

318486



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE FIJACION  
DE NITROGENO

BACTERIAS ENDOFITAS DEL PLATANO (*Musa* spp.)  
Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE LAS  
PLANTAS

**T E S I S**

Q U E P R E S E N T A :

LUCIA LOURDES MARTINEZ MARTINEZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

CIFN

TUTOR: DRA. ESPERANZA MARTINEZ ROMERO



UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

MAYO 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

*La suprema felicidad de la vida es la  
convicción de que somos amados.*

*Victor Hugo.*

*Los libros son, entre mis consejeros,  
los que más me agradan, porque ni el  
temor ni la ambición les impiden  
decirme lo que debo hacer.*

*Alfonso M.*

## D E D I C A T O R I A S

A DIOS  
POR PERMITE  
REALIZAR UN SUEÑO MAS  
EN MI VIDA.

### A MIS PADRES

TOMASITA Y LEONARDO

CON GRATITUD, CARIÑO Y RESPETO  
POR APOYARME Y COMPRENDERME  
EN MI FORMACION PERSONAL,  
ESPIRITUAL Y PROFESIONAL.

### A MIS HERMANAS

ANA, PATY, GEO E IRA

CON SU EJEMPLO Y DEDICACION  
ME GUIARON PARA LOGRAR DAR  
UN PASO MAS EN MI VIDA.

A MI AMIGA  
LUCY (La gaviota)  
POR SU AMISTAD  
Y APOYO DURANTE  
TODO ESTE TIEMPO.

## AGRADECIMIENTOS

A Lili, Mar, Celin y Alma por permitirme ser parte de su vida.

A mis amigos Cris, Vero, Karis, Jacobo, Ara, Magda, Perla, Sofy, Emma y Mario por su apoyo, amistad, respeto y cariño.

A todos los que forman parte del laboratorio de Ecología Microbiana y Molecular por su ayuda y paciencia durante todo este tiempo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno por darme la oportunidad de formar parte de ellos

A la Dra. Esperanza Martínez Romero por su apoyo y confianza.

A los integrantes del comité tutorial, Dra. Valeria Souza Saldivar y Dr. Jesús Caballero Mellado por la contribución al presente trabajo.

A los miembros del jurado Dra. Guadalupe Espín Ocampo, Dra. Carmen Wachter Rodarte, Dra. Valeria Souza Saldivar, Dr. Lorenzo Segovia Forcella, Dr. Juan José Peña Cabriales y Dr. Juan Miranda Ríos por la revisión y comentarios a la tesis.

Al Biol. Aldo Valera Vásquez por su ayuda técnica al presente trabajo.

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México dentro del Programa de Ecología Microbiana y Molecular, bajo la dirección de la Dra. Esperanza Martínez Romero.

Se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y de la Dirección General de Estudios de Postgrado de la UNAM.

## INDICE

	PAGINA
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
I.- INTRODUCCION	5
1.- Diversidad microbiana	5
2.- Fijación de nitrógeno	7
3.- Endófitos bacterianos	8
3.1. Fijación de nitrógeno por endófitos	14
4.- Plátano	18
4.1 Historia y distribución	18
4.2 Clasificación	19
4.3 Morfología	19
4.4 Fertilización	20
4.5 Plagas y enfermedades	20
II.- OBJETIVO	22
III.- RESULTADOS	23
1.- Artículo "Diazotrophic bacteria associated with banana ( <i>Musa</i> spp.)"	
2.- Resultados adicionales	24
2.1 Colonización	24
2.2 Efectos de inoculación en plantas de plátano	25
2.2.1 Condiciones de laboratorio	25
2.2.2 Condiciones de vivero	26
2.3 Artículo de revisión	
Dicotomía bacteriana: simbiote o patógeno.	
Ejemplos en <i>Klebsiella</i> , en rhizobia ( $\alpha$ y $\beta$ ) y <i>Brucella-Ochrobactrum</i> .	28
IV.- DISCUSION Y PERSPECTIVAS	57
V.- CONCLUSIONES	62
VI.-REFERENCIAS	63
VII.- ANEXOS	71
1.- Metodología	72
2.- Medios de cultivo	77

## RESUMEN

El estudio de la biodiversidad es una de las áreas de investigación que se califica de gran relevancia dado que existe un desconocimiento de la inmensa mayoría (95 – 99%) de los microorganismos existentes en la naturaleza, los cuales pudieran producir compuestos útiles al hombre o participar en procesos biológicos de utilidad como la fijación biológica de nitrógeno.

Además de *Rhizobium* existen especies de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que pueden contribuir a la productividad en plantas de interés agrícola. La caracterización de bacterias diazótroficas encontradas dentro de las plantas (endófitas), adquirió importancia ya que los nuevos géneros o especies de diazótrofos que se encontraron colonizando el interior de raíces, tallos y hojas de la planta parecían aportar nitrógeno a sus hospederos. En el caso de la caña de azúcar la fijación de nitrógeno por bacterias asociadas permite a estas plantas prescindir de altas dosis de fertilizantes y ha servido de modelo para buscar en otras plantas sus bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno.

