



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Caracterización de una cepa de *Rhizobium tropici* como probable modelo para estudios de endosimbiosis dirigida”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GRACIELA MENDOZA SALINAS



Ciudad Universitaria, CD.MX, 2022



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. José Pedraza Chaverri
VOCAL: Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
SECRETARIO: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
1er. SUPLENTE: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
2do. SUPLENTE: Dra. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 115, Departamento de Bioquímica
Edificio E, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México

Graciela Mendoza Salinas.
(Sustentante)

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
(Asesor)

Agradecimientos

A mis padres y familia por haber sido mis primeros maestros en la vida.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las instalaciones, recursos y conocimientos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” por la beca otorgada.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento para llevar a cabo la presente tesis mediante el proyecto UNAM-DGAPA-PAPIIT IA208121 “Caracterización del transporte de calcio mitocondrial en la fisiología de *Arabidopsis thaliana*”

A los miembros del honorable jurado: Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodriguez y Dr. José Pedraza Chaverri por sus valiosas observaciones y sugerencias en la culminación de la presente tesis.

Al Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo, permitiéndome descubrir nuevos horizontes en la investigación bioquímica y de igual manera por su incondicional apoyo en la realización de la presente tesis.

A la Dra. Ma. del Rosario Morales y a su equipo de laboratorio por brindarme su apoyo y la oportunidad de realizar mi servicio social.

A la Dra. Gloria Gutiérrez por brindarme la oportunidad de aprender de sus valiosos conocimientos y apoyar a la presente tesis.

A la Dra. Bertha González y al Dr. Caspar Chater por las cepas otorgadas.

A mis compañeros del laboratorio 115 del Departamento de Bioquímica del Edificio E por sus valiosas observaciones y compartir su conocimiento.

A mis maestros y compañeros que enriquecieron mi mente con sus conocimientos, en especial a aquellos que me influenciaron a amar la ciencia.

A los verdaderos amigos quienes están en los momentos felices pero sobre todo a quienes me acompañan en los más difíciles.

A toda aquella persona que me apoyó y confió en mí.

Dedicatoria

Dedico este escrito a mi querida familia quienes siempre me han motivado y a quienes admiro.

Con amor a mi abuelita Graciela † quien me enseñó a observar la vida mediante los ojos de la felicidad, de igual manera a mi abuelito Rafael por seguir enseñándome a cosechar.

A mi bella madre Beatriz quien siempre creyó en mis sueños y a mi padre Eduardo quien me hacía reír de pequeña.

A mi compañero de risas mi hermano Alex quien me apoya incondicionalmente.

A mi tía Flor por cuidarme de pequeña quien tiene mi confianza.

A mi tía Eugenia quien me alimentaba y me enseñaba a mejorar aprendiendo de sus valores.

A mi tíos y tías Lázaro, Selene, Luz, Rafa, Víctor, Isa, Julio, Iván, Juan, Fabiola, Enrique y Norma por enseñarme a reír y a seguir adelante.

A todos mis primos quienes son como mis hermanos por dar alegría y recordarme que la vida es bella.

A mis perritos Mango y Dalila por su valiosa compañía al desvelarse junto a mí durante las horas de estudio.

Finalmente, a mi gatita Ponik quien me impulsó y motivó a ayudar a los seres vivos necesitados.

Definiciones de abreviaturas

aa: Aminoácidos

ABT: Azul de bromotimol

Ac nal.: Ácido nalidíxico

ADP: Adenosín difosfato

Amp: Ampicilina

ATP: Adenosín trifosfato

CaCl₂: Cloruro de calcio

cbp: Cuanto baste para

CO₂: Dióxido de carbono

Cox2 : Citocromo oxidasa

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño

DNA: Ácido desoxiribonucleico

E³: Modelo de Imachi y cols Entangle Engulf Endogenize

EPR3: Exopolysaccharide protein receptor 3 (Receptor de proteína exopolisacárido)

ESCRT: Complejo de clasificación endosomal requerido para la maquinaria de transporte

EPS: Exopolisacáridos

FISH: Hibridación in situ por fluorescencia

GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente)

H₂: Hidrógeno molecular

HM: Transferencia de Hidrógeno Metano

H₂O: Agua

HS: Transferencia de Hidrógeno Azufre

H₂S: Ácido sulfhídrico

KH₂PO₄: Dihidrogen fosfato de potasio

LPS: Lipopolisacáridos

LysM: Motivos de lisina

MAMPs: Patrones moleculares asociados a microorganismos

MAPK: Vía de señalización MAP cinasa

Medio YP: Medio Yeast Peptone

Medio YEMA: Medio Extracto de levadura, Manitol y Agar.

MgSO₄: Sulfato de magnesio

N₂: Nitrógeno molecular

NaCl: Cloruro de sodio

NaOH: Hidróxido de sodio

NF-Pathway: Vía de factores de nodulación

NFR: Nod factor receptor (Receptor relacionado a factores de nodulación)

NH₃: Amoniac

NH₄ +: Amonio

NO₃: Nitrato

NSF: Factor sensible a la N-etilmaleimida

O₂: Oxígeno molecular

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PEG: Polietilenglicol

PRRs:Receptores de reconocimiento de patrones

pSym:Plásmido simbiótico

S: Azufre

SI: Sistema Inmunitario

SNARE: Receptores de proteínas de fijación soluble de NSF

SYMRK: Symbiosis Receptor like-Kinase (Receptor simbiótico tipo cinasa)

TIRF: Microscopía de fluorescencia total de reflexión

TACK: Superfilo que comprende a Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota y Korarchaeota

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Endosimbiosis en la eucariogénesis	3
3.1.1 Modelos e hipótesis de eucariogénesis	6
3.2 Ventajas de eventos endosimbióticos	10
3.2.1 Ventajas adaptativas	10
3.2.2 Endosimbiosis naturales y sus ventajas	12
3.3 Estrategias de endosimbiosis inducidas	16
3.3.1 Inoculación por aspersion foliar y disolución en suelo	17
3.3.2 Inoculación por centrifugación	18
3.3.3 Inoculación por técnicas de auxotrofia y fusión inducida por PEG	19
3.4 Simbiosis rizobio-legumbre	26
3.4.1 Especies rizobiales	26
3.4.2 Ejemplos de interacciones simbióticas	27
3.4.3 Compatibilidad rizobio-legumbre	28
3.4.4 Etapas de nodulación	33
3.5 Inducción de endosimbiosis	34
3.5.1 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 como simbionte	34
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVOS Y METAS	38
5.1 Objetivo General	38
5.2 Objetivos Particulares	38
5.3 Metas	39
6. MATERIALES	39
6.1 Material microbiológico	39
6.2 Medios microbiológicos	39
7. METODOLOGÍA	40
7.1 Recopilación de información relevante en la literatura sobre bacterias rizobiales	40
7.2 Cultivo del material bacteriano	41

7.3 Microscopia del material bacteriano	41
7.4 PCR de nifH y electroforesis en gel de agarosa	42
7.5 Extracción de plásmidos y electroforesis	42
7.6 Ensayos de nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i>	43
8. RESULTADOS	43
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	56
11. PERSPECTIVAS	57
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
13. ANEXO	67

1. RESUMEN

Las bacterias fijadoras de N₂ confieren a numerosas plantas la capacidad de sintetizar compuestos nitrogenados con alto valor nutricional. Los mecanismos celulares, moleculares y genéticos a través de los cuales se ejecuta la endosimbiosis entre bacterias fijadoras de N₂ y las células hospederas vegetales han sido ampliamente estudiados. Sin embargo, la endosimbiosis con bacterias fijadoras no ocurre en forma natural en múltiples especies vegetales de interés económico. El objetivo de la presente tesis es caracterizar a una cepa rizobial (*Rhizobium tropici* CIAT 899) para su probable posterior utilización como endosimbionte. El presente trabajo también plantea revisar en la literatura las probables ventajas a nivel genético y biológico de la endosimbiosis. En esta tesis se identificó una probable cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899 usando medios de cultivo selectivos y diferenciales así como identificación por tinción de gram, PCR y extracción de mega plásmidos. Adicionalmente se llevó a cabo una prueba piloto de ensayos de nodulación en *Phaseolus vulgaris*. Se encontró que la cepa es capaz de crecer en medios selectivos para *Rhizobium* y presenta identificación positiva por PCR. Al infectar plantas de *Phaseolus vulgaris* con la cepa obtenida, se observaron diferencias significativas en el crecimiento del tallo y de raíz, así como estructuras similares a nódulos de raíz. Los resultados obtenidos sugieren que la cepa obtenida es *Rhizobium tropici* CIAT 899, la cual podrá ser utilizada para estudios de endosimbiosis.

2. INTRODUCCIÓN

Los organelos son estructuras subcelulares altamente especializadas. Estos desempeñan funciones importantes a nivel genético, metabólico y estructural (Satori y cols 2013). El origen de las células eucariotas es motivo de constantes estudios. Sin embargo, numerosos autores convergen en el modelo de endosimbiosis E³ (Imachi y cols., 2020). En este modelo se propone el establecimiento de una simbiosis dual entre una arquea Asgard -capaz de degradar aminoácidos- y una alfa-proteobacteria aerobia organotrófica capaz de reducir el O₂ dañino para la arquea **Fig. 1** (Lopez-Garcia y Moreira, 2020). Esta alfa-proteobacteria es engullida a medida que el complejo avanza a zonas con mayor concentración de oxígeno y se diferencia en bacteroide (Imachi y cols., 2020; Lopez-Garcia-Moreira, 2020). En términos evolutivos, este proceso pudo dar origen a las mitocondrias (Zachar y Boza, 2020).

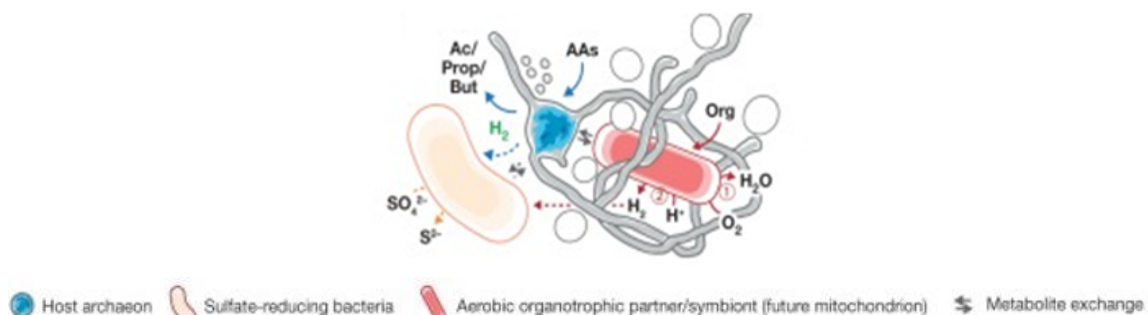


Figura 1. Modelo Entangle-Engulf-Endogenize. El modelo se basa en la interacción de 3 microorganismos una **arquea del tipo Asgard** que degrada aa en ácidos de cadena corta e H₂, una **α-proteobacteria organotrófica aeróbica** y una **bacteria reductora de sulfato** que utiliza el H₂. En esta interacción la **Arquea** enreda con sus estructuras tipo-tentáculo a la **bacteria** al ir aumentando en su entorno la concentración de O₂ (tóxico para la Arquea), posteriormente la engulle o fagocita y finalmente se desarrolla una especie de endosimbiosis. Figura modificada de Imachi y cols., 2020.

Dentro de las alfaproteobacterias se encuentran géneros como *Rhizobium*, que aglomera a bacterias fijadoras de nitrógeno capaces de formar relaciones simbióticas con leguminosas. Esta asociación ocurre en los nódulos de la raíz (Raza y cols., 2020). Dicha asociación benéfica resulta en la utilización del N₂ del medio ambiente, evitando la contaminación del suelo por contaminantes nitrogenados provenientes de fertilizantes. En la presente tesis se caracterizará una cepa de reciente adquisición con miras a determinar si es genética y biológicamente plausible a utilizar en estudios posteriores como endosimbionte. De igual forma, se espera poder estudiar el metabolismo de bacterias del género *Rhizobium* que en condiciones de endosimbiosis promueven el crecimiento de las plantas y mejoran la germinación de semillas (Igiehon y cols., 2019). Esta cepa fue adquirida debido a su utilización en estudios previos realizados por el Dr. Federico Sánchez Rodríguez, sin embargo, era necesario cerciorarse de la identidad ante su llegada al laboratorio

3. ANTECEDENTES

3.1 Endosimbiosis en la eucariogénesis

En 1967, Lynn Margulis bajo el nombre de Lynn Sagan formuló la hipótesis del origen de la célula eucariota y su evolución, explicando que esta surgió de la integración de organismos procariotas mediante procesos endosimbióticos. Esta hipótesis es mejor conocida como la teoría endosimbiótica (Margulis, 1970). En esta hipótesis, Margulis defendió que el origen de las mitocondrias, plástidos fotosintéticos y estructuras flageladas provenían de ancestros bacterianos.

Sin embargo, solo se comprobaron los orígenes de la mitocondria y los plástidos fotosintéticos, los cuales provienen de una Alfa-proteobacteria y una Cianobacteria correspondientemente (Gray y Doolittle, 1982; Gray, 1992, 2017).

La eucariogénesis representa un evento evolutivo fundamental dando origen a la aparición de las células eucariotas. Se ha entendido que los orígenes de las células eucariotas se encuentran tanto en el dominio Archaea como en las α -Proteobacterias. Sin embargo, no estaba claro de qué ancestros precisos se generaron los eucariotas (Dacks y cols., 2016).

En el año 2015 se identificaron similitudes entre el grupo de arqueas TACK y las células eucariotas mediante estudios filogenéticos (Koonin, 2015). Sin embargo, poco después se dio a conocer el filo de arqueas Lokiarchaeota, cuyos genomas codifican un repertorio de proteínas de firma eucariota las cuales sugieren capacidades de remodelación de membrana (Spang y cols., 2015). Posteriormente, en 2017 se describió que el filo Lokiarchaeota estaba incluido en el superfilo de arqueas Asgard que además incluía a otros denominados Odínarchaeota, Thorarchaeota y Heimdallarchaeota. Los genomas pertenecientes a dichas arqueas codifican proteínas presentes en los eucariotas que se involucran en el tráfico de membranas, la formación del citoesqueleto, el transporte de vesículas y la ubiquitinación de proteínas (Zaremba y cols., 2017). El complejo de clasificación endosomal requerido para la maquinaria de transporte (ESCRT) es esencial y requerido para las funciones del sistema de endomembranas en las células eucariotas.

La aparición de dicho sistema es clave en la evolución durante la eucariogénesis. Se ha proporcionado evidencia que los complejos ESCRT presentes en las arqueas Asgard y en organismos eucariotas están relacionados evolutivamente y son funcionalmente similares, aunque hay una ausencia de endomembranas en estas arqueas parece que el complejo ESCRT fue heredado directamente de un ancestro del tipo Asgard, siendo un componente importante del sistema de endomembranas emergente. (Lu y cols. 2020). Imachi y cols. lograron el aislamiento de una arquea del tipo Asgard relacionada con Lokiarchaeota en las profundidades del mar, llamada *Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum* (cepa MK-D1) **Fig. 2**, la cual tiene la característica de ser anaerobia.

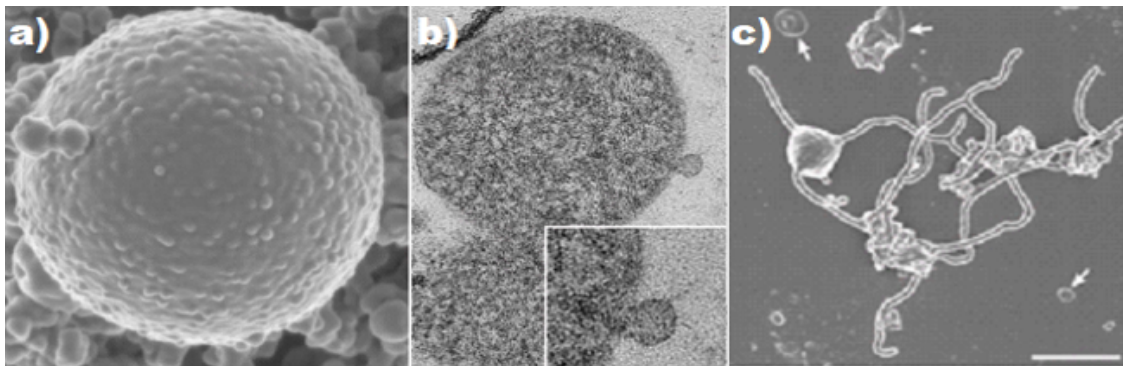


Figura 2. Micrografía electrónica de MK-D1 a) Imagen de una célula MK-D1 vista con microscopía electrónica de barrido b) sección ultrafina de una célula MK-D1 y una vesícula de membrana c) imagen vista con microscopía electrónica de barrido de células MK-D1 que producen protuberancias de membrana de ramificación larga. Imagen modificada de Imachi y cols., 2020. Las flechas indican vesículas de membrana grandes.

Debido al descubrimiento de las arqueas Asgard se ha llevado a proponer modelos de eucariogénesis con más limitaciones que sugieren asociaciones simbiogenéticas entre bacterias y arqueas para establecer interacciones metabólicas que representen ventajas evolutivas (López-García y Moreira, 2020).

