conjugativos presentes en la misma cepa bacteriana para garantizar que ellos pasen a otras cepas y especies.

La caracterización de los plásmidos presentes en las bacterias aisladas ha sido utilizada en diferentes estudios, aunque ha decrecido el uso de los análisis plasmídicos en algunos campos, basándose en el hecho de que algunos plásmidos pueden ser relativamente inestables para caracterizar a una cepa (en comparación con el cromosoma bacteriano), ya que pueden ser transferidos horizontalmente entre las cepas bacterianas de especies relacionadas, o bien, pueden perderse de la cepa bacteriana en ausencia de una presión de selección.

Diferentes métodos han sido desarrollados para la extracción, purificación y análisis de plásmidos de bacterias. En los métodos, iniciales la bacteria era lisada y el plásmido de

DNA era separado del DNA cromosómico por ultracentrifugación usando un gradiente de densidad de cloruro de cesio-bromuro de etidio. Sin embargo, éste método es muy tardado y no es realmente aplicable para el análisis de un gran número de muestras, y ha sido sustituido por rápidos métodos a pequeña escala que son actualmente utilizados rutinariamente en muchos laboratorios.

La bibliografía actual muestra una gran variedad de “kits” comercialmente disponibles para la extracción de plásmidos de DNA. La principal razón para la abundancia de estos *kits* ha sido la rápida expansión de las técnicas de DNA recombinante en los diversos laboratorios: Muchos de éstos *kits* son desarrollados para permitir una rápida extracción de pequeños plásmidos o cósmidos recombinantes multicopia de laboratorios que trabajan con cepas de *E. coli*.

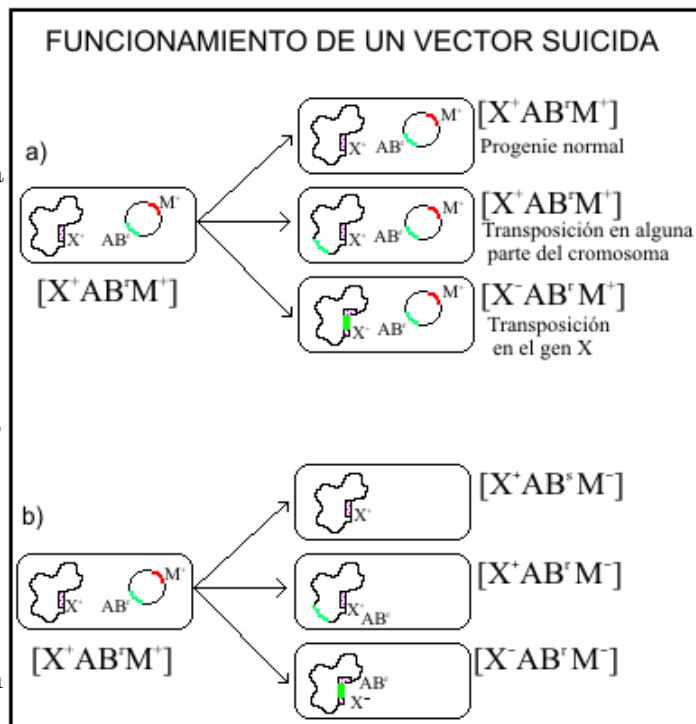
Vectores suicidas.

Para llevar a cabo una mutagénesis por transposición, uno debe liberar el transposón para que se incorpore a las células, de tal manera que, solamente esas que han adquirido estabilidad sean las seleccionadas. En otras palabras, el vector usado para introducir el transposón debe desaparecer dentro de la célula, una vez hecha la transposición. Tales vectores son los llamados “suicidas”.

Se ha creado un vector suicida para *E. coli*. Éste es un derivado del fago λ , que porta dos mutaciones que previenen la lisogenización y la replicación lítica, y ha sido construido por adición de un transposón Tn5 o un Tn10. Estos fagos pueden replicarse en cepas de *E. coli* que posean un fuerte represor, pero actúan como vectores suicidas en cepas no represivas. Muchas otras estrategias han sido desarrolladas para otras especies[28].

Funcionamiento de un plásmido suicida:

- a) Bajo condiciones permisivas o en una cepa permisiva, el vector (plásmido) se replica coordinadamente con la célula. Las células aparecen como AB^r (con un transposón que lleva genes de resistencia contra antibióticos AB), M^+ (con un marcador específico en el vector), y donde puede o no el transposón moverse al cromosoma.
- b) Bajo condiciones no permisivas o cepas no permisivas, el vector no puede replicarse, y la copia original se pierde como se observa con la pérdida del carácter M.