El plátano es un cultivo que representa una parte substancial de la alimentación, siendo el fruto que más se consume en E. U. y también en países tropicales. La producción de plátanos (*Musa* sp.) en México ocupa una superficie de 77,600 has y después de la naranja y el mango es el frutal más importante. Al iniciar esta tesis no existía ningún reporte sobre bacterias fijadoras asociadas a plátano.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y caracterizar bacterias endófitas del plátano así como determinar la capacidad de colonización y su efecto sobre el desarrollo de las plantas de plátano de algunos de los aislados endófitos.

Mediante un análisis polifásico (manejo de diferentes técnicas en el análisis taxonómico) se caracterizaron diferentes especies de Enterobacterias y una especie de *Rhizobium* con la capacidad de colonizar el interior de plantas de plátano. Las bacterias fijadoras de nitrógeno son una pequeña proporción de las bacterias que se encuentran en plantas de plátano. Se encontraron dos grupos morfológicos de *Klebsiella* parecidos a *K. pneumoniae*, además un grupo denominado grupo I con semejanzas a *Enterobacter cloacae* (el grupo mayoritario de diazótrofos de plátano) que se distingue de *E. cloacae* en base a las secuencias del gen que codifica la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, *rpoB*. Otros endófitos de plátano fueron dos grupos minoritarios relacionados a *Citrobacter freundii* o *Rhizobium undicola*.

Las cepas de *R. undicola* fueron capaces de formar nódulos en plantas de *Acacia*. Tanto cepas del grupo I como *R. undicola* colonizaron el interior del plátano y algunas de estas bacterias estimularon el desarrollo de estas plantas.

Debido a que los aislados de *Rhizobium* provenientes de plátano tienen una muy buena capacidad colonizadora y estimulan el desarrollo de las plantas de plátano, tal vez pudieran utilizarse para desplazar otras cepas bacterianas con potencial patogénico, como las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*.

## ABSTRACT

The study of microbial biodiversity is an area of research of high relevance because the vast majority (95-99%) of microorganisms present in nature has not been characterized yet. These microorganisms might have the capacity to produce compounds useful to mankind or they might participate in important biological processes such as biological nitrogen fixation.

Besides *Rhizobium* there are species of free-living nitrogen-fixing bacteria that contribute to the productivity of different important crops. One example are the diazotrophic bacteria found in plants (endophytes). The characterization of these endophytes has attained importance because these bacteria that colonize plant roots, stems and leaves might supply nitrogen to their hosts. In the case of sugar cane, it has been shown that nitrogen fixation by endophytic bacteria allows the plant to lower its needs for mineral fertilizers. This encourages the search for endophytic nitrogen fixing bacteria in other plants.

Banana crop represents a staple food that is highly consumed in the E.U. and in tropical countries. It is cultivated in Mexico on an area of 173,824 acres which means that it is the most important crop in Mexico after orange and mango. At the beginning of the work reported in this thesis no reports about nitrogen-fixing bacteria associated with banana plants were published.

The objective of this work was to isolate and characterize endophytic bacteria from banana plants and to evaluate its colonization capacity and their possible effects on the development of banana plants.

By polyphasic analysis these isolates were identified as different species of Enterobacteria and as one species of *Rhizobium* having the capacity to colonize the inside of banana plants. Nitrogen fixing bacteria are a minor proportion of the bacteria that are found in banana plants. We found two morphological groups of *Klebsiella* that are similar to *Klebsiella pneumoniae*. The main group of banana diazotrophs (called group I within this thesis) shared several characteristics with *Enterobacter cloacae* but was shown to be distinct from *E. cloacae* by analyzing *rpoB* sequences (RNA polymerase beta-subunit encoding gene). Other endophytes isolated from banana were two minor groups related to *Citrobacter freundii* and *Rhizobium undicola*.

The strains of *R. undicola* formed small ineffective nodules on Acacia. Strains from group I and *R. undicola* colonized the inside of banana plants and some bacterium stimulated plant development.

## INTRODUCCION

### 1.- Diversidad microbiana

Las bacterias se encuentran en todas partes, en la profundidad de la tierra, en las rocas y habitats de condiciones extremas (8). Varias especies bacterianas han sido aisladas de muy diversos ambientes para ser analizadas y clasificadas taxonómicamente mediante el uso de marcadores moleculares. Sin embargo la diversidad bacteriana es poco conocida, actualmente sólo un pequeño porcentaje (1-5 %) de las bacterias de comunidades naturales puede crecer en el laboratorio. Se sugiere que el número de diferentes especies de bacterias pueda ser más de 1000 millones. Se considera que el gran número de especies bacterianas se ha generado por un alto índice de especiación con respecto al índice de extinción y su largo tiempo de existencia (8).

El árbol filogenético de la vida revela más diversidad entre las bacterias que entre los eucariontes, ésta diversidad se origina y se mantiene a través de la interacción de factores ecológicos y genéticos. Dentro de los factores ecológicos se encuentra la oportunidad ecológica (nichos vacantes), esto lleva a la formulación del principio de exclusión del nicho, el cual establece que dos organismos no pueden ocupar el mismo nicho, la competencia en esta etapa llega a ser intensa y la selección favorecerá cualquier mutante que tenga acceso a nuevos recursos. Dentro de los factores genéticos se encuentra la variación, la cual se origina por mutación y recombinación y ambos procesos operan en poblaciones bacterianas, la variación es esencial para una divergencia adaptativa y la mutación es el último recurso, por ejemplo *Pseudomonas* incrementa su índice de mutación bajo stress (48), así genera una variación extra cuando es necesario y facilita su adaptación a nuevos ambientes, sin embargo no hay evidencias de que las cepas mutadoras son por si mismas adaptativas. Se conoce que el índice de mutación en bacterias generalmente se incrementa bajo stress debido a la respuesta SOS (48).