3.1.1 Modelos e hipótesis de eucariogénesis

Existen diversas hipótesis y modelos de eucariogénesis que pueden explicar las interacciones entre organismos procarióticos. La hipótesis del hidrógeno **Fig. 3** explica la interacción entre una arquea metanogénica que depende del H_2 y el simbionte una bacteria aeróbica capaz de generar H_2 y CO_2 como producto de su metabolismo. Mediante la transferencia de genes pertenecientes al simbionte se hizo posible la utilización de O_2 por parte del hospedador (Martin y Müller 1998). En cuanto al modelo de Searcy se plantea una simbiosis entre una arquea similar a un termoplasma sin paredes -la cual es capaz de utilizar/respirar azufre S y reducirlo a ácido sulfhídrico H_2S - y el simbionte: Una proteobacteria capaz de utilizar H_2S y oxidarlo mediante fotosíntesis o usando O_2 (Searcy, 2003). En la hipótesis de la sintrofia se propone el origen de la célula eucariota mediante una simbiosis metabólica tripartita involucrando a una arquea metanogénica (futuro núcleo), una delta-proteobacteria fermentativa tipo micobacteria (citoplasma) y una alfa-proteobacteria metanotrófica con versatilidad en su metabolismo (mitocondria) (López-García y Moreira 1998, 2006). Los autores en un inicio se basaron en la transferencia de hidrógeno y metano H_2 pasando posteriormente a un modelo basado en la transferencia de hidrógeno y azufre H_2S . En este escenario ocurre una endosimbiosis de una arquea del tipo Asgard que reside en el interior de una delta-proteobacteria reductora de sulfato (López-García y Moreira, 2020).

Existe otro tipo de modelo denominado de flujo reverso, en este se involucra el flujo de electrones o hidrógeno desde un hospedador tipo arquea organoheterotrófica a un simbiote bacteriano. Sugieren que los representantes de Asgard son principalmente órgano heterótrofos con capacidad variable para el consumo y la producción de hidrógeno (Spang y cols., 2019). Si hablamos de uno de los modelos más recientes encontramos al Modelo **E³** (**Entangle-Engulf-Endogenize**) el cual se sitúa en las profundidades marinas donde el O₂ iba en aumento debido a su producción mediada por las cianobacterias. La arquea establece una simbiosis dual. La primera con una α-proteobacteria utilizadora de O₂ y la segunda con una bacteria reductora de sulfato. En este caso la simbiosis que le confiere el beneficio a la arquea es la establecida con la α-proteobacteria, ya que el O₂ es tóxico para la arquea mientras que esta lo metaboliza. La arquea enreda con sus estructuras tipo tentáculo a esta bacteria a medida que este complejo se acerca a entornos con mayor concentración de O₂. Al hacerse más afín a esta, resulta en un engullimiento o fagocitosis y finalmente en la endogenización de dicha bacteria en la arquea Asgard (Imachi y cols., 2020). Analizando el modelo de Imachi **E³ Entangle-Engulf-Endogenize** se muestra la dependencia que tiene la **arquea** de la **α-proteobacteria** para sobrevivir en ambientes con mayor concentración de O₂. En este modelo la arquea engulle o fagocita a la α-proteobacteria para sobrevivir en entornos oxigenados dando como resultado una ampliación metabólica para el hospedador.

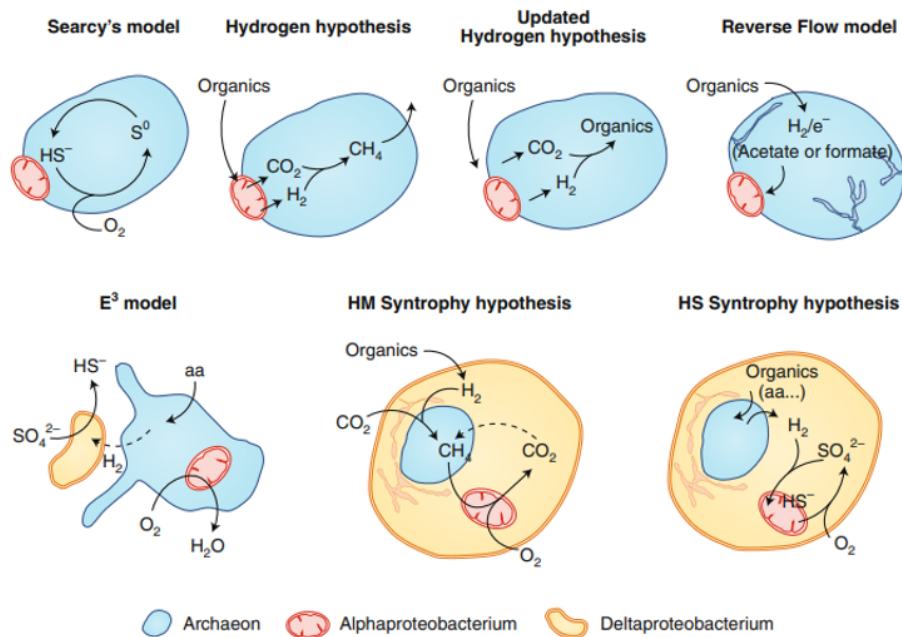


Figura 3. Modelos simbiogénicos de eucariogénesis basados en intercambio metabólico. Figura modificada de Lopez-Garcia y Moreira, 2020. Las flechas sólidas indican intercambio metabólico y la punteada interacción.

Si analizamos los diferentes modelos de eucariogénesis podemos observar que ocurre algo similar puesto que los organismos que residen en el interior de otro están ampliando el metabolismo del organismo original. Si se analiza la **hipótesis de Sintrofia** de López García y Moreira, amplía aún más el metabolismo del hospedador ya que al residir más organismos en su interior obtendría más oportunidades de adaptación y por lo tanto mayores posibilidades de supervivencia. Como se observa en la **Fig 3**, los modelos de eucariogénesis ejemplificados explican el posible establecimiento de la mitocondria como la conocemos, tienen en común que surgen a partir de una simbiosis en la cual el organismo del tipo **α -proteobacteria** reside dentro de otro, lo cual es conocido como endosimbiosis (Zachar y Boza, 2020).

Este evento puede otorgar ciertos beneficios a los organismos hospedadores involucrados puesto que al transferir genes horizontalmente del endosimbionte adquieren una actividad metabólica más amplia (Puri, Butardo y Sumeria 2021). Así como hay hipótesis o modelos de eucariogénesis que pueden explicar el surgimiento de la mitocondria y/o el núcleo, también hay otros que nos hablan del posible surgimiento de otros orgánulos como el cloroplasto. La teoría endosimbiótica de Lynn Margulis también puede explicar cómo el organismo hospedador amplía su metabolismo mediante la endosimbiosis de los cloroplastos haciendo posible la fotosíntesis en algunos organismos eucarióticos **Fig. 4** (Gray y Doolittle, 1982; Gray, 1992, 2017).

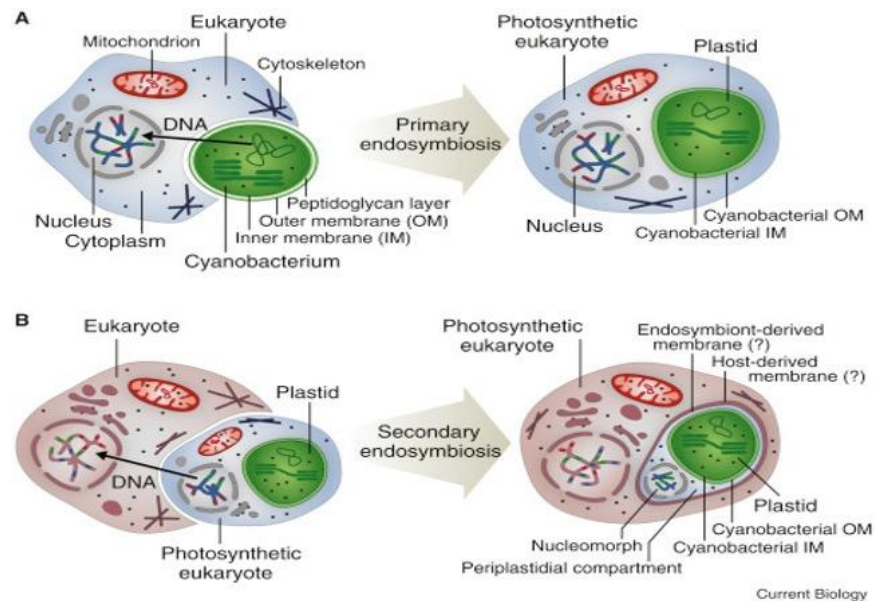


Figura 4. Endosimbiosis y evolución del plastidio.Figura tomada de Archibald, 2015. Las flechas sólidas indican etapas de endosimbiosis.Los orgánulos se señalan con líneas.

3.2 Ventajas de eventos endosimbióticos

3.2.1 Ventajas adaptativas

A partir de los modelos anteriormente mencionados sabemos que la mitocondria y el cloroplasto parecen haber sido adquiridos por eventos endosimbióticos (Zachar y Boza, 2020). Un cambio muy importante en la complejidad de las células procariotas (Guerrero y Margulis, 2013) . En algunos modelos de eucariogénesis se menciona que los organismos procariotas se relacionaron entre sí por cambios en su entorno como en el modelo E³ donde se menciona que el aumento de O₂ propició esta interacción, puesto que la arquea por sí sola no tendría oportunidad de sobrevivir (Imachi y cols., 2020). La hipótesis del hidrógeno considera probables cambios en el entorno ya que considera que inicialmente el complejo se encuentra rodeado de una fuente de H₂ y CO₂ y posteriormente se retira de la fuente de H₂ por lo que la arquea se volvería dependiente del simbiote productor de H₂ (Martin y Müller, 1998). Esto sugiere que la endosimbiosis puede ayudar a los organismos a adaptarse a entornos a los que no está acostumbrado el organismo hospedador. La **Tabla 1.0** indica las ventajas adaptativas sugeridas por Martin, Müller, Imachi y cols. en sus respectivos modelos de eucariogénesis. En general se puede observar que estos se deben a una ampliación de la actividad metabólica por la transferencia de genes endosimbiótica (horizontal) -en la cual se integra el material genético del simbiote en el núcleo del hospedador- (Puri y cols.,2020).

Además de que el organismo hospedador se adapta gracias a esta interacción, este puede obtener beneficios energéticos debido a la ampliación de su metabolismo.

Tabla 1.0 Ejemplos de ventajas adaptativas mediados por endosimbiosis en modelos de eucariogénesis

Modelo o hipótesis	Entorno inicial	Cambio en el entorno	Ventaja adaptativa otorgada por simbionte
Hidrógeno Martin y Müller, 1998	Mayor [H ₂]	Menor [H ₂]	<ul style="list-style-type: none"> • Provee la Fuente de H₂ que necesita la arquea para realizar la metanogénesis. • Adicionalmente utiliza el O₂ al expresar genes provenientes del simbionte aeróbico.
Modelo E³ Imachi y cols., 2020	Menor [O ₂]	Mayor [O ₂]	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad de utilizar el O₂ previamente tóxico para la arquea.

La **Tabla 2.0** condensa los modelos e hipótesis mencionados anteriormente pudiendo destacar a 2 de los orgánulos que encontramos en las células eucariotas los cuales son encargados de proveer energía: La mitocondria y cloroplasto mediante la producción de ATP. Adicionalmente el cloroplasto presenta otros productos bioquímicos derivados del Ciclo de Calvin durante la fotosíntesis.

Tabla 2.0 Ejemplos de orgánulos energéticos adquiridos por endosimbiosis

Orgánulo	Origen	Función	Ventaja
Mitocondria	Endosimbiosis de una <i>α</i>-proteobacteria	Producción de ATP Tolerar O ₂	Ampliación metabólica
Cloroplasto	Endosimbiosis de una cianobacteria	Fotosíntesis y generación de ATP	Ampliación metabólica

En este caso sabemos mediante modelos e hipótesis que la ampliación metabólica es una de las ventajas que puede otorgarse por un organismo que reside en el interior de otro. Teniendo en cuenta los beneficios y ventajas de las endosimbiosis, este fenómeno se ha estudiado como una herramienta para la mejora de estrategias en distintos campos. Para ampliar el conocimiento de las ventajas otorgadas por procesos endosimbióticos, a continuación se analizarán algunas interacciones encontradas en la naturaleza.

3.2.2 Endosimbiosis naturales y sus ventajas

En el laboratorio y en el campo se han aprovechado algunos eventos simbióticos naturales para el desarrollo y crecimiento de cultivos, debido a ciertas limitaciones en su desarrollo. Uno de estos ejemplos es la interacción entre las bacterias endofíticas y una variedad de plantas hospedadoras (Afzal y cols., 2019).

Un ejemplo de estas interacciones se da entre la cepa PsJN de la bacteria *B. phytofirmans* y una gran variedad de plantas como el maíz, tomate, trigo, papa, e incluso la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Sheibani y cols., 2015) (Afzal y cols., 2019). Esta bacteria endofítica promueve el crecimiento del hospedador y muestra efectos beneficiosos en la salud de las plantas como la resistencia a estrés biótico y abiótico (Esmaeel y cols., 2018). Se ha informado acerca de una simbiosis obligada la cual involucra a un parásito nematodo de moscas *Drosophila* llamado *Howardula aoronymphium*, este alberga un simbiote bacteriano en su interior el cual es hereditario maternalmente.

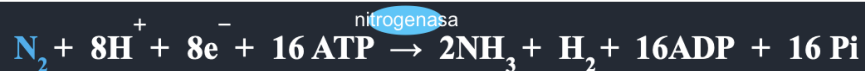
Esta bacteria intracelular no se encontró en moscas que están libres de estos nematodos en contraste con las moscas infectadas con el nematodo las cuales sí contienen al simbiote bacteriano. En su estudio trataron a dichos nematodos con antibióticos lo cual causó una reducción en el éxito de infección del nematodo en las moscas, sugiriendo que la simbiosis bacteria-nematodo promueve resistencia y mejora el éxito de infección (Martinson y cols, 2020).

Otro ejemplo de endosimbiosis encontradas en la naturaleza son los hongos endófitos y diversas especies de plantas. En este caso la planta provee al hongo endosimbionte alimento y protección mientras que este último confiere un potencial adaptativo a las plantas hospedadoras frente a condiciones adversas como la resistencia a estrés biótico y abiótico. (Yan y cols., 2019). Además este favorece el transporte de nutrientes como fósforo, aumento de biomasa y rendimiento del grano (Abello y Kellemu 2006). También se ha reportado que producen metabolitos secundarios, actúan como fitopatógenos e incluso mejoran la resistencia contra insectos (Ancheeva y cols., 2020).

Como se mencionó anteriormente algunos organismos endófitos provocan el aumento de biomasa al igual que ayudan a mejorar el rendimiento de cultivos utilizando mecanismos de favorecimiento de transporte de nutrientes. Uno de los nutrientes más importantes para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos es el nitrógeno. En el caso de las plantas es el mayor componente de la clorofila y es un elemento necesario para las estructuras de construcción siendo un componente vital para las proteínas y enzimas (Hofman y Cleemput 2004).

El nitrógeno se encuentra en forma molecular como N_2 siendo abundante en el planeta Tierra ya que abarca alrededor del 78% del gas atmosférico (NASA., 2020). A pesar de su alto porcentaje en la atmósfera, las plantas no son capaces de absorberlo o asimilarlo en esta forma ya que está unido por tres enlaces ($N\equiv N$; $225 \text{ kcal mol}^{-1}$) y la ruptura de los mismos exige grandes cantidades de energía, en contraste con las sales nitrogenadas principalmente de nitrato NO_3^- y amonio NH_4^+ con las cuales es posible la posterior síntesis de aminoácidos (Reisenauer 1973). Se puede realizar la fijación de nitrógeno biológicamente mediante organismos diazotófos de origen procariota ya sean de vida libre o simbiotes (Mylona y cols., 1995). La interacción que ejemplifica la fijación del tipo simbiótica es la ocurrida entre bacterias rizobiales y plantas leguminosas (Evans y Russell 1971). Con esta interacción se evita o disminuye la utilización de fertilizantes nitrogenados obtenidos a través de procesos como Haber-Bosch el cual utiliza grandes cantidades de energía para obtener nitrógeno mediante la reacción de N_2 con H_2 para la obtención de amoníaco (Raza y cols 2020). Cuando dichas plantas crecen con fuentes de nitrógeno limitado, comienza un intercambio de señalización química para el reconocimiento del rizobio con la raíz de la planta, generando el hilo de infección que conduce a estas bacterias hasta células del cortex, las cuales se dividen hasta la formación de nódulos en los cuales las bacterias rizobiales se internalizan en las células vegetales y pueden fijar nitrógeno (Murray 2011). Es importante mencionar que este reconocimiento es muy específico tanto de especies rizobiales como de las distintas leguminosas

(Vasconcelos y cols., 2020). Dichos organismos poseen un complejo enzimático denominado nitrogenasa el cual genera la ruptura de los enlaces del N₂ reduciéndolo a amoníaco NH₃ (Raza y cols., 2020). Dichos organismos poseen componentes centrales de la enzima como las proteínas NifH, NifD, NifK, NifE y NifN presentes universalmente en organismos fijadores de nitrógeno (Raymond y cols., 2004). Biológicamente también se requiere una gran cantidad de energía (ATP) para llevar a cabo la fijación de N₂ como se observa en la siguiente reacción:



En cuanto a los organismos fijadores de nitrógeno del tipo simbioses encontramos que gran parte de ellos son filogenéticamente proteobacterias las cuales reciben el nombre colectivo de rizobio. Se sabe que el género *Rhizobium* pertenece a la clase de las alfa-proteobacterias (Lloret y cols., 2005) y poseen mecanismos de compatibilidad o evasión del sistema inmunitario ante el hospedador (Clúa y cols., 2018). Recordemos que diversos autores convergen que la mitocondria pudo haber surgido de una alfa-proteobacteria (Lopez-Garcia y Moreira, 2020).