Cuando la transposición ya ocurrió, las células mutantes AB^r pueden ser seleccionadas. Una mutación particular en el gen X, puede volver a la célula X^- , y también pueden ser seleccionada de manera directa o indirecta[28].

Movilización de un plásmido no replicativo.

Un vector suicida puede ser como el usado en la movilización de plásmidos no replicativos, y esta basado en plásmidos promiscuos conjugativos modificados, los cuales, no pueden ser mantenidos en hospederos que no sea *E. coli*. Por ejemplo, reemplazando el origen de replicación por uno más estrictamente específico para *E. coli*. El plásmido resultante puede conjugarse, pero no replicarse en el hospedero, comportándose como un vector suicida para cualquier transposón insertado[28].

Así mismo, si el *oriT* de un plásmido promiscuo conjugativo o movilizable se inserta dentro de un plásmido que lleva un transposón y que es específico para *E. coli*, la construcción puede ser transferida dentro de cualquier bacteria Gram⁻ receptora, proporcionando funciones de transferencia que están disponibles en la cepa donadora[28].

Mantenimiento de plásmidos inestables.

En algunas especies, los plásmidos pueden promover la conjugación pero no se replican establemente, ellos son plásmidos suicidas naturales. Los plásmidos inestables pueden deberse por la presencia de una mutación en la maquinaria de replicación.

La utilización de Tn5 ha sido útil en cepas de *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Erwinia herbicola* y *Erinia chrysanthemii*, aunque el vector no es estable en otras cepas o especies, tal como *Pseudomonas*[28].

Utilidad de la mutagénesis con transposición.

Además de las ventajas antes mencionadas, la mutagénesis por transposición es especialmente interesante en algunas situaciones experimentales[28], por ejemplo: Cuando la mutación de interés no confiere algún fenotipo selectivo. La alta frecuencia de mutantes obtenidos por la inserción de un transposón es especialmente desventajosa cuando la mutación no muestra un fenotipo fácilmente detectable. El fenotipo deseado es buscado indirectamente entre todas las clonas mutadas, por ejemplo, esas que han adquirido la estructura del marcador del transposón.

Existen numerosos ejemplos de relaciones planta-bacteria, en donde la selección es un proceso muy largo. En trabajos hechos en *Rhizobium*, se es capaz de aislar entre 400 células con una mutación aleatoria de Tn5, mutantes *Nod-* o *Fix-*. Donde, con mutaciones clásicas, se pueden necesitar obtener hasta 10^4 mutantes, para obtener los mismos resultados.

También, cuando las cepas estudiadas no siempre se pueden mutar con métodos clásicos. Esto pasa con *Azotobacter beijerinckii*, que no se pueden obtener mutantes metabólicos a través de métodos clásicos, pero por transposición con Tn76 se han podido obtener mutantes auxotróficas y *Nif⁻*. Aunque Tn5 es inestable en esta cepa.

Protocolo de mutagénesis por transposición.

Preparación de la cepa de *E. coli* Tn5-Gus para la cruce

. Primero se pone a crecer en una caja de Petri con medio sólido de cultivo LB+Nm₆₀, durante 2-3 días, la cepa de *E. coli* que lleva el minitransposón. Como el minitransposón acarrea información para sintetizar una enzima denominada fosfoneomicintransferasa, que actúa pegándole un grupo fosfato a la kanamicina o a la neomicina e inactivando a estos antibióticos, la cepa de *E. coli* que contiene dicho transposón obtiene la capacidad de resistencia ante estos antibióticos.

. Se toma un tubo de ensayo estéril y se le añaden 5ml de medio líquido LB+Nm₆₀. Una vez que haya crecido la cepa de *E. coli* con el minitransposón, se toma un poco del cultivo (con la punta de una asa bacteriológica) y se suspende en el medio de cultivo del tubo de ensayo. Se deja crecer en agitación durante 12 horas a 37°C.

. El siguiente paso es el lavado del cultivo. Es importante este procedimiento porque con él vamos a eliminar el antibiótico presente, que potencialmente mata a las bacterias de *Rhizobium* que todavía no han adquirido el transposón, y con las cuales se van a cruzar. Pasadas las 12 horas, se toma 1ml del cultivo líquido y se coloca en un tubo eppendorf. Se centrifuga por 30 segundos a 13,000 rpm. Se desecha el sobrenadante, y a la pastilla resultante se le añade 1ml de una solución de NaCl al 0.85 % y se resuspende.