El interés para clasificar organismos es ancestral, una de las primeras clasificaciones filogenéticas presentaba un orden jerárquico, cada especie sería parte de un sólo y solamente un género, cada género sería parte de una y solamente una familia y así sucesivamente. La filogenia microbiana se puede inferir de las secuencias moleculares, la cual define, en las palabras de Zuckerkandl y Pauling "la esencia del organismo". Las primeras filogenias moleculares se establecieron basadas en secuencias de proteínas, en particular la ferredoxina y citocromos (7). Estos datos mostraron ciertas relaciones entre bacterias y dieron soporte a la teoría de la

endosimbiosis en la que se propone que la mitocondria y el cloroplasto son ancestros de las hoy llamadas alfa-proteobacterias y cianobacterias respectivamente (7).

El análisis de secuencias de genes suficientemente conservados ha sido exitosamente aplicado para establecer las relaciones filogenéticas entre organismos. El gen de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU o 16S rRNA) es el más ampliamente usado debido a que se encuentra distribuido universalmente. En la actualidad el árbol universal de la vida se basa en información de secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal, esta molécula es superior a citocromos o ferredoxinas como un cronómetro molecular, por muchas razones como lo explica Woese: es abundante, codificada por genomas tanto en procariontas como eucariontas, tiene una estructura universalmente conservada (57), es lo suficientemente pequeño para ser secuenciado y además hay disponibilidad de una gran base de datos sobre las diferentes secuencias de éste (28). Hay un desacuerdo en la credibilidad y significancia de esta clasificación, por lo que se sugiere un análisis más crítico de las filogenias basadas en rRNA y proteínas, ya que del análisis de otros genes se han derivado filogenias distintas para el mismo organismo, debido tal vez a la transferencia lateral de información genética (7).

Otros genes que se han utilizado en estudios evolutivos son pseudogenes y genes centrales en el metabolismo. Recientemente se han determinado relaciones filogenéticas entre bacterias basándose en las secuencias de genes como *recA* (9), *atpD* (5), *gyrB* (6), *rpoB* (30), *gltA* (17), *glnA* (25). Estas filogenias han corroborado en muchos casos las filogenias del 16S pero también han revelado diferencias interesantes. La glutamino sintetasa (GS) que es una enzima clave en la asimilación de nitrógeno, está conservada y duplicada en función. Una forma, GSI, ha sido encontrada únicamente en procariontes, mientras que otra forma, GSII, es encontrada en todos los eucariontes y ha sido detectada en la minoría de procariontes. Una tercer forma de GS, codificada por *glnT*, ha sido identificada solamente en rhizobia (46).

En las especies de rhizobia (término que se emplea para designar a *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*) la enzima GSII es más divergente, teniendo una movilidad diferente para cada especie, mientras que la movilidad de la enzima GSI fue idéntica en todas las especies (51). La topología de los árboles GSII difieren de la GSI y 16S en varias formas. Las relaciones entre los diferentes géneros de rhizobia inferidos de la comparación de secuencias de GSI están de acuerdo con los inferidos previamente con 16S rDNA. Las relaciones establecidas por GSII muestran pocas diferencias con las derivadas de GSI

y 16S, es posible que las anomalías encontradas puedan ser consecuencia de un evento reciente de transferencia lateral y/o de recombinación (54). Cuando se han establecido filogenias de genes relacionados con el proceso simbiótico y que se encuentran localizados en plásmidos, las historias evolutivas son independientes de las que reflejan genes cromosomales y GSII se encuentra en un megaplásmido en *Sinorhizobium* (13).

El descubrimiento más notable del análisis de secuencias del genoma completo es que la mayor parte de los genomas bacterianos son quimeras. La adquisición de genes y elementos genéticos accesorios por transferencia genética lateral mediada por plásmidos, transposones, integrones y fagos es una importante fuente de innovación para la evolución bacteriana. El genoma bacteriano es altamente dinámico acumulando secuencias ecológicamente útiles mediante transferencia genética lateral y pérdida de genes por delección (48).

## **2.- Fijación de nitrógeno**

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la capacidad que tienen algunas bacterias de convertir el nitrógeno gaseoso a amonio (39). Diversos microorganismos entre Bacterias y Archaeas son responsables de la FBN, desde cianobacterias y bacterias fotosintéticas en la superficie del suelo y suelos inundados, hasta bacterias heterotróficas en la profundidad del suelo y la zona de la raíz, así como también bacterias que se encuentran dentro de la raíz que no inducen síntomas de enfermedad y originalmente fueron descritas como microorganismos endorizosféricos (endófitos)(19).