En la siguiente figura **Fig. 5** se aprecian dos ejemplos visuales de endosimbiosis funcionales entre organismos diferentes la primera interacción se trata de una simbiosis relacionada a la fijación de N₂ donde se observan los pelos radiculares de la leguminosa *Medicago truncatula* conteniendo a la bacteria interiorizada *Sinorhizobium meliloti* (Sinharoy y cols., 2016). La segunda endosimbiosis

visualizada se trata del nematodo *Howardula aoronymphium* conteniendo a la bacteria *Symbiopectobacterium* (Martinson y cols., 2020).

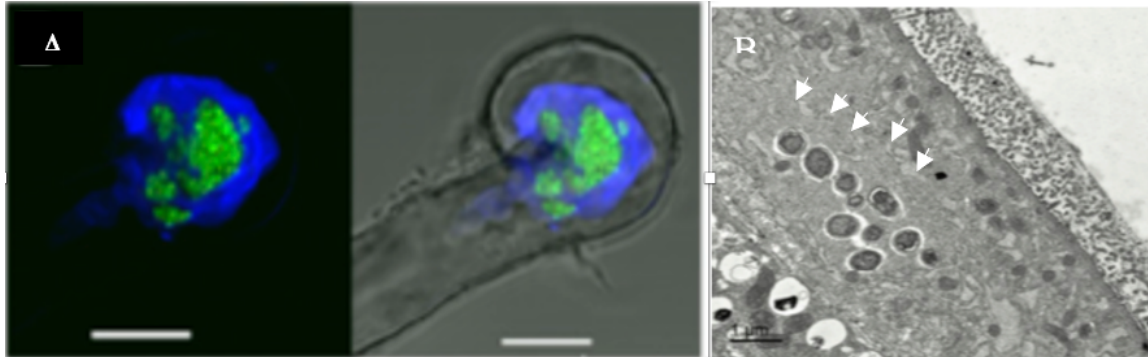


Figura 5. Ejemplos de endosimbiosis funcional entre (A) *Medicago truncatula* y *Sinorhizobium meliloti* (en verde) y (B) *Howardula aoronymphium* y *Symbiopectobacterium* (flechas). Figuras tomadas de Sinharoy y cols., 2016 (A) y Martinson y cols., 2020 (B).

3.3 Estrategias de endosimbiosis inducidas

Como se menciona anteriormente, en la naturaleza se llevan a cabo procesos simbióticos para la supervivencia mejorando así la adaptabilidad y evolución de distintas especies. Para mejorar el conocimiento de estos procesos, se han llevado a cabo ensayos para tratar de emular estas interacciones en el laboratorio. Es importante saber que se pueden imitar endosimbiosis que surgen de procesos naturales, otras en las que un simbiote conocido para ciertas especies se inocule en un hospedador artificial y otras en las cuales ciertas mutaciones de los organismos permitan una simbiosis no establecida anteriormente por lo que se generan nuevos simbiotes y hospedadores. Mediante el uso de estas nuevas técnicas de biología celular es posible estudiar los efectos y beneficios de estas para los hospedadores. A continuación se analizarán algunos ejemplos de

inducciones de endosimbiosis mediante el uso de distintas técnicas en diferentes estudios.

3.3.1 Inoculación por aspersión foliar y disolución en suelo

Se han reportado métodos para la inoculación controlada de algunos endosimbiontes. Uno de estos ejemplos trata de la inoculación del hongo endófito *Beauveria bassiana* en la planta *Phaseolus vulgaris*. Los métodos que utilizaron fueron la aplicación de esporas a las semillas por medio de aspersión foliar o añadiéndolas mediante una disolución en el suelo. La colonización tuvo éxito con ambos métodos. Sin embargo, como se observa en la **Fig. 6** el porcentaje de la colonización dependió de la parte de la planta evaluada y del método de inoculación utilizado (Parsa y cols., 2013).

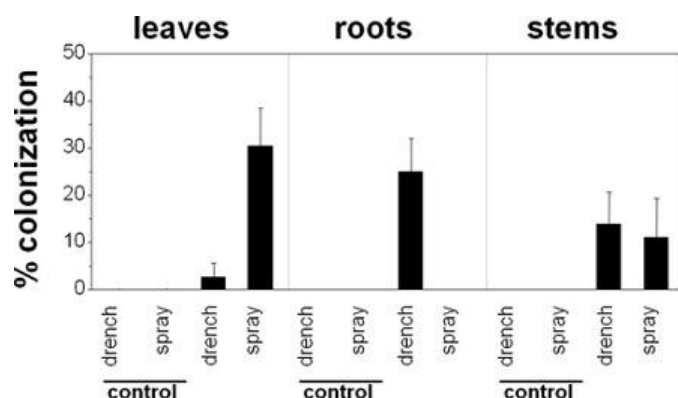


Figura 6. Efecto de los tratamientos de inoculación sobre la colonización endofítica de plantas de *P. vulgaris* por *B. bassiana*. El porcentaje de colonización representa el número de secciones de plantas colonizadas dividido por el número de secciones cultivadas. Figura tomada de Parsa y cols., 2013.

En cuanto a las hojas se observó un porcentaje de colonización mayor con aspersión foliar en comparación del empape por disolución, contrariamente al

porcentaje de colonización en las raíces y en los tallos es mayor por el método de empape por disolución en suelo que mediante la aspersión.

3.3.2 Inoculación por centrifugación

También existen métodos de inoculación artificial de otros simbiontes en organismos con los cuales no interactúan de manera natural. Uno de estos ejemplos es la inoculación de *Wolbachia pipientis* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como hospedador artificial. En este estudio la inoculación del endosimbionte en la levadura del pan fue exitosa. Sin embargo, la levadura perdió viabilidad en las últimas etapas del crecimiento en comparación al control. (Uribe-Alvarez y cols., 2019).

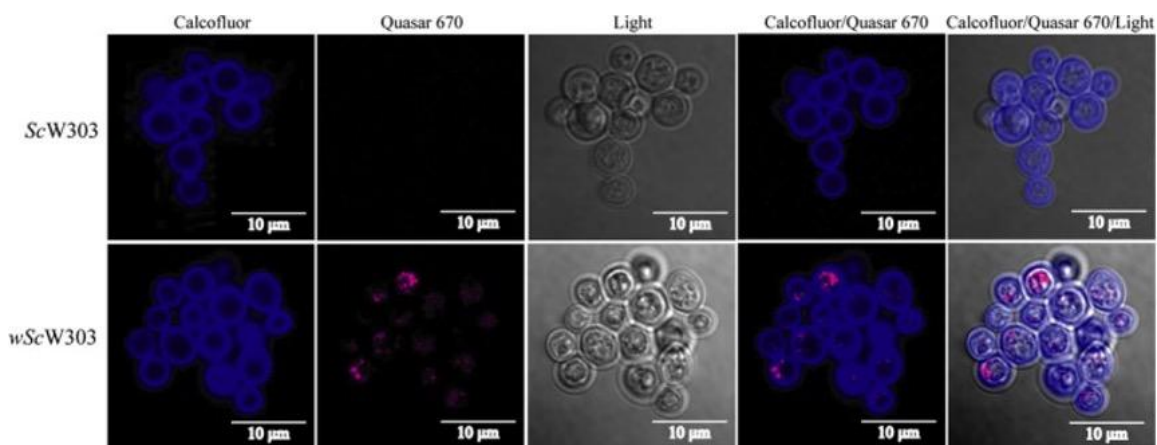


Figura 7. Imágenes de **levadura-endosimbionte** mediante la tinción de **S. cerevisiae** con Calcofluor white y **wAlbB** con Quasar 670. Se marcó la levadura con calcofluor. Tanto las células de levadura no infectadas (ScW303) como las infectadas (wScW303) fueron hibridadas con la sonda específica de *Wolbachia* de ADN_r 16s (Quasar 670, en color **rosa**). Luego, la pared celular de la levadura se tiñó con calcofluor-white (Calcofluor, en color **azul**) para confirmar la endosimbiosis. Se muestran imágenes de fusión para evaluar la presencia de *Wolbachia* dentro de la levadura. Figura tomada de Uribe y cols., 2019.

Se puede apreciar en la **Fig. 7** que la inducción de la endosimbiosis llevada a cabo por Uribe y cols (2019) fue exitosa, ya que la levadura infectada mostró hibridación intracelular con una sonda fluorescente específica para *Wolbachia*, lo que muestra gráficamente que el organismo bacteriano está dentro de la levadura. Este método se puede aprovechar para probar la inducción de endosimbiosis artificiales con aplicaciones distintas y con diferentes organismos, tanto en el caso del hospedador como del simbiote.

3.3.3 Inoculación por técnicas de auxotrofia y fusión inducida por PEG

En este caso nos encontramos con un conjunto de técnicas moleculares que permiten el diseño de un complejo endosimbiótico en función de relaciones de mutualismo metabólico inducido. Un ejemplo de ello es una relación compuesta por la bacteria *E.coli* -el endosimbionte- y la levadura *S. cerevisiae* -el hospedador. Para la generación de este procedimiento se utilizó una levadura con una mutación en una subunidad de citocromo oxidasa (Cox 2) la cual está involucrada en la función respiratoria por lo que en este caso la cepa mutante tiene deficiencia en la respiración (Mehta y cols., 2018). Para la realización de esta endosimbiosis los autores utilizaron una estrategia inicial en la cual se utilizó una cepa de *E.coli* la cual expresaba una translocasa de ADP/ATP pensada para ser la encargada de proveer la energía al complejo. Para mantener la simbiosis, Mehta y sus colaboradores decidieron aprovechar una auxotrofia de la bacteria a la tiamina, la cual sería proporcionada por la levadura, por lo que en este caso se trataría de una asociación mutualista.

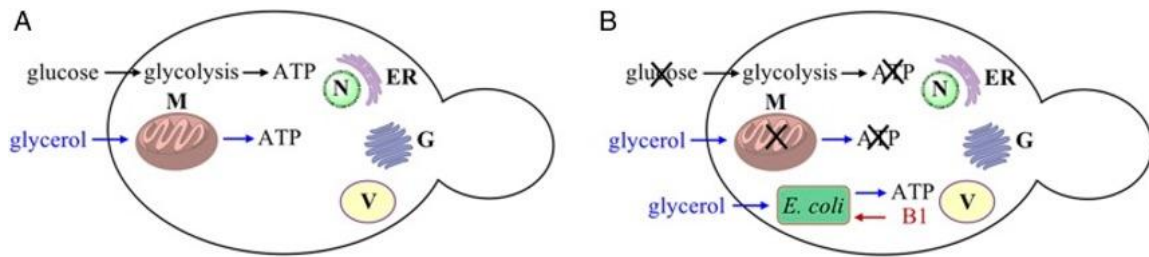


Figura 8. Estrategia de diseño para el complejo endosimbiótico

S. cerevisiae –E. coli **A)** Levadura funcional **B)** Levadura incapaz de realizar glycolysis ayudada por *E. coli* para la generación de ATP

Figura modificada de Mehta y cols., 2018

Donde X= no funcional M=mitocondria N= núcleo G=Aparato de Golgi
ER=Reticulo endoplasmico V=Vacuola B1=Vitamina B1

Para esta bacteria los autores eliminaron el gen *thiC* el cual fue reemplazado por un casete que codifica genes para expresar la proteína GFP superfolder y un marcador de resistencia a la kanamicina. También construyeron un plásmido que expresa la translocasa ATP/ADP y se lo insertaron en el cromosoma bacteriano **(Fig. 8)** . Para seleccionar la levadura hospedera hicieron una prueba de fusión con una cepa de *S.cerevisiae* mutante *S.cerevisiae* ρ^0 (Ausente de DNA mitocondrial e incapaz de utilizar fuentes de carbono fermentables como el glicerol) la cual fusionaron con mitocondrias extraídas de una cepa de *Saccharomyces* competente en la respiración denominada YPH500. Esta fusión fue exitosa. Sin embargo, al probar esta fusión con el endosimbionte no hubo crecimiento en el medio de selección **(Tabla 3.0)** .

Tabla 3.0 Organismos utilizados inicialmente en la simbiosis inducida por fusión

Organismo	Características
Endosimbionte	<p><i>E. coli</i> ΔthiC::gfp-kan^R</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capaces de expresar la translocasa ADP/ATP bajo el control de un promotor (ρBAD)
Hospedador	<p><i>S.cerevisiae</i> ρ^0</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cepa ausente de DNA mitocondrial • No es capaz de utilizar fuentes de carbono no fermentables como el glicerol

En la cepa de esta levadura no se expresaba en forma funcional una cadena de transporte de electrones mitocondrial ni la F_0F_1 ATP sintasa, al carecer de algunas subunidades codificadas en el DNA mitocondrial. Por lo anterior se piensa que estos organelos energizan ineficientemente la membrana interna, por lo que posteriormente usaron una cepa con un defecto mitocondrial más limitado (*cox2-60* NB97) la cual carece de la proteína Cox2. Esta cepa no ensambla un complejo citocromo oxidasa funcional y además no utiliza fuentes fermentables de carbono como el glicerol (**Tabla 4.0**). En este caso sí se expresaba la F_0F_1 ATP sintasa, y si crecieron pocas colonias de levadura en los medios de selección utilizados para fusiones levadura-*E.coli*; sin embargo, no crecieron en medios con mezclas control que omitían a *E.coli*. Para la supresión del crecimiento de la bacteria se utilizó un medio mínimo pero no crecieron ni levaduras ni bacterias.

Tabla 4.0 Organismos utilizados posteriormente en la simbiosis inducida por fusión

Organismo	Características
Endosimbionte	<p><i>E. coli</i> ΔthiC::gfp-kan^R</p> <ul style="list-style-type: none"> • Capaces de expresar la translocasa ADP/ATP bajo el control de un promotor (pBAD)
Hospedador	<p><i>S.cerevisiae</i> NB97</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cepa que posee DNA mitocondrial • Tiene un insercion en el gen COX2 • No es capaz de utilizar fuentes de carbono no fermentables como el glicerol

Uno de los aspectos importantes que se menciona en este artículo es la expresión de proteínas tipo SNARE que se le insertaron a *E.coli* para evitar la degradación lisosomal debido a que esta bacteria es patogénica y expresa patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs (Burbano, 2020) . Estas proteínas tipo SNARE ayudan a evadir el sistema inmunológico de los patógenos en el hospedero manipulando la maquinaria de tráfico vesicular para evadir la degradación lisosomal. La manera de inserción fue mediante el gen *IncA* de *Chlamydia trachomatis* y uno de sus homólogos de *Chlamydia caviae* con un más amplio rol de inhibición insertándose a través de plásmidos. Para generar simbiontes más estables incorporaron un gen derivado de *Chlamydia trachomatis* CT_813 .También realizaron este mismo procedimiento con cepas de *E.coli* a las cuales se les eliminó el gen *nadA* y fue reemplazado por un gen casete que codifican genes para expresar GFP superfolder y resistencia a la kanamicina (Tabla 5.0).

Tabla 5.0 Organismos utilizados finalmente en la simbiosis inducida por fusión

Organismo	Características
Endosimbiontes	<p style="text-align: center;"><i>E. coli</i> $\Delta thiC::gfp\text{-kan}^R$</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Capaces de expresar la translocasa ADP/ATP bajo el control de un promotor (pBAD) ● Expresan proteínas tipo SNARE ● Presentan auxotrofia a la tiamina
	<p style="text-align: center;"><i>E. coli</i> $\Delta nadA::gfp\text{-kan}^R$</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Capaces de expresar la translocasa ADP/ATP bajo el control de un promotor (pBAD) ● Expresan proteínas tipo SNARE ● Presentan auxotrofia a NAD
Hospedador	<p style="text-align: center;"><i>S.cerevisiae</i> NB97</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Cepa que posee DNA mitocondrial ● Tiene un insercion en el gen COX2 ● No es capaz de utilizar fuentes de carbono no fermentables como el glicerol

Los endosimbiontes con estas características pudieron fusionarse con las levaduras y crecer en medios selectivos con la ayuda de antibióticos para evitar contaminaciones. Mediante PCR se confirmó la presencia de ambos organismos y se aseguraron de la presencia de estos mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente marcando las bacterias con EUB338-Cy3 y las células de levadura con A-FITC, mostrando el complejo levadura-*E.coli* en las muestras que fusionaron y mostrando solo levaduras en la muestra control. También se comprobó la endosimbiosis mediante la microscopia de fluorescencia, ya que estas endosimbiontes eran capaces de expresar la proteína GFP (Fig. 9).