Preparación de las cepas de *R. tropici* y *R. etli* para la cruce

. Se ponen a crecer, por separado, en cajas de Petri con medio sólido PY+calcio y durante 2-3 días, las cepas de *R. etli* (CFN42 CNPAF512) y *R. tropici* (CIAT899) que van a ser cruzadas con la de *E. coli* que contiene el transposón.

. Una vez que estén listos los cultivos, se toma un poco de cada uno con la punta de una asa bacteriológica y se colocan en tubos de ensayo esteriles, por separado, que contengan cada uno 5ml de medio líquido de cultivo PY+calcio. Se suspenden los cultivos por medio de agitación y se dejan crecer por 12 horas a 30°C en agitación.

. Se toma 1ml de cada cultivo y se depositan en tubos eppendorf.

Cruza

. Se prepara una caja de Petri con medio sólido PY+calcio.

. Se divide en 3 partes la caja:

-En una parte se colocan con una micropipeta 50µl del cultivo de *E. coli* previamente lavado, tiene la función de control.

-En otra parte se colocan 50µl de los cultivos de *R. etli* *R. tropici*, también sirven de control.

-Para la tercera parte, se colocan en un tubo eppendorf 50µl del cultivo de *E. coli* y 150µl de los cultivos de *R. etli* *R. tropici*, se agita por un momento para hacer homogénea la mezcla, y las bacterias de *E. coli* y *Rhizobium* se pongan en contacto. Se depositan los 200µl en la caja de Petri.

. Se dejan secar por unos 5 minutos los cultivos inoculados y se después se coloca la caja

de Petri de manera invertida en una estufa a 30°C. Se deja crecer la cruz y los controles por 14 horas.

Selección

. Pasadas las 14 horas, se revisan los controles, que hayan crecido y que no estén contaminados. Si esto es así, se toma toda la cruz con una asa bacteriológica y se resuspende en 2ml de una solución de NaCl al 0.85 %.

. Se hacen diluciones de 10^0 a 10^{-3} .

. Lo siguiente es hacer una selección de las bacterias de *Rhizobium* que hayan adquirido el transposón. Para ello, de cada una de las diluciones se toman 100 μ l y se depositan en cajas de Petri con medio PY + calcio + Nm₆₀ + Nal₂₀, y se dejan crecer a 30°C de 3-4 días. Para las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} se ponen 18 cajas, para la dilución 10^{-3} se inoculan 3 cajas por cruz.

La razón por la cual se añadió ácido nalidíxico fue para eliminar a las bacterias de *E. coli* presentes, ya que ellas no son resistentes a este antibiótico. La neomicina se añadió para eliminar a las bacterias de *Rhizobium* que no hayan adquirido el minitransposón. De esta manera, crecieron en la placa sólo las bacterias de *Rhizobium* mutantes que adquirieron el minitransposón, y por lo tanto, la capacidad de ser resistentes a la Nm.