La nitrogenasa dependiente de hierro-molibdeno es una enzima clave para la fijación de nitrógeno y es una proteína funcionalmente constante. Esta enzima se encuentra en Archaeas y Bacterias, es altamente conservada, especialmente el producto del gen *nifH* (proteína de Fe de la nitrogenasa) y su secuencia se ha utilizado en estudios de evolución molecular.

Ha sido claramente demostrado que la simbiosis entre *Rhizobia*-leguminosa, *Frankia*-plantas actinorrizicas, *Azolla-Anabaena* y *Gunnera-Nostoc* involucran una transferencia significativa de nitrógeno (N) del microsimbionte al hospedero, al cual le proporcionan los sustratos de carbono derivados de la fotosíntesis (18).

Filogenéticamente las rhizobias pertenecen a las alfa proteobacterias donde se han

reconocido varios géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium*. Mediante una taxonomía polifásica se ha revelado que miembros del género *Rhizobium* se encuentran mezclados con miembros del género *Agrobacterium* (43,56).

Los simbioses de leguminosas están filogenéticamente entremezcladas con varios géneros bacterianos no simbióticos incluyendo patógenos, fotótrofos y cepas dinitrificantes. Una notable característica ecológica de rizobias es su habilidad para crecer en diferentes ambientes. Algunas de estas bacterias saprófitas o rizosféricas pueden llegar a ser simbióticas por la adquisición horizontal de un plásmido simbiótico o una isla simbiótica cromosomal (50), permitiéndoles sintetizar y secretar lipoquitinolisacáridos específicos de la cepa para la nodulación del hospedero. Recientemente ha sido reconocido que estos simbioses de leguminosas pueden también presentarse como endófitos en las raíces de cereales tales como arroz (39,52), trigo y maíz (44,16). Las cepas de *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* han sido identificadas como endófitos (ver adelante) de diferentes cultivares de arroz, de especies que crecen silvestres o cultivadas en distintas regiones geográficas (52).

### **3.- Endófitos bacterianos**

De acuerdo a la definición de Quispel, “endófito” se refiere a un microorganismo que se encuentra, la mayor parte de su ciclo de vida, dentro de una planta sin causar síntomas de daño a la misma (36).

Este habitat interno de la planta ha sido identificado como un reservorio para el aislamiento de endófitos fijadores de nitrógeno que promueven el crecimiento de la planta, por ejemplo cepas de *Azospirillum* dentro de las raíces de arroz, *Azoarcus* dentro del pasto Kallar y *Gluconacetobacter diazotrophicus* en caña de azúcar.

Probablemente las bacterias endófitas interactúan más cercanamente con la planta, en comparación con las bacterias de la rizósfera del suelo o del rizoplano, además están protegidas de los cambios ambientales (39). Como se citó en una amplia revisión de Kabayashi y Palumbo los endófitos bacterianos gram (+) y gram (-) han sido aislados de varios tipos de tejido en numerosas especies de plantas. Estos microorganismos tienen la habilidad de penetrar dentro de la planta, encontrándose en el estele y vasos del xilema, así como en las capas externas de!

cortex. Los endófitos entran al tejido de la planta a través de la zona de la raíz; sin embargo, porciones aéreas de la planta tales como flores, tallos y cotiledones pueden también ser usados para entrar. Específicamente, las bacterias entran al tejido vía radículas de germinación, raíces secundarias, estomas o como resultado de daño foliar (23).

Una vez dentro de la planta los endófitos se pueden distribuir sistémicamente y alcanzar el tejido aéreo, probablemente vía los vasos del xilema. Un paso inicial en la entrada a la planta es la adhesión a la superficie de las raíces. Por ejemplo, en *Azoarcus* sp. BH72 un pili tipo IV parece estar involucrado en este proceso, colonizando primeramente las puntas de las raíces en la zona de elongación y diferenciación donde la bacteria puede invadir inter e intracelularmente y penetrar al tejido central que más tarde se diferenciará en el estele. Otra ruta de entrada parece ser los puntos de emergencia de las raíces laterales donde la lamela media es utilizada en la distribución de las bacterias en la planta, tal vez con la ayuda de enzimas pécticas que la rompan, sin embargo esto no ha sido estudiado con detalle en endófitos diazotrofos. Además para una colonización intracelular se sugiere que estén involucradas enzimas celulolíticas (40).

Los endófitos como *G. diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp. y algunas cepas de *Azospirillum brasilense* tienden a colonizar el cortex radicular, incluso pueden penetrar la endodermis para colonizar la estele y de aquí ser traslocados a la parte aérea. Los endófitos no viven dentro de células sanas del hospedero, colonizan el apoplasto (espacios intercelulares), vasos del xilema y parénquima del xilema lignificado, así como células muertas. Ninguno de los endófitos diazotrofos asociados con caña de azúcar y otros pastos han sido encontrados dentro de células vivas del hospedero (19).