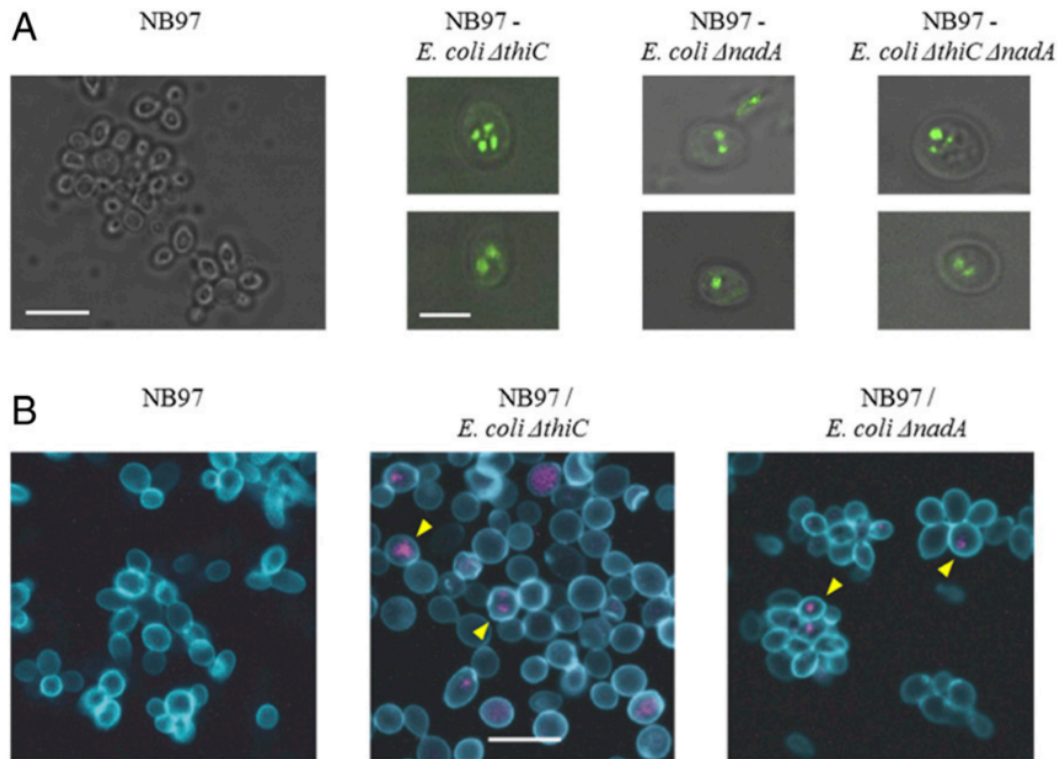


Figura 9. Complejo celular de levadura-*E.coli* A) Microscopia de TIRF a la izquierda se muestra la levadura sin el simbionte, a la derecha el complejo levadura-*E.coli* (gris-verde). Las células de *E.coli* se diferencian en la auxotrofia que presentan: tiamina, NAD y Tiamina/NAD B) Imágenes de microscopia fluorescente confocal control, complejo celular de levadura-*E.coli*. Las células de levadura fueron teñidas con A-FITC (en color azul) y el RNA ribosomal de bacteria con la sonda EUB338-Cy3 (en color morado). Las flechas amarillas indican ejemplos de células de levadura con EUB338-positivos. Figura modificada de Mehta y cols., 2018

Se han ido generando diversos métodos de inducciones de endosimbiosis (**Tabla 6.0**) de distintos organismos para que el hospedador pueda aprovechar cierta función otorgada por algún organismo, ya sea el simbionte o el hospedador. En el caso del estudio de Parsa y sus colaboradores, buscaban colonizar a *Phaseolus vulgaris* con un hongo endofítico con el fin de generar resistencias a herbívoros. En el caso de Uribe y sus colaboradores buscaban internalizar a la bacteria *W.*

pipientis en la levadura *S.cerevisiae* para poder generar un medio artificial donde este organismo pudiera crecer y fuera más fácil su manipulación. En este caso hablamos de un procedimiento no visto en la naturaleza pero que puede aprovecharse en la biología molecular. Finalmente, vemos una interacción mutualista en la cual ambos organismos se benefician de la interacción, mientras que *E.coli* ayuda a la respiración, la levadura proporciona el cofactor que esta bacteria necesita para su crecimiento.

Tabla 6.0 Ejemplos de inducción de endosimbiosis mediante distintos métodos

Endosimbiosis inducida	Métodos	Resultado	Función otorgada
<i>B. bassiana</i> en <i>P.vulgaris</i> (Parsa y cols 2013)	Aspersión foliar y Disolución en suelo	Se pudo colonizar mediante ambos métodos.	Resistencia a herbívoros
<i>W. pipientis</i> en <i>S.cerevisiae</i> (Uribe y cols 2019)	Centrifugación después del mezclado	Infección confirmada por PCR y FISH	Medio de crecimiento en hospedador
<i>E.coli</i> en <i>S.cerevisiae</i> (Mehta y cols 2018)	Fusión y fusión inducida por PEG	Infección evidenciada por FISH y TIRF Confirmación por presencia de ambos genomas por PCR	Producción de ATP (para el hospedador) Crecimiento debido a la auxotrofia (para el simbiote)

Las estrategias analizadas se pueden aprovechar para la generación de nuevos protocolos de endosimbiosis inducidas en diferentes especies. En este caso se

requiere conocer más a fondo la simbiosis que se realiza entre las bacterias rizobiales y las legumbres debido a que se pretenden conocer los requerimientos para su establecimiento y poder imitar dicha interacción. Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias rizobiales se encargan de formar nódulos en algunas leguminosas con el fin de producir nitrogenasa activa, la cual proporciona la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Raza y cols., 2020).

3.4 Simbiosis rizobio-legumbre

En el suelo se encuentra un conjunto de microorganismos dentro de los cuales se encuentran las bacterias rizobiales (Raza y cols., 2020). Estos organismos se pueden desarrollar en la rizosfera de las plantas leguminosas llegando a establecer una simbiosis mediante distintas señalizaciones entre ambos (Downie 1994).

3.4.1 Especies rizobiales

La familia Rhizobiaceae incluye géneros como *Rhizobium/Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (Sinorhizobium), *Azorhizobium*, capaces de formar nódulos en sus plantas hospederas sin embargo algunas especies pertenecientes a *Agrobacterium* no realizan la fijación de nitrógeno aunque varias son englobadas en el género *Rhizobium* por sus características similares (Flores y cols 2020). Una forma de identificación de las bacterias rizobiales es por su clasificación de rizobios de crecimiento rápido o lento. Mientras que los rizobios de rápido crecimiento crecen en alrededor de 2-3 días (*Rhizobium*, *Ensifer* (Sinorhizobium) *Azorhizobium*), los rizobios de lento crecimiento pueden crecer de

5-7 días (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*) en medio YMA (CIAT 1988). También se pueden diferenciar por generar metabolitos ácidos o alcalinos en medio con manitol, por lo que este tipo de medios generalmente contienen algún indicador que muestre dicha diferencia.

3.4.2 Ejemplos de interacciones simbióticas

No todos los rizobios fijadores de nitrógeno son capaces de colonizar a todas las especies de leguminosas. Como se aprecia en la **Tabla 7.0** hay diferentes especies de plantas leguminosas que pueden albergar distintas especies rizobiales específicas. Lo anterior se debe al reconocimiento de estructuras bacterianas externas. Dichas estructuras como diversos polisacáridos son importantes en la señalización y éxito de la nodulación entre ellos encontramos a los exopolisacáridos EPS, lipopolisacáridos LPS, polisacáridos capsulares CPS o factores de virulencia como el antígeno K y diferentes glucanos. Las distintas especies rizobiales expresan exopolisacáridos específicos y su síntesis, modificaciones, polimerización y exportación se llevan a cabo por un grupo de genes localizados en el cromosoma o en los megaplásmidos. Dichos genes son nombrados como *exo/exs*, *exp* o *pss*. Existe sugerencia de que la producción de polisacáridos variados podría permitir simbiosis más exitosas (Skorupska y cols., 2006).

Tabla 7.0 Ejemplos de compatibilidad rizobio-leguminosa

Bacteria rizobial	Leguminosa hospedadora
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
<i>M. loti</i>	<i>Leucaena</i>
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Leucaena</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Medicago</i> <i>Trifolium</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	<i>Pisum</i> <i>Vicia</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus</i> <i>Leucaena</i> <i>Macroptilium</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> <i>Melilotus</i>

3.4.3 Compatibilidad rizobio-legumbre

Como se mencionó anteriormente, existe cierta especificidad en esta interacción ya que la compatibilidad ocurre solo entre determinadas especies rizobiales con ciertas especies de leguminosas. Se sugiere que se debe a varios factores, como al reconocimiento de los lipoquitooligo-sacáridos (factores nod), los cuales varían su estructura dependiendo de la bacteria rizobial, a los receptores que poseen las diversas leguminosas al igual que a las modificaciones que pudieran tener estructuralmente (Clúa y cols., 2018). Diversos estudios sugieren que la compatibilidad depende también de los genes de nodulación localizados en algunos plásmidos. Debido a lo anterior, algunos investigadores realizaron la transferencia de plásmidos con genes involucrados en la nodulación y fijación de

N hacia otras especies rizobiales con el fin de analizar si dicha transferencia beneficia al receptor (**Tabla 8.0**). En el artículo de Waelkens donde introdujeron la región CIAT899 nodABCSU de *R.tropici* a una cepa de *R.etli* CE-3, la cual solo es capaz de nodular, *P.vulgaris* resultó en la ampliación del rango de hospedadores pudiendo colonizar también a *L. leucocephala* (Waelkens y cols.,1995). En otro caso transfieren el plásmido pRTr5 de *R.trifolii* a 2 cepas de *R.leguminosarum* la primera con la incapacidad de nodular y la segunda con la capacidad de nodular pero sin ser capaz de realizar la fijación de nitrógeno, resultando en transconjugantes capaces de nodular y fijar el nitrógeno en ambos casos. Dicho plásmido también fue insertado en una cepa de *A.tumefaciens*, la cual tenía la característica de que su plásmido Ti fue curado. En este caso los transconjugantes fueron capaces de nodular el trébol pero no de fijar N (National Institute of General Medical Sciences, 1984 p 176).

Tabla 8.0 Inducción de capacidad endosimbiótica en otras especies.

Bacteria receptora	Transferencia	Resultado
Cepa de <i>R.etli</i> CE-3 (Solo tiene la capacidad de nodular <i>P.vulgaris</i>)	región CIAT899 nodABCSU de <i>R.tropici</i>	Colonización de <i>L. leucocephala</i>
Mutantes de <i>R. leguminosarum</i> (Sin la capacidad de nodular)	pRtr5 presente en <i>R.trifolli</i> (nodula el trébol)	Transconjugantes capaces de nodular y fijar N en el Trébol
Mutantes de <i>R. leguminosarum</i> (Con la capacidad de nodular pero no de fijar N)	pRtr5 presente en <i>R.trifolli</i> (nodula el trébol)	Transconjugantes capaces de nodular y fijar N en el trébol
<i>A.tumefaciens</i> (Plásmido Ti curado)	pRtr5 presente en <i>R.trifolli</i> (nodula el trébol)	Transconjugantes eran capaces de nodular pero no de fijar nitrógeno en el trébol.

Autores como Nápoles y colaboradores han encontrado que el impacto de algunas sustancias en esta interacción pueden favorecer la capacidad de nodulación al aumentar la síntesis de los factores nod (**Tabla 9.0**). En sus estudios estas sustancias inductoras fueron la isoflavona genisteína en la interacción entre *R. leguminosarum* y *Phaseolus Vulgaris L.* mejor conocido como frijol común y los compuestos obtenidos al moler la semilla de soya junto con melaza en la interacción entre *Bradyrhizobium sp* y *Glycine max L.* El impacto que tuvieron dichas sustancias según sus estudios fueron una mejora en la nodulación (Nápoles y cols 2003;20016).

Tabla 9.0 Impacto de sustancias inductoras

Simbionte	Hospedador	Inductor	Impacto
<i>R. leguminosarum</i> (Nápoles y cols 2016)	<i>Phaseolus Vulgaris L.</i>	Genisteína	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor cantidad de factores Nod • Mayor número de nódulos y contenido de clorofila
<i>Bradyrhizobium sp.</i> (Nápoles y cols 2003)	<i>Glycine max L.</i>	Semilla de soya molinada y melaza	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada síntesis de factores Nod • Inóculo con alta capacidad de nodulación

Desde un punto de vista inmunológico, se sabe que las plantas están expuestas a distintos tipos de organismos patógenos siendo esencial el reconocimiento de sus estructuras conservadas (Yang y cols., 2020). Este reconocimiento se lleva a cabo mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales son capaces de reconocer estructuras como la quitina, la flagelina o el factor de elongación EF-Tu, ejemplos de patrones moleculares asociados a

microorganismos o a patógenos (MAMPs y PAMPs) (Zipfel y Felix 2005). Además reconocen patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) los cuales son de origen endógeno y surgen como resultado del daño generado por la entrada de un patógeno (Choi y Kleesig 2016). Los 2 tipos de PRRs encontrados en plantas son los receptores tipo cinasa y los receptores tipo proteínas (Burbano 2020). Estos receptores contienen motivos de lisina (LysM) los cuales funcionan para el reconocimiento de estructuras como la quitina, el peptidoglicano y estructuras relacionadas (Wan J. et al 2012). Algunos genes de los receptores LysM-tipo cinasa se han diversificado en plantas leguminosas siendo algunos funcionales como receptores para los lipoquitoligosacáridos o factores de nodulación (Xue C. et al 2007). También existen otros receptores-tipo cinasa que pueden reconocer a los lipoquitoligosacáridos los cuales son los receptores tipo lectina, uno de ellos es el receptor LORE encontrado en la planta *Arabidopsis thaliana* (Luo y cols., 2020).

Como se mencionó anteriormente la flagelina es un ejemplo de un PAMP y desencadena una respuesta inmune con su reconocimiento (Zipfel y Felix 2005). En cuanto a las estructuras rizobiales referentes a la flagelina, se sabe que difieren en algunos casos ya que carecen de algunos aminoácidos importantes para la inmunogenicidad en la región N-terminal diferenciándose del péptido flg22 tradicional encontrado en bacterias (Clúa y cols 2018). Uno de los mecanismos de evasión utilizado por bacterias son la transferencia de proteínas efectoras para la inhibición de algunos receptores o incluso la inhibición de alguna señalización

importante para el desarrollo de la respuesta inmunitaria (Boller y Felix 2009). Como se observa en la siguiente figura (**Fig. 10**) los PAMPs se reconocen por los PRRs presentes en las plantas, dicho reconocimiento activa la vía de señalización de las MAPK y la respuesta inmunitaria. Sin embargo, las bacterias adaptadas utilizan sistemas de secreción como el tipo III para transportar proteínas efectoras que son capaces de inhibir la cascada MAPK y consecuentemente la respuesta inmunitaria. Las proteínas efectoras son reconocidas en algunas variedades de plantas por receptores ricos en leucina desencadenando otro nivel de respuesta. En el caso de los efectores rizobiales también pueden promover la nodulación activando directamente la vía de señalización NF. Para una nodulación exitosa, son necesarios el receptor NFR, el cual reconoce factores nod, el receptor simbiótico tipo kinasa SYMRK y el receptor de exopolisacáridos 3 EPR3, el cual inactiva las señalizaciones de defensa mediante reconocimiento de los EPS rizobiales (Clúa y cols. 2018).

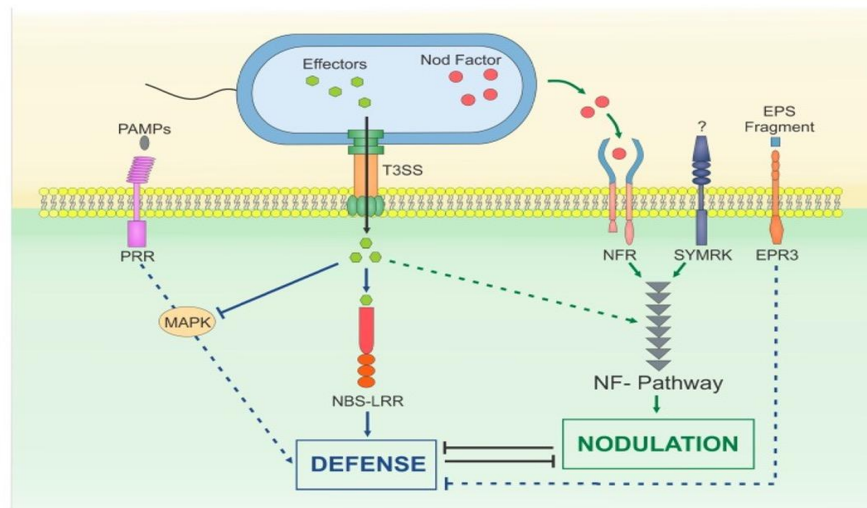


Figura 10. Interacción entre la nodulación y las vías de señalización para la evasión del sistema inmunitario. Figura tomada de Clúa y cols 2018.

Sabemos entonces que la compatibilidad depende de: genes involucrados en la nodulación (nod) específicos, genes de síntesis de estructuras externas (exo,exp,), presencia adecuada de inductores (flavonoides e isoflavonas) y evasión del SI.

3.4.4 Etapas de nodulación

La simbiosis se va estableciendo mediante la expresión de genes de las bacterias rizobiales y su hospedador específico como resultado del intercambio de señales (Downie 1994). En este proceso, las plantas exudan compuestos químicos a través de la raíz, como lo son carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y diferentes compuestos orgánicos como los flavonoides. Estos últimos atraen a las bacterias rizobiales por **quimiotaxis**, generalmente esta señalización ocurre cuando hay nitrógeno limitado en el medio (Nápoles y cols 2016). Posteriormente, es necesario el **reconocimiento** de ambos organismos y la adhesión de la bacteria a los pelos radiculares de la planta hospedadora lo cual ocurre mediante estructuras como la ricasina, la cual está presente en bacterias rizobiales al igual que la lectina presente en pelos radiculares de la planta (Madigan y cols 2009). Las sustancias como los flavonoides e isoflavonas activan la **síntesis de los factores de nodulación** mediante la activación del regulador transcripcional conocido como proteína NodD, presente en las bacterias (Schultze y Kondorosi 1998). Estos factores nod son lipo-quito-oligosacáridos que varían estructuralmente entre distintos rizobios y son encargados de inducir la expresión génica y la morfogénesis de raíz, generando el **enrollamiento del pelo radical** de las leguminosas, la división de células corticales y formación de nódulo (Van de Sande

y Bisseling 1997);(Chimote y Kashyap 2001);(Dénarié y cols.,1992).Las bacterias entran degradando la pared celular de la raíz y se **desplazan** a través del tubo de infección.Una vez interiorizadas, se **diferencian en bacteroides**, los cuales son capaces de producir la enzima nitrogenasa y el pigmento leghemoglobina, el cual actúa como buffer de O₂ impidiendo la inactivación del complejo enzimático, resultando en una fijación de nitrógeno funcional (Larrainzar y cols., 2020);(Haag y cols.,2013).