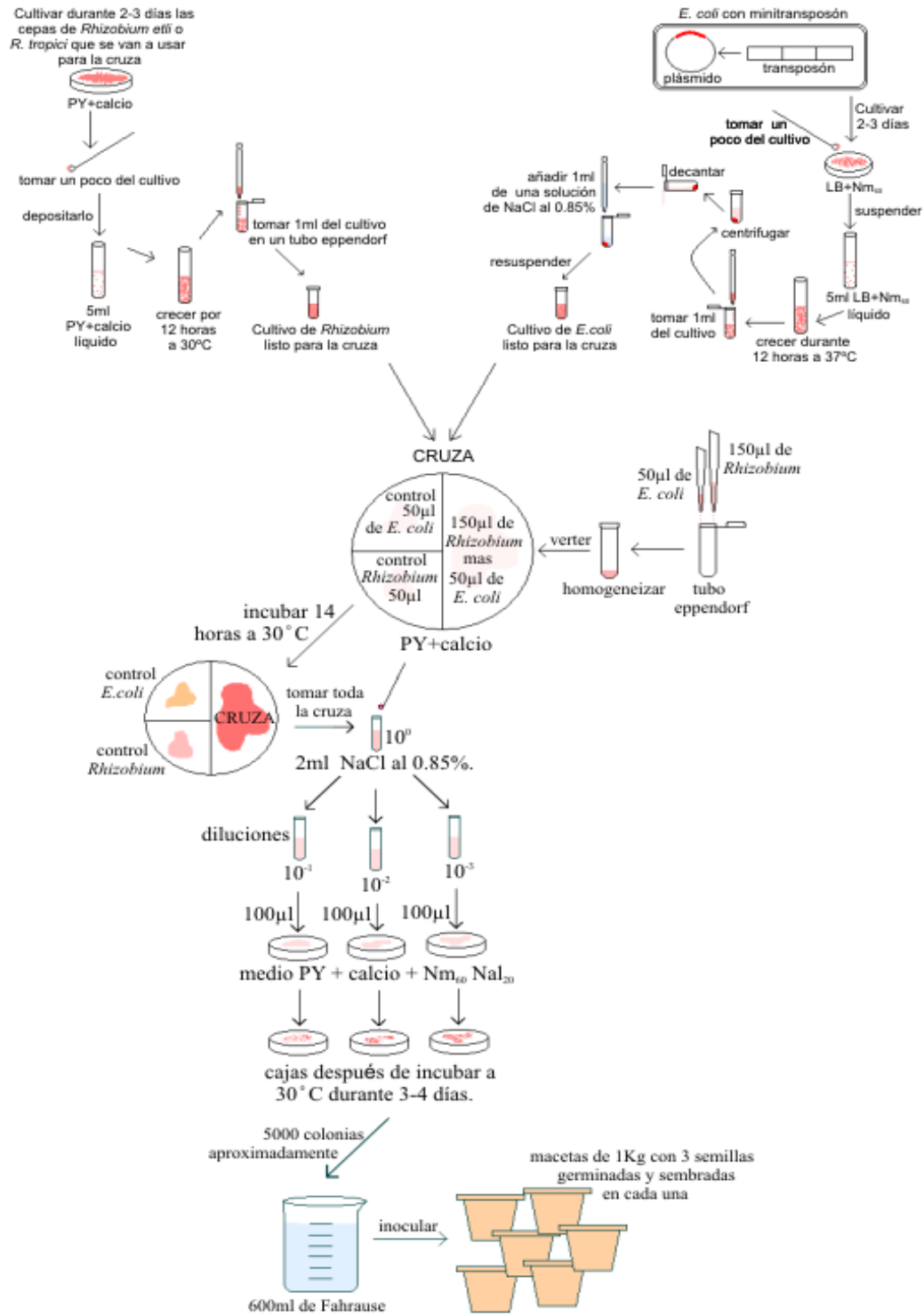
Inoculación

. De las colonias mutantes de *Rhizobium* que se obtuvieron (3951 para CNPAF512, 5840 para CFN42, 13280 para CFN42(2), 7774 para CIAT899), se tomaron aproximadamente 5000² (y todas las CNPAF512), se suspendieron en 600ml de solución Fahrause y se inocularon 18 plántulas de frijol (Apéndice V).

La nodulación de las plantas se revisó en 3 semanas (18 días), de la misma manera en la que se venía haciendo (apéndice IV).

²Debido a que *Rhizobium* tiene cerca de 5000 genes, y si tomamos en cuenta de que la transposición es en teoría aleatoria, estaríamos tomando, en número, una mutante por cada gen.