Para el aislamiento de endófitos, las raíces u otro material de la planta son esterilizados superficialmente y macerados (extracto de planta) para liberar las bacterias internas. Si se detecta un número mayor de bacterias en el extracto de la planta en comparación con los controles (plantas provenientes de cultivo de tejidos no inoculadas), probablemente estas bacterias provengan de una población del interior de las plantas, es decir, probablemente sean endófitos. En su aislamiento la composición del medio de cultivo es importante, ya que debe estar adaptado a las condiciones del hábitat original, por ejemplo *G. diazotrophicus* fue aislado en un medio rico en sacarosa debido a que el hospedero del cual fue obtenido (caña de azúcar) acumula altas cantidades de sacarosa (38).

Es necesario realizar estudios microscópicos para determinar si una bacteria aislada es

endófito, los mejores resultados se han obtenido cuando la muestra es embebida en resina (donde las bacterias están fijadas) o por microscopía confocal de raíces intactas. También han sido identificadas por medios inmunológicos (usando anticuerpos mono y policlonales), sondas de genes específicos o por rastreo con genes reporteros ( $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa y la proteína verde fluorescente). Estos genes han sido usados bajo el control de un promotor expresado constitutivamente y también pueden ser usados para detectar la expresión de los genes (*nif*) que codifican a la nitrogenasa (38).

Algunas especies bacterianas han sido estudiadas con más detalle como diazótrofos endófitos de diferentes plantas de importancia agronómica. Miembros del género *Alcaligenes* han sido aislados de la rizósfera de arroz, la cepa dominante parece ser *A. faecalis* A15, reclasificada como *Pseudomonas stutzeri*. Se considera como endófito por datos de micrografías de material embebido y fijado, mostrando a la bacteria dentro y fuera de células del cortex radicular. Apoyando estas observaciones, micrografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) muestran a la bacteria dentro de espacios intercelulares en el cortex radicular y dentro de células cercanas al xilema (61).

Debido a que no se utilizaron otras metodologías para confirmar la identidad de la bacteria, no se puede asegurar que las colonias observadas son de la cepa A15, ya que es fácil confundir las bacterias con organelos de la misma célula. Evidencias más reales de material embebido en resina muestran a A15 marcada con *gusA* colonizando la superficie de la raíz, particularmente la punta y las uniones laterales que permiten entrar a las bacterias a células epidérmicas donde se ha demostrado la expresión de *nifH* (55).

Los endófitos que forman parte del género *Azoarcus* spp. tienen características interesantes con respecto a la interacción planta-microorganismo. De *Azoarcus* se pensaba que sólo era endófito del pasto Kallar (*Leptochloa fusca*) por ser la única especie del cual ha sido aislado, esta planta se desarrolla en suelos salados, frecuentemente inundados y de baja fertilidad. *Azoarcus* sp. cepa BH72 puede infectar arroz creciendo gnotobióticamente, posiblemente entra por las puntas y uniones laterales de la raíz para llegar al xilema, de donde se distribuye a la parte aérea de la planta, colonizando principalmente el aerénquima del cortex radicular, donde expresa la proteína de Fe de la nitrogenasa. Al parecer *Azoarcus* es un endófito genuino de arroz así como del pasto Kallar (19).

*Azospirillum* es uno de los géneros que es generalmente considerado como bacteria

rizosférica, pero algunas cepas pueden ser también endófitas, siendo encontradas dentro de las raíces de algunas gramíneas incluyendo caña de azúcar (20). En arroz *A. lipoferum* y *A. brasilense* han sido aislados de raíces y tallos, *A. amazonense* de raíces. Evidencias microscópicas muestran la naturaleza endófitas de *Azospirillum* en arroz, con el uso de inmunodetección se localizó a la bacteria en espacios intercelulares y dentro de células muertas de hojas y raíces, también fue observada dentro de cavidades en semillas (19). Usando microscopía de luz y tinción con tetrazolio, Patriquin y Doberiner (1978) observaron a *Azospirillum lipoferum* dentro de las raíces de maíz, sorgo, trigo, *P. maximum* y *D. decumbens* (35).

Una especie de *Burkholderia*, *B. vietnamiensis* aislada de campos de arroz en Vietnam, fue la primera especie fijadora de nitrógeno de este género bacteriano (15). Algunas de estas cepas fueron aisladas de macerados de rizósfera (raíz + suelo) por lo que no pueden ser descritas aún como endófitas. Otras cepas diazotróficas fueron aisladas del interior de la raíz, tallos y hojas de plantas de arroz, y con observaciones microscópicas se sugiere que pueden entrar por grietas de la epidermis de la raíz, particularmente en puntos de emergencia de raíces secundarias y enseguida colonizar masivamente su interior (19). También se ha reportado que un número de aislados caracterizados como *Burkholderia vietnamiensis* están asociadas endofíticamente con plantas de maíz, estos fueron determinados usando medios selectivos con citrulina, patrones de restricción, patrón de proteínas y su habilidad para fijar nitrógeno (11).