3.5 Inducción de endosimbiosis

Hemos visto que diversos autores han desarrollado métodos para la inducción de la simbiosis entre organismos procariotas y eucariotas con la finalidad de otorgar ciertos beneficios al hospedador o a ambos (**Tabla 6.0**) . Como se mencionó anteriormente , los organismos fijadores de nitrógeno simbióticos son de origen procariota y se limitan solo a interacciones con legumbres, por lo que existe cierto interés en el desarrollo de simbiosis con plantas no leguminosas (Mus y cols., 2016).

3.5.1 *Rhizobium tropici* CIAT 899 como simbiote

Las cepas de *Rhizobium tropici* (previamente designado como *R. leguminosarum biovar phaseoli* tipo II) pueden ser capaces de realizar la nodulación con una amplia variedad de plantas hospedadoras como *Phaseolus vulgaris*, árboles de *Leucaena spp.* y *Macroptilium atropurpureum*. Estas cepas rizobiales, además de ser simbióticamente estables, también toleran temperaturas altas y niveles altos de acidez en el medio (Martínez y cols., 1991) . Las cepas más conocidas de este

simbionte bacteriano eran el tipo A, mejor conocido como *R. tropici* CNF299, y el tipo B, conocido como *R.tropici* CIAT889. La cepa de *R.tropici* tipo A CNF299 fue propuesta para su reclasificación como *Rhizobium leucaenae* sp. nov. debido a la variabilidad genética y fenotípica entre esta con el tipo B. Esta cepa puede establecer simbiosis con *Leucaena leucocephala*, *Leucaena esculenta*, *Phaseolus vulgaris* y *Gliricidia sepium* (Ribeiro R y cols., 2012). En 1995 encontraron la presencia de megaplásmidos en cepas de *R.tropici* pertenecientes a estos subgrupos, visualizando replicones más grandes de 1,000 kb. Estos megaplásmidos difieren de los otros plásmidos integrados y también del cromosoma (Geniaux y cols., 1995). Se sabe también de la presencia de estos megaplásmidos en diferentes rizobios. Un ejemplo es la cepa *Rhizobium* sp. denominada NGR234, la cual contiene un megaplásmido pNGR234b, además de su plásmido simbiótico (pNGR234a) y el cromosoma. Han analizado que los genes homólogos a genes *fix* se encuentran en el cromosoma mientras que secuencias homólogas a genes de nodulación y *exo* son halladas en el megaplásmido (pNGR234b) (Flores y cols., 1998). El genoma de *Rhizobium tropici* CIAT 899 fue secuenciado por Ormeño y cols en 2012. Este rizobio posee un plásmido simbiótico (pSym) en el cual se encontraron tres distintos tipos de genes nodA además de 5 genes nodD, característica que puede contribuir a la amplia gama de hospedadores. También se encontraron más genes para la nodulación y para la biosíntesis de los niveles de hormonas vegetales, los cuales son responsables de su capacidad de fijación de nitrógeno bajo diversas condiciones (Ormeño y cols.,

2012). En el artículo de Waelkens y colaboradores se menciona la construcción de mutantes nodS y nodU de la cepa *R.tropici* CIAT899, probando su efecto en la nodulación de sus plantas huéspedes *P.vulgaris* y *L. leucocephalea*. Se mostró que la mutación del gen nodS causa la deficiencia de nodulación en ambos mientras que la mutación nodU solo disminuye la nodulación en *Leucaena* sin un efecto aparente en *Phaseolus*. Además de lo anteriormente mencionado, introdujeron la región CIAT899 nodABCSU a una cepa de *R.etli* CE-3, la cual solo es capaz de nodular *P. vulgaris*, lo que resultó en la ampliación del rango de hospedadores, haciendo posible su colonización en *L. leucocephala*. Debido a lo anterior, se menciona que nodS proveniente de *Rhizobium tropici* CIAT899 es necesario para la nodulación en ciertas especies como *P. vulgaris* y *L. leucocephalea* (Waelkens y cols.,1995). Se ha mostrado que la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899, además de inducir los factores de nodulación mediante flavonoides como la apigenina, también lo realizan mediante condiciones de estrés osmótico (**Fig.11**) (iónico salino o no iónico en presencia de manitol)(Del Cerro P. 2019).

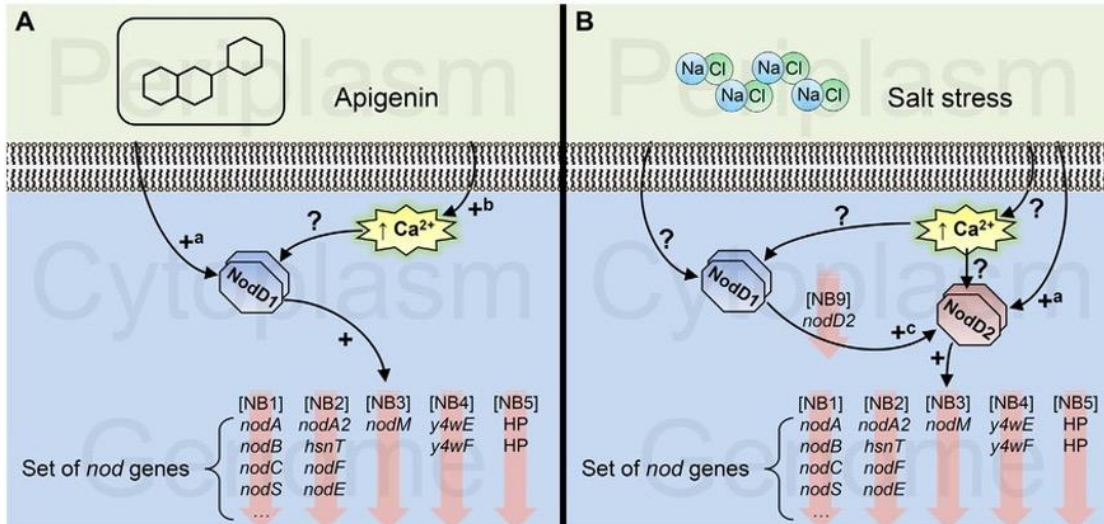


Figura 11. Expresión de factores nod en diferentes condiciones A) Mediante la adición de flavonoides B) Mediante estrés salino Figura tomada de Del Cerro y cols., 2017

Además de los estudios filogenéticos una forma de identificación de las bacterias rizobiales se realiza con la utilización de técnicas bioquímicas, como PCR de genes específicos de dichas bacterias, como lo son los genes *nod* o los genes de fijación de nitrógeno *fix* o *nif* (Gómez y cols., 2017). En el caso de la bacteria *Rhizobium tropici* el gen *nifH* se encuentra en el plásmido pRtrCIAT899b ([nifH nitrogenase iron protein \[Rhizobium tropici CIAT 899\] - Gene - NCBI \(nih.gov\)](#)). Este gen codifica para la enzima nitrogenasa reductasa necesaria para la fijación biológica de N₂ (Haukka y cols., 1998).

El objetivo del presente trabajo es identificar y caracterizar una probable cepa de *Rhizobium tropici*, usando pruebas microbiológicas, de genotipificación y de inducción de nódulos en *Phaseolus vulgaris*, con miras a poder utilizarla para futuros estudios de endosimbiosis.

4. HIPÓTESIS

Si la bacteria disponible en el laboratorio presenta pruebas fenotípicas y genotípicas propias de *Rhizobium tropici*, como pruebas de PCR, crecimiento en medios selectivos e inducción de nódulos en *P.vulgaris*, entonces será posible utilizar a esta bacteria como microorganismo apto para estudios de endosimbiosis.

5. OBJETIVOS Y METAS

5.1 Objetivo General

Caracterizar una probable cepa de *Rhizobium tropici*, disponible en el laboratorio, como un modelo para estudios de endosimbiosis.

5.2 Objetivos Particulares

- Recopilación de información acerca de la bacteria *Rhizobium tropici* en la literatura.
- Evaluar el crecimiento de las bacterias en medio con antibióticos.
- Evaluar el crecimiento de las bacterias en medio con NaCl.
- Analizar si la cepa tiene los genes que codifican para proteínas para realizar la fijación de nitrógeno.
- Analizar si la adición de las bacterias ocasiona mejoras en el crecimiento de la planta *Phaseolus vulgaris*.

- Analizar si la adición de las bacterias induce la formación de nódulos en raíces de la planta *Phaseolus vulgaris* o frijol común.

5.3 Metas

Determinar las pruebas más adecuadas para la correcta identificación de la bacteria disponible en el laboratorio.

6. MATERIALES

6.1 Material microbiológico

- La probable cepa de *Rhizobium tropici* fue amablemente donada por el Dr. Caspar Chater, University of Sheffield, UK.

6.2 Medios microbiológicos

- Medio Yeast-Peptone YP (Beringer,1974)(Martinez Romero, 1991)

Componente	Cantidad
Peptona	5g
Extracto de levadura	3g
Agar	15g
CaCl ₂	10mL 1M
H ₂ O	cbp 1L

- Medio YP + Ácido nalidíxico (Martínez Romero 1991)

Se adiciona el antibiótico al medio disuelto previamente en NaOH 0.01N.

Concentración de ácido nalidíxico en el medio (400µg/mL)

- Medio YP + Ampicilina

Concentración de ampicilina en el medio (50, 100 y 200µg/mL)

- Medio Yeast Extract Mannitol Agar YEMA + Azul de bromotimol ABT 0.5%

(Vincent, 1975)(Ferrera y cols., 1993)

Componente	Cantidad
Manitol	10g
Agar	15g
Extracto de levadura	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.5g
NaCl	0.2g
MgSO ₄	0.1g
CaCl ₂	0.015g
Azul de bromotimol	5mL (en NaOH 0.01N)
H ₂ O	cbp 1L

7. METODOLOGÍA

7.1 Recopilación de información relevante en la literatura sobre bacterias rizobiales

- Se realizó una recopilación de datos acerca de la bacteria *Rhizobium tropici* en las bases de datos Pubmed, Uniprot y Science Direct para conocer aspectos importantes de la bacteria y su posible función como probable modelo endosimbionte.

7.2 Cultivo del material bacteriano

- Se tomó una asada de bacterias almacenadas en glicerol 60 % a una temperatura de -80°C para su posterior cultivo.
- Las bacterias rizobiales se crecieron en medio YP en presencia de ácido nalidíxico (400 µg/mL) y en presencia de ampicilina (50, 100 y 200 µg/mL) a 30°C durante 6 días. En medio YMA+ABT 0.5% pH 6.8 a una temperatura de 28°C durante 72h.
- Adicionalmente se probó su crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl (0.4%, 0.5% y 1%) en placas con medio YP .

7.3 Microscopia del material bacteriano

- Se llevaron a cabo tinciones de Gram en frotis con bacterias rizobiales y se observaron en el microscopio con el propósito de conocer las características estructurales de sus paredes celulares. Se utilizó cristal violeta como colorante primario, yodo(lugol) como mordiente y para generar el complejo cristal-yodo, la mezcla 1:1 alcohol acetona como disolvente y la safranina (fucsina) como colorante de contraste. Dicha tinción se realizó 4 veces.

7.4 PCR de nifH y electroforesis en gel de agarosa

- Se realizó una PCR para amplificar genes nif-H en la bacteria *R.tropici* para demostrar la presencia de la enzima nitrogenasa. Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótido	Tm (°C)	Secuencia	Comentarios
nifH. FW1	54.6	CATCACCTCCATCAACTTCC	Amplifica gen nifH de <i>Rhizobium tropici</i> amplicón 165bp
nifH Rv1	57.6	CGTA GCGCCATCATCTC	Amplifica gen nifH de <i>Rhizobium tropici</i> amplicón 165bp
nifH FW2	55.6	AGTCCACCACCTCACAAAATA	Amplifica gen nifH de <i>Rhizobium tropici</i> amplicón 219bp
nifH RV2	59.1	ACT CTA ACG CAC TTG ATG CCC	Amplifica gen nifH de <i>Rhizobium tropici</i> amplicón 219bp

La PCR se realizó con las siguientes condiciones:

Magnitud	Desnat. inicial	Desnat.	Alineamiento	Extensión	Extensión final
Temp (°C)	94.0	94.0	60.0	72.0	72.0
Tiempo (sec)	120	30	30	30	60

N° ciclos: 30

7.5 Extracción de plásmidos y electroforesis

Se realizó la extracción de mega plásmidos descritos en la literatura (Geniaux y cols., 1995) usando el kit de extracción de plásmidos GenElute Plasmid Miniprep. Se evidenció su extracción al someterlos a una electroforesis en gel de agarosa al 1.8%.

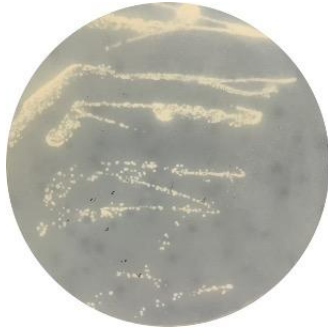
7.6 Ensayos de nodulación en *Phaseolus vulgaris*

La cepa bacteriana fue crecida en medio YP durante 48h a 28°C. Los cultivos fueron diluidos en agua a una densidad óptica DO= 0.01 y se adicionaron 150 mL de cultivo a cada planta contenida en una maceta (Ferguson y cols., 2014).

8. RESULTADOS

Una primera prueba que nos permitiría determinar la identidad de la bacteria disponible para el presente estudio es el crecimiento en medios de cultivo selectivos de acuerdo a lo descrito en la literatura. En este sentido, varias bacterias del género *Rhizobium* presentan la capacidad de crecer en medios de cultivo a base de extracto de levadura y peptona más el antibiótico ácido nalidíxico (Martínez-Romero y cols., 1991). Para comprobar el género de la bacteria disponible en el laboratorio, se descongeló una alícuota de suspensión bacteriana congelada a -70°C en medio YP líquido (ver materiales) durante 48h. Se mostró crecimiento de *Rhizobium* en el medio de selección YP con ácido nalidíxico, sus colonias eran blanquecinas y ligeramente translúcidas. Su tiempo de crecimiento en el medio YEMA + ABT 0.5% fue de 2 a 3 días mostrando un color ligeramente más amarillo. Su crecimiento en YP + ácido nalidíxico mostró ser menos mucoso a diferencia de su crecimiento en el medio YEMA - ABT 0.5% (**Fig. 12**).

A)



B)

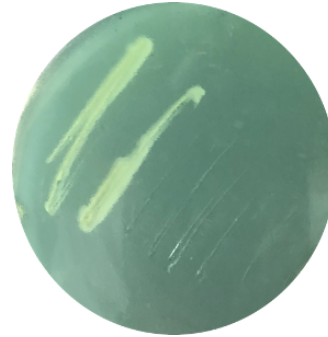


Figura 12. Crecimiento de la bacteria en medio **A)** YP + Ácido nalidíxico 400µg/mL y **B)** YEMA + ABT 0.5%

Otra prueba de identificación de bacterias del género *Rhizobium* es su resistencia al antibiótico ampicilina (Díaz, 2010). En la **Fig. 13** se muestra que las bacterias son capaces de crecer en medio con dos concentraciones de ampicilina que son letales para otro tipo de bacterias como *E. coli*, siempre y cuando no estén transformadas con plásmidos que permitan el crecimiento en estos medios.

A)



B)

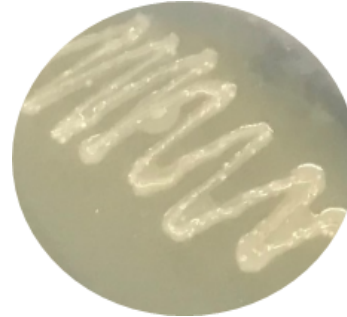


Figura 13. Crecimiento de la bacteria en medio **A)** YP + Ampicilina 100 µg/mL y **B)** YP + Ampicilina 200 µg/mL

La **Tabla 10.0** resume el crecimiento de la bacteria obtenida en el laboratorio en los medios de cultivo con ácido nalidíxico y ampicilina. Se puede observar que la bacteria es capaz de crecer en todas las condiciones.

Tabla 10.0 Crecimiento de la bacteria en presencia de antibióticos.

Condición	Ác. nal 400µg/mL	Amp 50µg/mL	Amp 100µg/mL	Amp 200µg/mL
Crecimiento	+	+	+	+

Posteriormente se decidió caracterizar el crecimiento de la cepa en medio YP líquido en ausencia y presencia de NaCl. La evidencia en la literatura sugiere que la adición de cloruro de sodio al medio es una forma de identificar a *R. tropici* de otras bacterias rizobiales (Díaz, 2010). Los resultados de crecimiento se resumen en la tabla a continuación

Tabla 11.0 Crecimiento de la bacteria en medios con concentraciones crecientes de NaCl.

Bacteria/ [NaCl]	0.4 %	0.5 %	1 %
<i>Rhizobium tropici</i>	+	+	+

Evaluación microscópica del material bacteriano

Las bacterias del género *Rhizobium* son Gram negativas. Esto significa que tienen doble membrana y sus paredes bacterianas contienen menor cantidad de

peptidoglicano. Además carecen de ácidos teicoicos, a diferencia de las bacterias Gram positivas, las cuales por la característica estructural de tener mayor cantidad de peptidoglicano retienen mejor el cristal violeta, ya que este colorante tiene mayor afinidad por estas estructuras. Por el contrario, las bacterias Gram negativas, al no retener el cristal violeta, se tiñen con el colorante de contraste (safranina o fucsina), permitiendo discriminarlas (O'Tooles, 2016). Como podemos observar en la **Fig. 14** se puede observar que la tinción realizada muestra que la cepa otorgada se compone de bacilos cortos de color rosa indicando su clasificación como Gram negativos.