MUTAGÉNESIS POR TRANSPOSICIÓN



Bibliografía

- [1] Debouck, D. G. 1991. Systematics and morphology. En Schoonhoven, A. Van., O. Voysest (ends.). Common beans: Research for crop improvement. C.A.B. Int. Wallingford, Reino Unido y CIAT, Cali, Colombia. pp 55-117.
- [2] <http://www.invdes.com.mx/suplemento/antiores/Abril2002/htm/genoma.htm>
- [3] <http://www.ams.rdg.ac.uk/microbiology/images/beans2.jpg>
- [4] <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/webb/BOT410/Roots/RootSymbioses.htm>
- [5] <http://www.monografias.com>
- [6] <http://www.isv.cnrs-gif.fr/ak/images/web.gif>
- [7] http://www.chem.ox.ac.uk/vrchemistry/energy/Page_24.htm
- [8] <http://www.2.uah.es/biomodel/biomodelanim/elfo/electrof.txt.htm>
- [9] <http://cecaedesu.semarnat.gob.mx>
- [10] <http://www.geocities.com/bio135a/electroforesis.htm>
- [11] C. J. Bécquer. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. Revista Biológica. Vol. 18. No. 1, 2004.
- [12] Kaplan y Kaplan. *Phaseolus* in archeology. Gepts, P. (Ed). Genetics Resources of *Phaseolus* beans. Kluwer, Dordrecht Netherland. 1988. pp. 125-143.
- [13] Debouck, et., al. 1993. Genetic Diversity and Ecological distribution of *Phaseolus Vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America. Econ. Bot. 47 (4): 408-423.
- [14] Escalante E. J. Alberto y J. Kohashi Shibata. 1993. El rendimiento y el crecimiento del frijol. Manual para toma de datos. Centro de Botánica. Colegio de postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 84 páginas.
- [15] Ballesteros Lozano, 1982. Tesis: Efecto de exudados de raíz de diferentes especies en la transpiración de *Phaseolus Vulgaris*. 63 páginas
- [16] Agustino Martínez Antonio y Gloria Soberón Chávez, 2002 El Complejo Lenguaje de las Bacterias. Ciencia. Enero-Marzo. pp. 60-67.
- [17] Richard Losick y N. Louise Glass, 1999. Growth and Development. Conversing with the microbes. Current Opinion in Microbiology. 2:579-581.

- [18] Kevin P. Smith, Jo Handelsman y Robert M. Goodman. Genetic Basis in Plants for Interactions with disease-suppressive Bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Agricultural Sciences. Vol. 96, pp. 4786-4790, April 1999.
- [19] Brian Staskawicz y Martín Parniske, 2001. Biotic Interactions Genomic Approaches to interactions of plants with pathogens and symbionts. Current Opinion in Plant Biology. 4:279-280.
- [20] Daniels, et al. The *cin* Quorum Sensing Locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 Affects Growth and Symbiotic Nitrogen Fixation. J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 1, 462-468, January 4, 2002
- [21] Rhizobium-plant signal exchange. Robert F. Fisher y Sharon R. Long. Nature 357. June, 1992. 655-660.
- [22] Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features?. Katharina Pawlowski and Ton Bisseling. The Plant Cell, Vol. 8, October 1996. 1899-1913.
- [23] Nodulation of Legumes by Rhizobium: The Recognized Root?. Downie y Johnston. Cell, Vol 47, 153-154, October 24, 1986.
- [24] Batallas Microscópicas. Martínez-Romero y Silva-Sánchez. ¿Como ves?. Año 6, número 66, mayo 2004.
- [25] González, J. y Lluch. 1992. Biología del nitrógeno. Interacción Planta-Microorganismo. Ed. Rueda. Madrid. España.
- [26] Jarvis SC, Jones LHP, Hopper MJ. 1976. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. Plant and soil 44:179-19.
- [27] Mayea, S.; Carone, Margarita; Novo, R.; Boado, Isabel; Silveira, E.; Soria, Miguelina; Morales, Yolanda y Valio, A. 1998. Microbiología Agropecuaria. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. pp 156-178. nez Viera, 1986.
- [28] Prokaryotic Genetics, genome organization, transfer and plasticity. Joset Francoise and Guespin-Michel Janine. Editorial Blackwell Science. USA. 1993
- [29] Molecular Cloning a Laboratory Manual. Joseph Sambrook and David W. Rusell. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición. Vol. 3. 2001.
- [30] Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos de su aplicación. Luisa Anaya, Javier Espinoza-García y Rocío Cruz-Ortega. Editorial Plaza y Valdéz. Abril, 2001. México D.F.
- [31] Aportaciones a la Biología de la Fijación del Nitrógeno Atmosférico. Manuel Mejias Guijo, et al. Editorial Secretariado de publicaciones. Sevilla, España, 1991.
- [32] Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. Somasegaran, Padmanabhan. New York 1994.
- [33] Manual Técnico de la Fijación Simbiótica de Nitrógeno: Leguminosa-Rhizobium. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 1995.
- [34] Manual de Laboratorio de Ecología microbiana. José Nasario Félix Soto. Instituto Politécnico Nacional. México, 1996.
- [35] Molecular Biology of the Cell. Bruce Alberts, et al. Ediciones Omega. España.

- [36] Plant-Microbe interactions: A receptor in symbiotic dialogue. Herman P. Spaink. *Nature* 417, June 2002. 910-912.
- [37] Poblaciones de Rizobia nativas de México. Esperanza Martínez-Romero. *Acta Zool. Mex.*(n.s.) Número especial 1: 29-38 (2001).
- [38] *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Kassem Alef. Academic Press. 1995.