Las especies de enterobacterias frecuentemente se aíslan de la rizósfera de arroz, especialmente *E. cloacae* y *E. agglomerans* (*Pantoea agglomerans*), por ser aisladas de plantas no esterilizadas superficialmente no existe evidencia de que sean endófitos. En micrografías se muestra la naturaleza endófitas de *E. asburiae* cepa JM22 en plantas no leguminosas, sugiriendo que las enterobacterias podrían ser endófitas *per se*. Una cepa diazotrofa de *Serratia marcescens* fue aislada de plantas de arroz esterilizadas superficialmente. Una fusión *nifH-gusA* de esta bacteria fue construida e inoculada en plantas de arroz, donde la bacteria expresó *nifH* y colonizó la superficie de las raíces, además de que se encontró asociada a tallos y hojas. Usando inmunodetección se observó que la bacteria coloniza el aerénquima y espacios intercelulares de la raíz, particularmente fue abundante dentro del aerénquima del tallo y vasos del xilema (19). Hay pocas evidencias de que *K. oxytoca* o cualquier otra especie de *Klebsiella* sean endófitas, la única evidencia microscópica de la colonización de arroz por *Klebsiella* sp. fue publicada por

Boonjawat (1991), quien mostró la adherencia de microcolonias a la superficie de la raíz (por medio del mucigel) (2).

Además de ser aisladas de plantas de arroz, las bacterias del género *Klebsiella* también han sido aisladas de plantas de maíz (3). Chelius y Triplett detectaron una alta similaridad (99%) entre los aislados endófitos de plantas de maíz con *K. pneumoniae* mediante el análisis de secuencias del 16S rDNAs. Estos resultados fueron sustentados al efectuar las pruebas bioquímicas (API20E). Estas bacterias fueron detectadas en raíces y tallos mediante el uso de la proteína verde fluorescente para determinar la colonización y la expresión de *nifH*, notándose que la producción de ésta por *K. pneumoniae* en maíz, estuvo limitada por la fuente de carbono, la proteína no fue detectada cuando las plantas fueron cultivadas sin una fuente de carbono externa (4).

Una especie comúnmente aislada de arroz es *Herbaspirillum seropedicae*, la cual también se encuentra en maíz (3), sorgo, caña de azúcar y otras gramíneas (33). En la mayoría de las plantas donde se ha encontrado parece colonizar principalmente la raíz (y el tallo en el caso de la caña de azúcar), pero no sobrevive en la rizósfera en forma cultivable por lo que se le considera un endófito obligado. La otra especie diazotrofa, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, también es endófito pero tiene un rango de hospedero más limitado que *H. seropedicae*, ha sido aislada de hojas, tallo y raíces de caña de azúcar así como de hojas de sorgo (33), coloniza ampliamente el xilema y los espacios intercelulares en el mesófilo y las cavidades subestomatales. Su crecimiento está restringido a hojas de variedades resistentes a la enfermedad del moteado, donde parece que únicamente forma microcolonias en el xilema, las cuales están rodeadas por material derivado del hospedero. Recientemente se ha reportado que esta especie ha sido aislada de arroz y palmas en Brasil. La naturaleza endófito de *Herbaspirillum* spp. en caña de azúcar y sorgo ha sido confirmada por microscopía electrónica y de luz junto con la inmunodetección. *H. rubrisubalbicans* y *H. seropedicae* causan una respuesta de hipersensibilidad cuando son inoculadas dentro de hojas de caña de azúcar. Estas especies colonizan las raíces de caña de azúcar entrando por las uniones de raíces laterales, colonizando posteriormente el xilema del tallo además *H. seropedicae* también se ha observado dentro de los espacios intercelulares en la hoja de una variedad de arroz (IR72). En el caso de sorgo, ambas especies colonizan las hojas, donde parece estar restringidos a vasos del xilema. Con *Herbaspirillum rubrisubalbicans* se ha mostrado que se expresa la proteína de Fe de la nitrogenasa en hojas de caña de azúcar (34) y

sorgo (21).

Se ha sugerido que *Herbaspirillum* spp. y *G. diazotrophicus* forman un nuevo tipo de asociación endófito en donde liberan una gran cantidad de nitrógeno fijado y lo suministran a la planta, sin embargo no hay evidencias experimentales de esto (39).

Recientes evidencias sugieren que puede haber una asociación “natural” entre rizobia y arroz. Entre las supuestas bacterias endófitas aisladas por Stoltzfus y colaboradores (1997) algunas mostraron similitud a *Azorhizobium caulinodans* (49). Ladha (1989) mostró que esta bacteria sobrevive en la rizósfera de arroz cuando *Sesbania rostrata* es usada como abono verde (26). Yanni (1997) ha descrito en detalle el aislamiento de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii de arroz, concluyendo que es endófito aunque no han descrito el lugar exacto de su localización en la planta. También mostraron que estas mismas cepas que son endófitas, son Fix+ y también capaces de nodular el trébol Berseem (*Trifolium alexandrinum*) (58).

La prueba de infección de la planta indicó que las rizobias nodulantes de trébol invaden naturalmente las raíces de arroz y alcanzan una densidad de población interna de aproximadamente  $1.1 \times 10^6$  endófitos/gramo de peso fresco de las raíces de arroz. De doce aislados ocho de éstos fueron endófitos de arroz, y se probaron nuevamente sobre trébol berseem, en un medio de cultivo libre de N y cada aislado fue capaz de nodular y fijar N simbióticamente con el hospedero bajo condiciones microbiológicamente controladas. Los macerados de raíces esterilizadas superficialmente de plantas inoculadas indicaron poblaciones substanciales de bacterias endófitas, las cuales variaron dependiendo de la cepa inoculada, el cultivar de arroz y el medio de crecimiento de la planta (58).