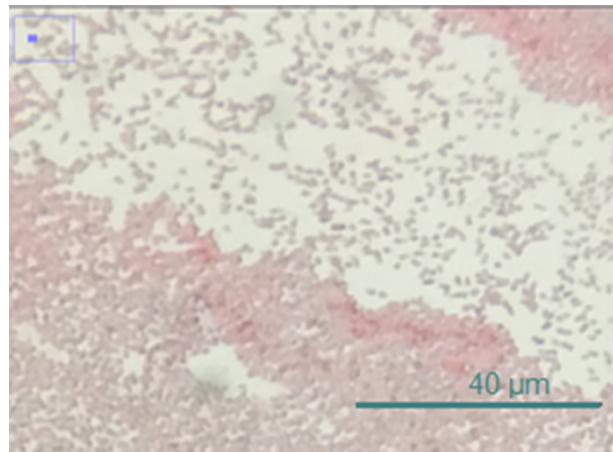


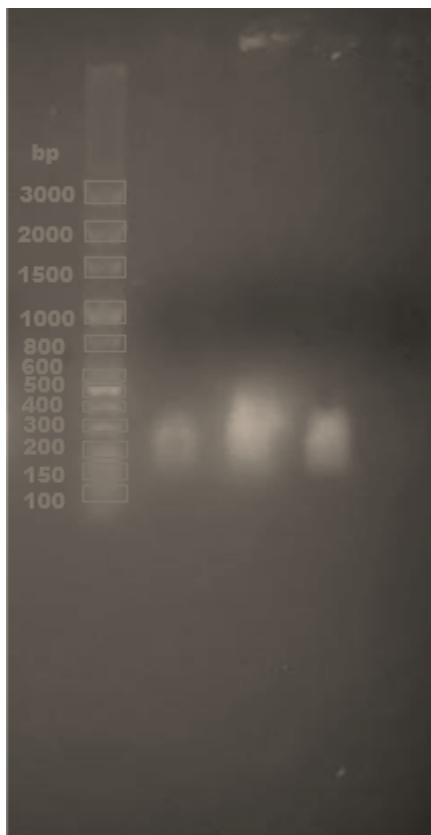
Figura 14. Microscopía de *Rhizobium tropici* con tinción de Gram. Experimento representativo. N= 4.

Además de lo anteriormente mencionado la tinción de Gram también aporta información de la presencia o ausencia de estructuras, como los LPS que en este caso al ser G(-) indica su presencia, lo que va de acuerdo con la literatura, ya que los rizobios poseen este tipo de estructuras (Skorupska y cols., 2006).

Genotipificación de la cepa

Para tener evidencia genética sobre la identidad de la bacteria recibida, se decidió hacer pruebas de PCR de colonia usando oligonucleótidos del gen nifH específicos para *Rhizobium tropici*. Los resultados muestran que se obtuvieron amplicones de alrededor de 200 pb para el amplicón de nifH1 y de alrededor de 300 pb para el amplicón de nifH2. Es importante considerar que los tamaños teóricos de estos amplicones son de 169 pbs y 219 pbs respectivamente (ver discusión de resultados).

A)



B)

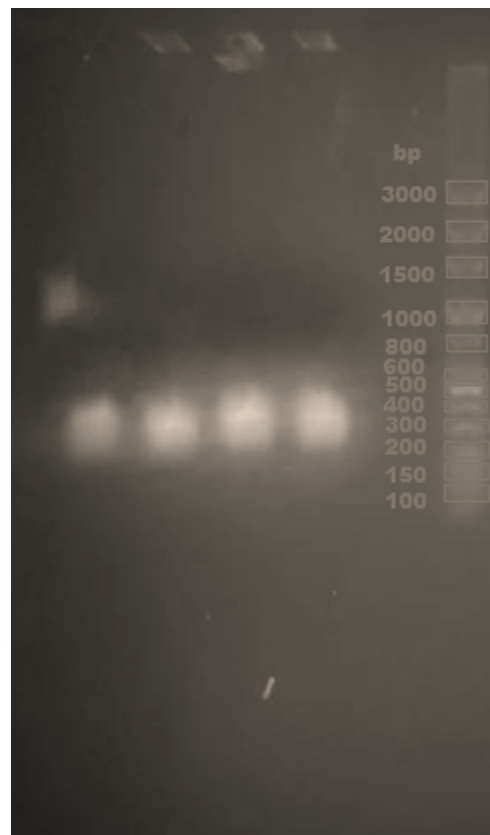


Figura 15. PCR de nif y electroforesis en gel de agarosa **A)** PCR con primers nifH1 Pocillo 1 marcador , pocillo 2,3,4 y 5 muestras de colonias rizobiales aisladas **B)** PCR con primers nifH2 Pocillo 1 2,3,4 muestras de colonias rizobiales aisladas pocillo 6 marcador. El marcador utilizado: Jena Bioscience Mid Range DNA ladder.

Adicionalmente a los resultados visualizados en la electroforesis, se realizó una búsqueda en la base datos NCBI utilizando la herramienta BLAST para encontrar similitud del gen *nifH* con otras bacterias rizobiales encontrando que además de la similitud con el gen *nifH* de *Rhizobium tropici* CIAT899, se encuentran secuencias de organismos con porcentaje de identidad y un query cover del 100% como *Rhizobium* sp. CCGE532. Otros con porcentaje de identidad del 100% pero con un query cover menor fueron *Rhizobium* sp. TUTCCb7, *Rhizobium* sp. TUTWCb5 y *Rhizobium* sp. TUTCCb8. También se encontraron secuencias de otras bacterias rizobiales pertenecientes a *Rhizobium*, *Shinorhizobium* y *Mesorhizobium* pero con un porcentaje menor de identidad (ver anexo). Posteriormente se realizó el mismo procedimiento de búsqueda, utilizando únicamente las secuencias amplificadas por los oligonucleótidos utilizados en la PCR. En esta búsqueda se encuentra *Rhizobium tropici* CIAT899, *Rhizobium tropici* UPRM8021, *Rhizobium tropici* RP261, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. TUTPVSA110, *Rhizobium* sp. TUTPVSA117, *Rhizobium* sp. TUTWCb5, *Rhizobium* sp. TUTWCb6, *Rhizobium* sp. TUTWCb10, *Rhizobium* sp. TUTWCCb7, *Rhizobium* sp. TUTWCCb7, *Rhizobium* sp. NCHA22 a una identidad del 100%. Dentro de las que tienen una identidad de entre el 97 y 99% se encuentran bacterias como *Rhizobium* sp STM 7321, *Rhizobium* sp LBP22, *Rhizobium* sp CFN-ESH9, *Rhizobium tropici* (parcial), *Rhizobium* sp GWG9.

Aquellas con menor identidad pertenecen en su mayoría al género *Rhizobium* aunque también se encuentran similitudes con *Mesorhizobium*.

Otra prueba que permite aportar evidencia sobre la identidad de la bacteria es la presencia de megaplásmidos, según se reporta en la literatura (Martinez-Romero y cols., 1991);(Geniaux y cols., 1995). Para ello se crecieron tres cultivos bacterianos y se aislaron plásmidos con el kit comercial descrito en la sección de metodología. Los resultados demuestran que existen fragmentos de DNA mayores al límite del marcador de pares de bases utilizado (3000 pb). Esto sugiere que las bacterias tienen material plasmídico que podría corresponder a los megaplásmidos reportados para *Rhizobium tropici* (Fig. 16).

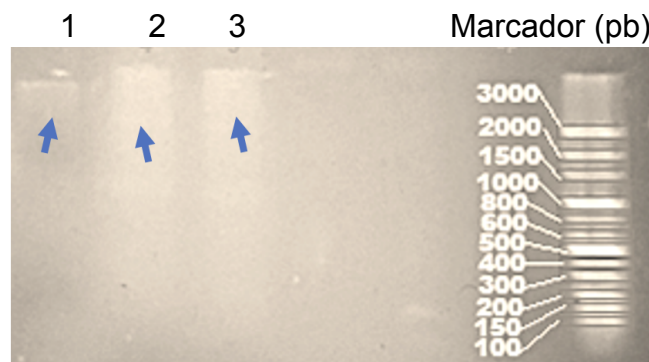


Figura 16. Electroforesis de megaplásmidos aislados de un cultivo bacteriano. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a material plasmídico aislado.

Efectos de la bacteria *Rhizobium tropici* sobre el crecimiento de las raíces de *Phaseolus vulgaris*

Una última prueba que se decidió llevar a cabo para tener evidencia funcional sobre la identidad de la bacteria disponible en el laboratorio y su funcionalidad como simbiote, es la inducción de nódulos en raíces de *P. vulgaris*. Para ello se germinaron semillas por un método convencional usando algodón en medio acuoso y en condiciones de etiolación (obscuridad). Las plántulas fueron posteriormente trasplantadas a macetas con sustrato, agrolita y vermiculita (sin nitrógeno) en condiciones de invernadero durante 8 días y se adicionaron 10 mL de un cultivo bacteriano fresco en medio YP como se describe en la Metodología. Los resultados en la **Fig.17** demuestran que la adición de las bacterias ocasionan un crecimiento acentuado en las plantas al compararse con las plantas control, sin adición de bacterias. En forma adicional, se observaron distorsiones en las raíces de las plantas compatibles con la morfología de nódulos con tamaños de entre 1 y 2 mm (**Fig. 18**). Los datos estadísticos de las pruebas piloto sugieren que la cepa inoculada ocasiona un crecimiento acentuado ya que existe diferencia significativa entre las longitudes tanto de tallo como de raíz (**Fig. 19**). Dichos datos fueron probados con una t de student con una significancia del 95%.

Controles

Inoculadas



Figura 17. Efecto de la inoculación de la cepa rizobial sobre el crecimiento de *Phaseolus vulgaris*.

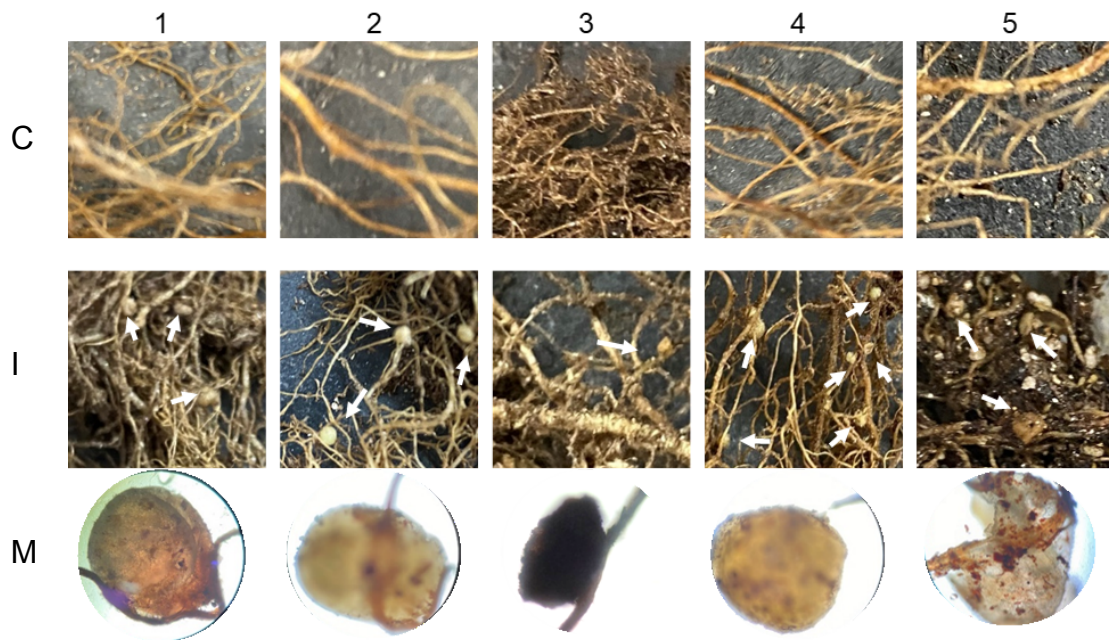


Figura 18. Imágenes de Raíces de *Phaseolus vulgaris* sin inoculante (C= controles) ,inoculadas con la cepa rizobial (I= inoculadas) y nódulos vistos al microscopio (M= Microscopio). Nódulos señalados con flechas blancas.

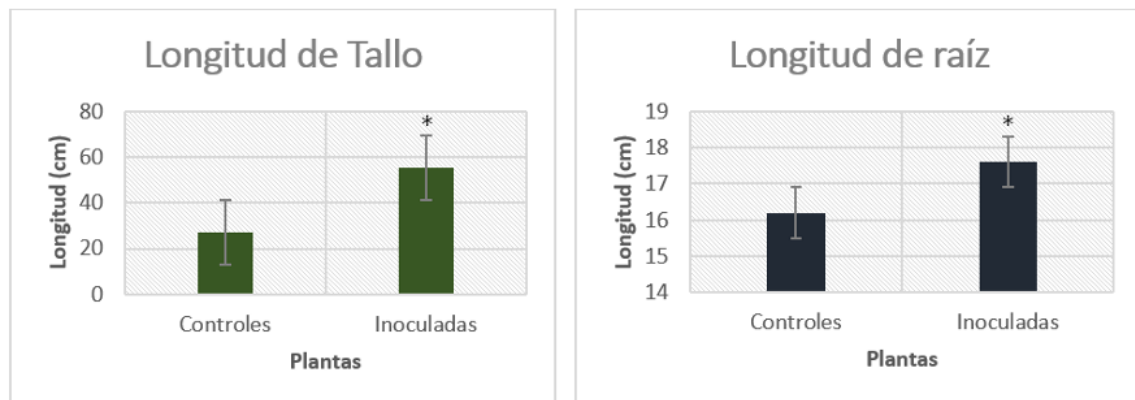


Figura 19. Cuantificación del efecto de la inoculación del rizobio en el tamaño de tallo y raíz de *Phaseolus vulgaris*. Los asteriscos denotan diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ usando una prueba t de student.

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten asumir que la bacteria disponible en el laboratorio es capaz de utilizar el manitol como fuente de carbono, el medio YEMA con indicador permite la diferenciación entre géneros rizobiales, ya que se ha reportado que géneros como *Bradyrhizobium* alcalinizan el medio en el que se encuentran a diferencia de *Rhizobium/Agrobacterium* (Martinez-Romero, 1991) .Ya que el indicador utilizado para esta caracterización fue el azul de bromotimol se sabe que los metabolitos ácidos inducen un cambio de color del medio YEMA de verde a amarillo mientras que la alcalinización muestra el cambio a color azul. Además de utilizar al manitol como fuente de carbono, esta cepa muestra crecimiento en medio YEMA sólido en 72 h, lo que permite su clasificación como una bacteria rizobial de rápido crecimiento. Además de esas dos características, esta bacteria presenta un aspecto mucoso en este medio. En esta instancia se sabe que la cepa es de rápido crecimiento y acidifica el medio descartando géneros como *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium* debido a su diferencia en el tiempo de crecimiento (Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1988) .Posteriormente, se decidió hacer una prueba genotípica para evidenciar genes relacionados a la fijación del nitrógeno en bacterias del género *Rhizobium*.La reacción de PCR usando oligonucleótidos para los genes *nifH* permiten asumir que se trata de una bacteria del género *rhizobium*, con la potencial capacidad para realizar la fijación de nitrógeno.Estudios previos indicaron que los genes *nifH* están estrechamente conservados entre diferentes especies del género *Rhizobium*, por

lo que se puede asumir que podría tratarse de una especie distinta ya que no hay una gran diferencia en los tamaños de los amplicones. Debido a lo anterior, se llevaron a cabo pruebas de resistencia a antibióticos, como el ácido nalidíxico y a la ampicilina, según lo reportado por Martínez-Romero y cols, (1991) *Rhizobium tropici* es resistente al ácido nalidíxico permitiéndose usar como un antibiótico de selección. También en el estudio de Díaz (2010), se indica que la cepa *R. tropici* CIAT889 es resistente a múltiples antibióticos en especial a la ampicilina, a diferencia de otras especies de *Rhizobium*. Según las pruebas llevadas a cabo en el laboratorio, esta cepa mostró resistencia ante ambos antibióticos, sugiriendo que podría tratarse de *Rhizobium tropici*. Para evaluar su funcionalidad como simbionte fijador, se realizó la inoculación de estas bacterias en *Phaseolus vulgaris*, lo que nos arroja información de que además de ser un simbionte con la capacidad de nodular también interacciona con la leguminosa compatible como hospedadora (Martínez-Romero 2012). La literatura menciona que el tamaño de los nódulos obtenidos al inocular cepas rizobiales varía dependiendo de los organismos al igual que las condiciones, esto lo podemos observar en el estudio realizado por Escudero y colaboradores donde inocularon cepas de *Rhizobium sp.* en *Phaseolus vulgaris*. En este caso el tamaño de los nódulos varía dependiendo del tratamiento aplicado. Estos consisten en la aplicación de diferentes volúmenes de inoculante, en el caso del tratamiento 1 la adición corresponde a 0.5mL de inoculante con el cual obtuvieron un tamaño de nódulos promedio de 0.953mm y 1.531mm a diferencia de sus tratamientos posteriores 2 y

3 en las cuales la adición de 1 y 2 mL resultó en un tamaño promedio de entre 2.487mm y de 7.09mm respectivamente(Escudero y cols., 2017).Otro ejemplo es la inoculación de *Rhizobium etlí* en *Phaseolus vulgaris* L. realizada en el estudio de Chipana y cols (2017) donde utilizaron tratamientos a diferentes concentraciones de inoculante; mientras mayor cantidad de células bacterianas eran inoculadas había una mayor efectividad de nodulación.En el caso de los nódulos observados en la inoculación experimental realizada en la presente tesis, el tamaño de los nódulos visualizados varían de entre 1 y 2 mm, esto se puede explicar debido al método de inoculación utilizado ya que se realizaron diluciones hasta obtener una densidad óptica muy baja (DO=0.01), lo que podría indicarnos que ocurren menos interacciones debido a un menor contenido bacteriano.En el estudio de Daza y cols (2017) definieron una escala de nodulación basándose en el número y tamaño de nódulos encontrados en raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con diferentes cepas rizobiales donde se clasifican el tamaño de nódulos como : pequeños (<1 mm), pequeños-medianos (1-2 mm), medianos-grandes (2-3 mm) y grandes (> 3 mm) **(Fig.20)** .Esto sugiere que el tamaño de los nódulos visualizados se pueden clasificar como pequeños-medianos.