Actualmente se ha reportado que *Rhizobium* es un endófito natural de maíz. Debido a la íntima asociación entre frijol y maíz en la agricultura tradicional en los campos de México, se planteó buscar la presencia de *R. etli* bv. phaseoli en maíz. *R. etli* bv. phaseoli es la principal especie rizobial que nodula frijol aunque también se ha encontrado *R. gallicum* bv. gallicum asociado a frijol en México (47). El análisis de electroforesis de enzimas metabólicas indicó que los aislados de maíz están cercanamente relacionados a cepas de referencia de *R. etli* y a rizobias de frijol (16).

Algunas bacterias endófitas pueden ser transmitidas de generación en generación por medio de las semillas. Las semillas de muchas plantas contienen bacterias incluyendo al arroz (21). Mukhopadhyay y colaboradores (1996) aislaron cepas de *Enterobacter*, *Serratia* y *Bacillus*

sp. y mostraron que *E. agglomerans* se transmite a la siguiente generación de semillas (31). La bacteria se encontró asociada con la vaina y la cáscara de la semilla pero también fue observada dentro del tejido embrionario. Desafortunadamente, Mukhopadhyay no probó la habilidad de la fijación de nitrógeno de las cepas y no pudieron ser descritas como diazotófos endófitos. Se reportó la presencia de *H. seropedicae* y *A. brasilense* en grietas de la superficie de la semilla. Cepas diazotófas de *Alcaligenes*, *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido aisladas de plántulas de arroz germinadas a partir de semillas esterilizadas superficialmente, por lo tanto serían endófitos que provienen de la misma semilla de arroz (19).

Hasta muy recientemente, se reportaron endófitos del plátano que se clasificaron como *Burkholderia* y *Herbaspirillum* o que correspondían a un grupo nuevo dentro de las *Comamonadaceae*, todas ellas pertenecientes a las  $\beta$  proteobacterias de acuerdo a sus secuencias parciales del gen 16S ribosomal, también se encontró asociado a plátano una bacteria que se agrupó dentro las alfa proteobacterias cercano a *Ochrobactrum anthropi* (27).

El uso potencial de endófitos diazotófos ha estimulado un gran interés para estudiar este tipo de bacterias por su efecto en la promoción del crecimiento de la planta, por su acción antagónica con patógenos y la fijación biológica de nitrógeno (53,39).

### 3.1.- Fijación de nitrógeno por endófitos

Los candidatos de la fijación de N en pastos son: *G. diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp. en caña de azúcar, *Azoarcus* spp. en pasto Kallar y especies de *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* en arroz y maíz. A pesar de que *A. diazotrophicus* y *Herbaspirillum* spp. parecen ser las bacterias más numerosas que se han aislado en variedades de caña de azúcar, la correlación entre la habilidad de fijar N y el número bacteriano aun tiene que ser corroborado, actualmente es imposible atribuir la FN en esta planta a cualquier bacteria específica (18).

La localización de los diazotófos aún en altas concentraciones, ya sea que estén asociados o dentro de la planta, no significa que expresen la nitrogenasa. Sin embargo, a pesar de que la expresión de los genes *nif* y/o de la nitrogenasa y que la actividad de reducción de acetileno sea positiva, no se puede concluir que los productos de la FBN estén siendo transferidos al hospedero (19). Para concluir que una cepa bacteriana tiene la capacidad de fijar

nitrógeno es necesario establecer balances de N con micro-Kjeldahl, absorción de  $^{15}\text{N}$  o dilución isotópica.

La expresión de la nitrogenasa *in planta* parece ser en niveles bajos comparado con las bacterias de vida libre. Genes reporteros ligados a varios genes *nif* han sido usados para mostrar la expresión de *nifA* y *nifH* por *A. brasilense* sobre la superficie de la raíz de trigo. En arroz se mostró la expresión endofítica de *nifH* por *Alcaligenes faecalis* A15 y *Azospirillum irakense* dentro de células epidérmicas de la raíz, datos similares se obtuvieron con *Azoarcus* en esta planta (10, 39), pero no hay evidencia de la expresión del gen *nif* o de la nitrogenasa por *G. diazotrophicus* en asociación con caña de azúcar, solo se ha observado la capacidad de FBN mediante la reducción de acetileno en plantas inoculadas (22). Los efectos benéficos de la planta, obtenidos por la inoculación se pueden deber a la FBN asociada a la planta y a otros factores como es el caso de la producción de hormonas, incremento de la capacidad de absorción de N del suelo (por crecimiento de la raíz) (18).

Experimentos con inoculación de mutantes *nif* como controles negativos acoplados a cuidadosos estudios de balance de nitrógeno, ayudan a determinar si la fijación de nitrógeno es un factor involucrado en los efectos benéficos sobre la planta. La transferencia de N fijado de *G. diazotrophicus* a caña, se demostró usando la incorporación del gas  $^{15}\text{N}_2$ , manejando controles no expuestos al gas. Estos experimentos de balance de N indican que la planta está obteniendo parte de su contenido de N a partir de la fijación de N realizado por la bacteria. (39).