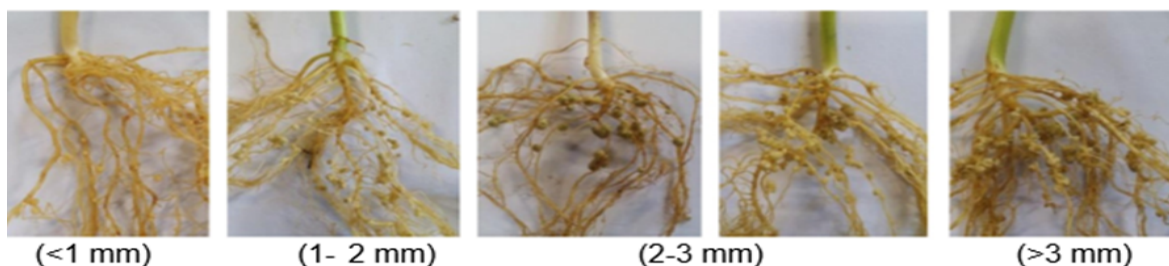


Figura 20. Raíces de *Phaseolus vulgaris* con diversos tamaños de nódulos Figura tomada de Daza y cols 2017.

Diversos autores también clasifican a los nódulos dependiendo del color de los mismos al ser visualizados en el microscopio, en este caso presentaban un color rojo/marrón, lo que sugiere que el pigmento leghemoglobina puede estar presente y probablemente sea funcional la fijación de nitrógeno puesto que protege al complejo enzimático nitrogenasa de su degradación (Larrainzar y cols., 2020).

Como se describe en la sección de antecedentes, hay cierta especificidad entre las bacterias rizobiales con las leguminosas y el anterior resulta ser un hospedero natural de *Phaseolus vulgaris*. Los experimentos presentados en esta tesis llevan a concluir que la bacteria disponible en el laboratorio es *Rhizobium tropici*. Actualmente se cuenta en el laboratorio con muestras de cultivos bacterianos en medio con glicerol al 60% en condiciones de ultracongelación a -70°C , con la finalidad de poder llevar a cabo experimentos a futuro con esta bacteria.

10. CONCLUSIONES

- Las bacterias presentaron crecimiento en medio YP con ácido nalidíxico.
- Las bacterias presentaron crecimiento en medio YEMA + ABT 0.5%.
- Las bacterias presentaron crecimiento en medio YP más ampicilina.
- Las bacterias presentaron crecimiento en medio con concentraciones crecientes de NaCl.
- Se identificó a las bacterias como bacilos cortos Gram negativos.
- Se obtuvo un amplicón correspondiente al gen nifH de las bacterias.

- Se aisló material plasmídico que podría corresponder a los megaplásmidos reportados para *Rhizobium tropici*.
- La adición de bacterias ocasionó mejorías en el crecimiento de la planta *Phaseolus vulgaris*.
- La adición de las bacterias indujo la formación de nódulos en raíces de la planta *Phaseolus vulgaris*.

11. PERSPECTIVAS

A pesar de que la cepa mostró características correspondientes a *R. tropici* es posible realizar mayores estudios, como inmunoensayos utilizados para diferir entre especies rizobiales. Así mismo se pueden realizar PCR para genes más específicos, entre ellos se podrían buscar los genes de nodulación específicos para *R. tropici*, realizar estudios cromatográficos o de reducción de etileno para probar si puede producir una nitrogenasa funcional con la capacidad de fijación de nitrógeno. Todo lo anterior podría ser probado para generar ensayos de endosimbiosis con distintos procedimientos de inoculación y con otros hospederos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abello J. y Kellemu S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Ciencia y tecnología agropecuaria* 7(2), 55-57 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=449945021006>
- Ancheeva, E., Daletos, G. & Proksch, P. (2020). Metabolitos secundarios bioactivos de hongos endófitos. *Química medicinal actual*, 27(11), 1836-1854. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190916144709>
- Archibald JM. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology* : CB. 2015 Oct;25(19):R911-21. DOI: 10.1016/j.cub.2015.07.055 .
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, 221, 36–49. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- Beringer J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of general microbiology*, 84(1), 188–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>
- Boller, T., & Felix, G. (2009). Un renacimiento de los elicitores: percepción de patrones moleculares asociados a microbios y señales de peligro por receptores de reconocimiento de patrones. *Revisión anual de la biología vegetal*, 60,379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032>
- Burbano-Figueroa O. (2020, abril). Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistencia vertical y horizontal. *Revista Argentina de Microbiología*. 52 (3),245-255. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.04.006>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical .(1988).Simbiosis leguminosa-rizobio: *Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico*. 1ª Ed.rev.
- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC plant biology*, 16(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0921-2>
- Chimote, V., & Kashyap, L. R. (2001). Lipochitooligosaccharides and legume *Rhizobium* symbiosis--a new concept. *Indian journal of experimental biology*, 39(5), 401–409.
- Chipana, V., Clavijo, C., Medina, P., & Castillo, D. (2017). Inoculación de vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) con diferentes concentraciones de

Rhizobium etli y su influencia sobre el rendimiento del cultivo. *Ecología aplicada*, 16(2), 91-98.

- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M. E., & Blanco, F. A. (2018). Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Genes*, 9(3), 125. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
- Dacks, J. B., Field, M. C., Buick, R., Eme, L., Gribaldo, S., Roger, A. J., Brochier-Armanet, C., & Devos, D. P. (2016). The changing view of eukaryogenesis - fossils, cells, lineages and how they all come together. *Journal of cell science*, 129(20), 3695–3703.
- Daza, L. D., & Rosas, A. S. (2017). Caracterización de la nodulación de un vivero diferencial de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con aislamientos y poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. de Honduras. <http://hdl.handle.net/11036/5991>
- Del Cerro, P., Megías, M., López-Baena, F. J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaño, F., & Ollero, F. J. (2019). Osmotic stress activates nif and fix genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the nodA2 operon and the nodA3 gene. *Plos one*, 14(3), e0213298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298>
- Dénarié, J., Debelle, F., & Rosenberg, C. (1992). Señalización y variación del rango del huésped en la nodulación. *Revisión anual de microbiología*, 46, 497–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.002433>
- Díaz, C. (2010). *Aislamiento caracterización y selección de rhizobia autóctonos que nodulan la habichuela roja (Phaseolus vulgaris L.), en la República Dominicana* [Tesis de doctorado, Universidad de León Departamento de Ingeniería y Ciencias agrarias]. <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1585/Antonio.pdf?sequence=1>
- Downie J. A. (1994). Estrategias de señalización para la nodulación de leguminosas por rizobios. *Tendencias en microbiología*, 2(9), 318–324. [https://doi.org/10.1016/0966-842x\(94\)90448-0](https://doi.org/10.1016/0966-842x(94)90448-0)
- Escudero Acebedo, K. M. (2017). Efecto de la inoculación de cepas de *Rhizobium* sp., en el crecimiento de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) var. Canario, a escala piloto, SJL, 2017.
- Esmaeel, Q., Miotto, L., Rondeau, M., Leclère, V., Clément, C., Jacquard, C., Sanchez, L., & Barka, E. A. (2018). *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN-Plants Interaction: From Perception to the Induced Mechanisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 2093. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02093>

- Evans H.J., Russell S.A. (1971) Química fisiológica de la fijación simbiótica de nitrógeno por las legumbres. En: Postgate J.R. (eds) *The Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Fixation*. Springer, Boston, MA.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1818-7_6
- Ferguson, B. J., Li, D., Hastwell, A. H., Reid, D. E., Li, Y., Jackson, S. A., & Gresshoff, P. M. (2014). The soybean (*Glycine max*) nodulation-suppressive CLE peptide, Gm RIC 1, functions interspecifically in common white bean (*Phaseolus vulgaris*), but not in a supernodulating line mutated in the receptor Pv NARK. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), 1085-1097.
- Ferrera, C. R., Gonzalez, C. M. C. A., & Rodriguez, M. M. N. (1993). *Manual de agromicrobiología*. Mexico: Trillas pp.45-46.
- Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., & Velázquez, E. (2020). Historia y estado taxonómico actual del género *Agrobacterium*. *Microbiología sistemática y aplicada*, 43(1), 126046.
<https://doi.org/10.1016/j.syapm.2019.126046>
- Flores, M., Mavingui, P., Girard, L., Perret, X., Broughton, W. J., Martínez-Romero, E., Dávila, G., & Palacios, R. (1998). Three replicons of *Rhizobium* sp. Strain NGR234 harbor symbiotic gene sequences. *Journal of bacteriology*, 180(22), 6052–6053.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.22.6052-6053.1998>
- Geniaux, E., Flores, M., Palacios, R., & Martinez, E. (1995). Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(2), 392-394.
<https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-392>
- Gómez-Padilla, E., Ruiz-Díez, B., Fajardo, S., Eichler-Loebermann, B., Samson, R., Van-Damme, P., ... & Fernández-Pascual, M. (2017). Caracterización de rizobios aislados de nódulos de frijol caupí, en suelos salinos de Cuba. *Cultivos Tropicales*, 38(4), 39-49.
- Gray, M. W., & Doolittle, W. F. (1982). Has the endosymbiont hypothesis been proven?. *Microbiological reviews*, 46(1), 1–42.
<https://doi.org/10.1128/mr.46.1.1-42.1982>
- Gray M. W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *International review of cytology*, 141, 233–357.
[https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)62068-9](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)62068-9)

- Gray M. W. (2017). Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later. *Molecular biology of the cell*, 28(10), 1285–1287. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-07-0509>
- Guerrero, R., Margulis, L., & Berlanga, M. (2013). Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 16(3), 133–143. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.188>
- Haag, A. F., Arnold, M. F., Myka, K. K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P., & Ferguson, G. P. (2013). Conocimientos moleculares sobre el desarrollo de bacteroides durante la simbiosis Rhizobium-leguminosa. *Revisiones de microbiología de FEMS*, 37(3), 364–383. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12003>
- Haukka, K., Lindström K. & Young P.J.W. 1998. The phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:419-426. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.2.419-426.1998>
- Hofman G & Cleemput O.V. (2004) Soil and plant nitrogen. International Fertilizer Industry Association (IFA), Paris, France, pp 1–48 https://www.fertilizer.org/images/Library_Downloads/2004_IFA_Soil%20Plant%20Nitrogen.pdf
- Igiehon, N. O., Babalola, O. O., & Aremu, B. R. (2019). Genomic insights into plant growth promoting rhizobia capable of enhancing soybean germination under drought stress. *BMC microbiology*, 19(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1536-1>
- Imachi, H., Nobu, M. K., Nakahara, N., Morono, Y., Ogawara, M., Takaki, Y., ... & Matsui, Y. (2020). Isolation of an archaeon at the prokaryote–eukaryote interface. *Nature*, 577(7791), 519-525. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1916-6>
- Koonin E. V. (2015). Origin of eukaryotes from within archaea, archaeal eukaryome and bursts of gene gain: eukaryogenesis just made easier?. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1678). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0333>
- Larrainzar, E., Villar, I., Rubio, M.C., Pérez-Rontomé, C., Huertas, R., Sato, S., Mun, J. H., & Becana, M. (2020). Hemoglobinas en la simbiosis leguminosa-Rhizobium. *El nuevo fitólogo*, 228(2), 472–484. <https://doi.org/10.1111/nph.16673>

- Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de rhizobia. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(1-2), 43-60. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3426>
- López-García, P., & Moreira, D., (1998). Symbiosis between methanogenic archaea and δ -proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *Journal of molecular evolution*, 47(5), 517-530. <https://doi.org/10.1007/pl00006408>
- López-García, P., & Moreira, D. (2006). Selective forces for the origin of the eukaryotic nucleus. *Bioessays*, 28(5), 525-533. <https://doi.org/10.1002/bies.20413>
- López-García, P., & Moreira, D. (2020). The Syntrophy hypothesis for the origin of eukaryotes revisited. *Nature Microbiology*, 5(5), 655-667. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0710-4>
- Lu, Z., Fu, T., Li, T., Liu, Y., Zhang, S., Li, J., Dai, J., Koonin, E. V., Li, G., Chu, H., & Li, M. (2020). Coevolution of Eukaryote-like Vps4 and ESCRT-III Subunits in the Asgard Archaea. *mBio*, 11(3), e00417-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00417-20>
- Luo, X., Wu, W., Liang, Y., Xu, N., Wang, Z., Zou, H., & Liu, J. (2020). Tyrosine phosphorylation of the lectin receptor-like kinase LORE regulates plant immunity. *The EMBO journal*, 39(4), e102856. <https://doi.org/10.15252/emj.2019102856>
- Margulis, L. (1970). *Origin of eukaryotic cells: Evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant and animal cells on the precambrian Earth*. Yale University Press.
- Margulis L. (1971). Symbiosis and evolution. *Scientific American*, 225(2), 48–57. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0871-48>
- Martin, W., & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, 392(6671), 37–41. <https://doi.org/10.1038/32096>
- Martínez-Romero, E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC genomics*, 13, 735. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating

Phaseolus vulgaris L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International journal of systematic bacteriology*, 41(3), 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>

- Martinson, V. G., Gawryluk, R., Gowen, B. E., Curtis, C. I., Jaenike, J., & Perlman, S. J. (2020). Multiple origins of obligate nematode and insect symbionts by a clade of bacteria closely related to plant pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(50), 31979–31986. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000860117>
- Mehta, A. P., Supekova, L., Chen, J. H., Pestonjamas, K., Webster, P., Ko, Y., Henderson, S. C., McDermott, G., Supek, F., & Schultz, P. G. (2018). Engineering yeast endosymbionts as a step toward the evolution of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), 11796–11801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813143115>
- Murray J. D. (2011). Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 24(6), 631–639. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0181>
- Mus, F., Crook, M. B., García, K., García Costas, A., Geddes, B. A., Kouri, E. D., Paramasivan, P., Ryu, M. H., Oldroyd, G., Poole, P. S., Udvardi, M. K., Voigt, C. A., Ané, J. M. & Peters, J. W. (2016). La fijación simbiótica de nitrógeno y los desafíos para su extensión a las no leguminas. *Microbiología aplicada y ambiental*, 82(13), 3698–3710. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16>
- Mylona, P., Pawlowski, K., & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant cell*, 7(7), 869–885. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.869>
- Nápoles, M. C., Martínez, J., & Velazco, A. C. (2003). Inducción de la nodulación en soya (*Glycine max* (L.) Merrill) por *Bradyrhizobium* sp. Influencia del medio de cultivo.[Tesis de grado]; Universidad de La Habana
- Nápoles García, M.C., Cabrera Pino, J.C., Onderwater, R., Wattiez, R., Hernández Forte, I., Martínez González, L., & Núñez Vázquez, M. (2016). Señales producidas por *Rhizobium leguminosarum* en la interacción con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cultivos Tropicales*, 37(2), 37-44.
- NASA 2020 [Earth Fact Sheet \(nasa.gov\)](https://www.nasa.gov)
- National Institute of General Medical Sciences.National Institute of Allergy and Infectious Diseases.National Institutes of Health.. (1984) Recombinant DNA technical bulletin volume 7(2). United States. Office of Recombinant DNA Activities.

- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., Shiguyoshi Nakatani, A., Silva Batista, J. S., Oliveira Chueire, L. M., Souza, R. C., Ribeiro Vasconcelos, A. T., Megías, M., Hungria, M., & Martínez-Romero, E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC genomics*, 13, 735. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>
- O'Toole G. A. (2016). Classic Spotlight: How the Gram Stain Works. *Journal of bacteriology*, 198(23), 3128. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-16>
- Parsa, S., Ortiz, V. & Vega, FE (2013). Establecer entomopatógenos fúngicos como endófitos: hacia el control biológico endofítico. *Revista de experimentos visualizados: JoVE* , (74), 50360. <https://doi.org/10.3791/50360>
- Puri, K.M., Butardo, V. & Sumeria, H.(2021) Evaluación de la endosimbiosis natural para avanzar hacia la endosimbiosis artificial. *Simbiosis* 84, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00741-5>
- Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R., & Blankenship, R. E. (2004). La historia natural de la fijación de nitrógeno. *Biología molecular y evolución*, 21(3), 541-554. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh047>
- Raza, A., Zahra, N., Hafeez, M. B., Ahmad, M., Iqbal, S., Shaukat, K., & Ahmad, G. (2020). Nitrogen Fixation of Legumes: Biology and Physiology. In *The Plant Family Fabaceae* (pp. 43-74). Springer, Singapore.
- Reisenauer H.M., Nielsen, D.R. & Macdonald, J.G. (1973) Soil Plant Nitrogen Relationships. Absorption and utilization of ammonium nitrogen in plants. Academia Press 157-170 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-518402-1.50013-5>
- Satori, C. P., Henderson, M. M., Krautkramer, E. A., Kostal, V., Distefano, M. D., & Arriaga, E. A. (2013). Bioanalysis of eukaryotic organelles. *Chemical reviews*, 113(4), 2733–2811. <https://doi.org/10.1021/cr300354g>
- Schultze, M., & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual review of genetics*, 32, 33–57. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.33>
- Searcy, D. (2003). Integración metabólica durante el origen evolutivo de las mitocondrias. *Cell Res* 13, 229-238 <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290168>
- Sheibani R., Rattei T., Sessitsch A., Trognitz F., Mitter B., Hartmann A., Jansson J., (2015). Transcriptome Profiling of the Endophyte Burkholderia

phytofirmans PsJN Indicates Sensing of the Plant Environment and Drought Stress MBio 6, e00621–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00621-15>

- Sinharoy, S., Liu, C., Breakspear, A., Guan, D., Shailes, S., Nakashima, J., Zhang, S., Wen, J., Torres-Jerez, I., Oldroyd, G., Murray, J. D., & Udvardi, M. K. (2016). A *Medicago truncatula* Cystathionine- β -Synthase-like Domain-Containing Protein Is Required for Rhizobial Infection and Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant physiology*, 170(4), 2204–2217. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01853>
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., & Król, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories*, 5, 7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-7>
- Spang, A., Saw, J. H., Jørgensen, S. L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A. E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., & Ettema, T. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, 521(7551), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>
- Spang, A., Stairs, C. W., Dombrowski, N., Eme, L., Lombard, J., Caceres, E. F., Greening, C., Baker, B. J., & Ettema, T. (2019). Proposal of the reverse flow model for the origin of the eukaryotic cell based on comparative analyses of Asgard archaeal metabolism. *Nature microbiology*, 4(7), 1138–1148. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0406-9>
- Uribe-Alvarez, C., Chiquete-Félix, N., Morales-García, L., Bohórquez-Hernández, A., Delgado-Buenrostro, N. L., Vaca, L., ... & Uribe-Carvajal, S. (2019). *Wolbachia pipientis* grows in *Saccharomyces cerevisiae* evoking early death of the host and deregulation of mitochondrial metabolism. *MicrobiologyOpen*, 8(4), e00675. <https://doi.org/10.1002/mbo3.675>
- Van de Sande, K., & Bisseling, T. (1997). Signalling in symbiotic root nodule formation. *Essays in biochemistry*, 32, 127-142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9493016/>
- Vasconcelos M.W. et al. (2020) The Biology of Legumes and Their Agronomic, Economic, and Social Impact. In: Hasanuzzaman M., Araújo S., Gill S. (eds) The Plant Family Fabaceae. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4752-2_1
- Vincent, J. M. (1975). Manual práctico de rizobiología. Editorial Hemisferio Sur . Buenos Aires . Argentina.

- Waelkens, F., Voets, T., Vlassak, K., Vanderleyden, J., & van Rhijn, P. (1995). The nodS gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Molecular plant-microbe interactions* : *MPMI*, 8(1), 147–154. <https://doi.org/10.1094/mpmi-8-0147>
- Wan J, Tanaka K, Zhang XC, Son GH, Brechenmacher L, Nguyen TH, & Stacey G. (2012) LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2012 Sep;160(1):396-406. doi: 10.1104/pp.112.201699.
- Xue-Cheng Z., Wu X., Findley S., Wan J., Libault M., Nguyen H. T., Cannon S. B. , & Stacey G. (2007) *Plant Physiology* , 144 (2) 623-636;<https://doi.org/10.1104/pp.107.097097>
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X. (2019) Efectos beneficiosos de la colonización de hongos endófitos en las plantas. *Appl Microbiol Biotechnol* 103, 3327-3340 . <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09713-2>
- Yang, W., Li, S. P., Cui, H. T., Zou, S. H., & Wang, W. (2020). Molecular genetic mechanisms of interaction between host plants and pathogens. *Yi chuan = Hereditas*, 42(3), 278–286. <https://doi.org/10.16288/j.ycz.20-015>
- Zachar, I., & Boza, G. (2020). Endosymbiosis before eukaryotes: mitochondrial establishment in protoeukaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(18), 3503-3523.<https://doi.org/10.1007/s00018-020-03462-6>
- Daza, L. D., & Rosas, A. S. (2017). Caracterización de la nodulación de un vivero diferencial de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) con aislamientos y poblaciones residentes de *Rhizobium* spp. de Honduras.<https://bdigital.zamorano.edu/items/388e2956-e08b-4db5-9179-62fa849bacfa>
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E. F., Saw, J. H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K. W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K. U., Stott, M. B., Nunoura, T., Banfield, J. F., Schramm, A., Baker, B. J., Spang, A., & Ettema, T. J.(2017). Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*, 541(7637), 353–358.<https://doi.org/10.1038/nature21031>
- Zipfel, C., & Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes?. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 353-360.<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.004>

13. ANEXO

Gen *nifH* *Rhizobium tropici*

Rhizobium tropici CIAT 899 nitrogenase reductase (*nifH*) gene, complete cds

GenBank: JX863573.1

GenBank Graphics

>JX863573.1 *Rhizobium tropici* CIAT 899 nitrogenase reductase (*nifH*) gene, complete cds

```
ATGGAACGAAAGAAGGAAGGCAACATGTCAGATTTGCGTCAAATCGCATTCTACGGCAAAGGGGGCATCG
GCAAGTCCACCACCTCACAAAATACGCTCGCAGCCCTTGTGATCTCGGGCAGAAGATCCTGATCGTCGG
CTGCGATCCCAAAGCCGACTCCACCCGCCTGATCTTGAAGTGAAGGCGCAGGACACCGTGCTGCATCTA
GCGGCACAGGAAGGTTCCGGTGAAGACCTCGAACTCGAGGACGTGCTCAAAATCGGCTATAAGGGCATC
AAGTGCGTAGAGTCCGGGGGCCCGGAGCCGGGTGTTGGTTGCGCCGGCCGCGGGCGTCATCACCTCCAT
CAACTTCCTTGAGGAAAACGGCGCCTACGACAATGTCGACTATGTCTCCTATGACGTGCTCGGGCAGTC
GTGTGCGGCGGCTTCGCAATGCCGATCCGCGAGAACAAGGCCAGGAAATCTACATCGTCATGTCCGGC
GAGATGATGGCGCTTTACGCGGCAAACAACATCGCCAAGGGCATCCTGAAATATGCCCATGCAGGCGGGC
TGAGGCTCGGGGGTCTGATCTGCAACGAGCGCCAGACGGACCGCGAGATCGACCTCGCCGAGGCCCTG
GCCTCCAGGCTCAATTCCAAGCTCATCCATTTGTCGCGCGCGACAACATCGTCCAGCACGCCGAGCTCA
GGAAGATGACGGTCATCCAGTATGCGCCGGATTCCAAACAGGCCGGAGAATATCGCACCCCTGGCTGAGAA
AATTCATGCCAATTCGGGTCAAGGGACCGTCCCGACCCCGATCACCATGGAAGAGCTCGAGGACATGCTG
CTCGACTTCGGCATCATGAAGACCGACGAGCAGATGCTTGCGGAACTTCAGGCCAAGGAATCGAAGGTGG
CGGCCGCCCAATAA
```

Diseño de oligonucleótidos nifH1

ATGGAACGAAAGAAGGAAGGCAACATGTCAGATTTGCGTCAAATCGCATTCTACGGCAAAGGGGGCATCG
GCAAGTCCACCACCTCACAAAATACGCTCGCAGCCCTTGTCGATCTCGGGCAGAAGATCCTGATCGTCCG
CTGCGATCCCAAAGCCGACTCCACCCGCCTGATCTTGAAGTGAAGGCGCAGGACACCGTGCTGCATCTA
GCGGCACAGGAAGGTTTCGGTGAAGACCTCGAACTCGAGGACGTGCTCAAAATCGGCTATAAGGGCATC
AAGTGCGTAGAGTCCGGGGGCCCCGGAGCCGGGTGTTGGTTGCGCCGGCCGCGGCGTCATCACCTCCAT
CAACTTCCTTGAGGAAAACGGCGCCTACGACAATGTCGACTATGTCTCCTATGACGTGCTCGGCGACGTC
GTGTGCGGCGGCTTCGCAATGCCGATCCGCGAGAACAAGGCCAGGAAATCTACATCGTCATGTCCGGC
GAGATGATGGCGCTTTACGCGGCAAACAACATCGCCAAGGGCATCCTGAAATATGCCCATGCAGGCGGCG
TGAGGCTCGGGGTCTGATCTGCAACGAGCGCCAGACGGACCGCGAGATCGACCTCGCCGAGGCCCTG
GCCTCCAGGCTCAATTCCAAGCTCATCCATTTGTCGCGCGCACAACATCGTCCAGCACGCCGAGCTCA
GGAAGATGACGGTCATCCAGTATGCGCCGGATTCCAAACAGGCCGGAGAATATCGCACCTGGCTGAGAA
AATTCATGCCAATTCGGGTCAAGGGACCGTCCCACCCCGATCACCATGGAAGAGCTCGAGGACATGCTG
CTCGACTTCGGCATCATGAAGACCGACGAGCAGATGCTTGCGGAACTTCAGGCCAAGGAATCGAAGGTGG
CGGCCGCCAATAA

CATCACCTCCATCAACTTCC (NIFH FW 1)

CGTA GCGCCATCATCTC (NIFH REV 1)

GCAT CGCGGTAGTAGAG (COMPLEMENTARIO DE REV)

C A T C A C C T C C A T C A A C T T C C T T G A G G A A A A C G G C G C C T A C G A C A A
T G T C G A C T A T G T C T C C T A T G A C G T G C T C G G C G A C G T C G T G T G C G G
C G G C T T C G C A A T G C C G A T C C G C G A G A A C A A G G C C C A G G A A A T C T A
C A T C G T C A T G T C C G G C G A G A T G A T G G C G C T

165 pb

Diseño de oligonucleótidos nifH2

ATGGAACGAAAGAAGGAAGGCAACATGTCAGATTTGCGTCAAATCGCATTCTACGGCAAAGGGGGCATCG
GCAAGTCCACCACCTCACAAAATACGCTCGCAGCCCTTGTGATCTCGGGCAGAAGATCCTGATCGTCGG
CTGCGATCCCAAAGCCGACTCCACCCGCTGATCTTGAACTCGAAGGCGCAGGACACCGTGCTGCATCTA
GCGGCACAGGAAGGTTCCGGTGAAGACCTCGAACTCGAGGACGTGCTCAAATCGGCTATAAGGGCATCA
AGTGCGTAGAGTCCGGGGGCCGAGCCGGGTGTTGGTTGCGCCGGCCGCGGCGTCATCACCTCCATCAA
CTTCCTTGAGGAAAACGGCGCCTACGACAATGTCGACTATGTCTCCTATGACGTGCTCGGCGACGTGCTG
TGCGGGCGCTTCGCAATGCCGATCCGCGAGAACAAGGCCAGGAAATCTACATCGTCATGTCCGGCGAGA
TGATGGCGCTTACGCGCAAACAACATCGCCAAGGGCATCCTGAAATATGCCATGCAGGCGGCGTGAG
GCTCGGGGGTCTGATCTGCAACGAGCGCCAGACGGACCGCGAGATCGACCTCGCCGAGGCCCTGGCCTCC
AGGCTCAATTCCAAGCTCATCCATTTCTGTCGCGCGGACAACATCGTCCAGCACGCCGAGCTCAGGAAGA
TGACGGTCATCCAGTATGCGCCGGATTCCAACAGGCCGGAGAATATCGCACCTGGCTGAGAAAATTCA
TGCCAATTCGGGTCAAGGGACCGTCCCAGCCCGATCACCATGGAAGAGCTCGAGGACATGCTGCTCGAC
TTCGGCATCATGAAGACCGACGAGCAGATGCTTGCGGAACCTCAGGCCAAGGAATCGAAGGTGGCGGCCG
CCCAATAA

AGTCCACCACCTCACAAAATAC (NIFH FW2)

ACTCTACGCACTTGATGCCC (NIF REVERSE 2)

TGAGATGCGTGAACACTACGGG COMPLEMENTARIO DE REVERSE

A G T C C A C C A C C T C A C A A A T A C G C T C G C A G C C C T T G T C G A T C T C G
G G C A G A A G A T C C T G A T C G T C G G C T G C G A T C C C A A A G C C G A C T C C A
C C C G C C T G A T C T T G A A C T C G A A G G C G C A G G A C A C C G T G C T G C A T C
T A G C G G C A C A G G A A G G T T C G G T G G A A G A C C T C G A A C T C G A G G A C
G T G C T C A A A A T C G G C T A T A A G G G C A T C A A G T G C G T A G A G T

219 pb

Ejemplo de comparaciones en BLAST para el gen *nifH* de *Rhizobium tropici* CIAT 889

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. CCGE532 plasmid pRCCGE532b, complete sequence	Rhizobium sp. C...	1652	1652	100%	0.0	100.00%	506160	CP032692.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium tropici CIAT 889 nitrogenase reductase (nifH) gene, complete cds	Rhizobium tropic...	1652	1652	100%	0.0	100.00%	918	JX863573.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium tropici CIAT 889 plasmid pRtrCIAT899b, complete sequence	Rhizobium tropic...	1652	1652	100%	0.0	100.00%	549467	CP004017.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. CCGE531 plasmid pRCCGE531b, complete sequence	Rhizobium sp. C...	1607	1607	100%	0.0	99.11%	577596	CP032687.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. NXC24 plasmid pRspNXC24b, complete sequence	Rhizobium sp. N...	1513	1513	100%	0.0	97.20%	489086	CP024313.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. NCHA22 NifH (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp. N...	1423	1423	87%	0.0	99.49%	800	DQ284983.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium jaguaris strain CCGE525 plasmid pRCCGE525b, complete sequence	Rhizobium jagua...	1402	1402	100%	0.0	94.97%	550563	CP032696.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTCCb7 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1351	1351	81%	0.0	100.00%	731	MW159842.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTWCb5 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1349	1349	81%	0.0	100.00%	730	MW159845.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTCCb8 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1349	1349	81%	0.0	100.00%	730	MW159840.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTWCb10 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1328	1328	81%	0.0	99.72%	725	MW159846.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium tropici isolate RP261 NifH (nifH) gene, partial cds	Rhizobium tropici	1321	1321	79%	0.0	100.00%	715	DQ413021.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTWCb6 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1317	1317	79%	0.0	100.00%	713	MW159841.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. TUTPVA117 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp. T...	1304	1304	79%	0.0	99.58%	715	KT163087.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. strain TUTUCb1 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp.	1303	1303	83%	0.0	98.13%	747	MW159843.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. TUTPVA110 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Rhizobium sp. T...	1288	1288	78%	0.0	99.72%	703	KT163100.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium tropici MIR7 nif gene, nitrogenase iron protein, partial sequence	Rhizobium tropici	1216	1216	82%	0.0	96.59%	734	LC461121.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium gallicum strain IE4872 plasmid pRgalIE4872c, complete sequence	Rhizobium gallic...	1214	1214	100%	0.0	91.16%	506339	CP017104.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Sinorhizobium americanum CCGM7 plasmid B, complete sequence	Sinorhizobium a...	1208	1208	100%	0.0	91.06%	547106	CP013053.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium gallicum strain M101 plasmid pRGM101a, complete sequence	Rhizobium gallic...	1197	1197	100%	0.0	90.83%	513852	CP092345.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Sinorhizobium americanum strain CFNEI 73 plasmid B, complete sequence	Sinorhizobium a...	1192	1192	100%	0.0	90.73%	586526	CP013109.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium gallicum bv. gallicum R602 plasmid pRgalR602b, complete sequence	Rhizobium gallic...	1192	1192	100%	0.0	90.72%	507254	CP006879.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Sinorhizobium fredii strain NXT3 plasmid pSfreNXT3b, complete sequence	Sinorhizobium fr...	1158	1158	100%	0.0	90.06%	499999	CP024309.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium huakuii strain 583 plasmid p_1, complete sequence	Mesorhizobium ...	1153	1153	100%	0.0	89.94%	686467	CP050299.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium mesoamericanum CCGE 501 nitrogenase Fe protein (nifH) gene, complete cds	Rhizobium meso...	1153	1153	100%	0.0	89.93%	894	JN021929.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium etli strain NXC12 plasmid pRetNXC12d, complete sequence	Rhizobium etli	1147	2290	97%	0.0	90.46%	543095	CP020910.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. NXC14 plasmid pRspNXC14a, complete sequence	Rhizobium sp. N...	1147	2290	97%	0.0	90.46%	530065	CP021031.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Ensifer adhaerens strain R7-601 nitrogenase reductase (nifH) gene, partial cds	Ensifer adhaerens	1147	1147	99%	0.0	89.98%	888	KR075968.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium etli bv. mimosae str. Mim1 plasmid pRetMIM1e, complete sequence	Rhizobium etli b...	1147	2290	97%	0.0	90.46%	615363	CP005955.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Ensifer mexicanus strain ITTG R7 plasmid pEmeITTG7b, complete sequence	Ensifer mexicanus	1146	1146	99%	0.0	89.81%	455676	CP041240.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhizobium sp. IE4771 plasmid pRetIE4771b, complete sequence	Rhizobium sp. I...	1142	2273	97%	0.0	90.34%	393846	CP006988.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium sp. 131-2-5 DNA, complete genome	Mesorhizobium ...	1142	1142	100%	0.0	89.72%	7075387	AP023249.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium sp. 131-2-1 DNA, complete genome	Mesorhizobium ...	1142	1142	100%	0.0	89.72%	6822576	AP023247.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium loti strain 582 plasmid p_1, complete sequence	Mesorhizobium loti	1142	1142	100%	0.0	89.71%	655882	CP050295.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium loti MAFF303099 DNA, complete genome	Mesorhizobium j...	1142	1142	100%	0.0	89.72%	7036071	BA000012.4
<input checked="" type="checkbox"/>	Mesorhizobium loti strain SU343 chromosome, complete genome	Mesorhizobium loti	1136	1136	100%	0.0	89.61%	6934480	CP033368.1