Plántulas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus*, usando cepas silvestres o mutantes *nif*, mostraron que en la ausencia de fertilizante nitrogenado la cepa silvestre incrementa la altura de las plántulas en comparación con los controles no inoculados y con las mutantes *nif*, es interesante el hecho de que este efecto no fue observado cuando el N fue adicionado al medio de crecimiento de la planta. En experimentos de incorporación de gas  $^{15}\text{N}_2$  se mostró que puede haber importante absorción de N fijado por las plantas de caña de azúcar inoculadas con *G. diazotrophicus* y que la fijación de N puede contribuir arriba del 0.5% del N total de las plantas en un periodo de 24 hrs. Sin embargo, las mutantes *nif* también incrementaron el crecimiento y/o contenido de N en las plantas, por arriba de los controles (45), lo que indica que hay otro factor involucrado diferente a la fijación de N. Este factor probablemente puede ser la producción, por *G. diazotrophicus*, de hormonas de crecimiento de la planta como es el ácido indolacético (IAA) (18).

La cantidad fijada en caña de azúcar es altamente variable y depende del genotipo de la planta y de las condiciones ambientales. Únicamente se ha mostrado FN significativa en variedades brasileñas. Tales variedades pueden fijar arriba del 70% de sus requerimientos de N, proporcionando más de 150 Kg de N fijado /ha/año (18). Esto sugiere que los bajos niveles de N mineral que se utilizan en Brasil en la producción de caña, han seleccionado variedades con una mínima respuesta al N mineral aplicado y una alta habilidad para fijar N. Sin embargo, la fijación de N por variedades brasileñas depende de condiciones óptimas de suministro de agua, disponibilidad de fósforo, potasio y de micronutrientes, especialmente el molibdeno.

En la región del delta del río Nilo se han cultivado diferentes variedades de arroz en rotación con leguminosas como es el trébol (*Trifolium alexandrinum* L.). Las especies de trébol están bien adaptadas a esta región (59) y amplios estudios agronómicos indican que esta rotación arroz-trébol puede reemplazar del 25-33% de la cantidad recomendada de fertilizante nitrogenado, necesaria para la producción óptima de arroz (39).

La inoculación de una cepa de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii (E11) tuvo como resultado una respuesta altamente significativa en el rendimiento del arroz con una aplicación de 1/3 de la dosis recomendada del fertilizante nitrogenado (48 Kg N/ha). Esta producción de grano fue mayor comparada con la aplicación única de la dosis recomendada (144 Kg N/ha) (58).

En un amplio trabajo realizado por Yanni y colaboradores se estudió la asociación entre rizobias y raíces de arroz, donde confirmaron el status taxonómico de aislados de arroz y la promoción del crecimiento de cepas endofitas rizobiales, también reportaron la expansión de raíces estimuladas por los aislados endófitos de *Rhizobium*, los efectos de la inoculación en plantas de arroz, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfatos, la producción de sideróforos, la localización de endófitos *in planta* y la producción de bacteriocinas, además identificaron los aislados benéficos como inoculantes para el cultivo de arroz e incluso la promoción del crecimiento en ciertos genotipos de maíz (59).

El Instituto Internacional de la investigación del arroz (IRRI) ha mostrado que algunos genotipos de arroz (70 probados) pueden obtener cantidades significativas de N a partir de la fijación biológica de N, encontraron que obtienen N derivado del aire con valores de 1 - 20.2% (18).

En el caso de *Klebsiella* se ha demostrado una fijación de N substancial (arriba del 19%) en arroz inoculado con la cepa silvestre o cepas modificadas genéticamente de *K. oxytoca* (19).

Yoo y colaboradores (1986) reportaron una variedad de arroz tipo Indica, C5444, con la cual se puede obtener una alta actividad de reducción de acetileno, de donde se han aislado aproximadamente 6000 cepas bacterianas de la rizósfera, entre ellas identificaron una cepa, la NG13 de *Klebsiella oxytoca*. Además evaluaron la fijación de N a largo plazo de esta cepa bacteriana, mediante el análisis del contenido de N total, prueba de reducción de acetileno, biomasa y dilución de  $^{15}\text{N}$ , obteniéndose altos incrementos con cada una de las pruebas. Los resultados indicaron que la inoculación de estas cepas incluso de la cepa mutante (no mucoide) de *K. oxytoca* promueve una significativa FN en la rizósfera de plantas de arroz (60).

La cepa E26 también aislada de la rizósfera de plantas de arroz se caracterizó como *Enterobacter cloacae* y mostró actividad en la FN en asociación con el arroz.

Con respecto a los resultados de la inoculación de cepas silvestres (NG13 y E26) y de cepas mejoradas (actividad en la FN e insensibles al amonio) se obtuvo mayor peso seco, alta dilución de la concentración de  $^{15}\text{N}$ , mayor reducción de acetileno en planta y mayor contenido de N en la planta y en el suelo (14).

En un estudio con 15 variedades de maíz se encontró que dos de éstas fijaron arriba del 58% de su N, al ser inoculadas con cepas apropiadas de *Azospirillum* spp. En sorgo no se observa FBN, tanto en controles como en plantas inoculadas con *Azospirillum/Azotobacter*. Algunos pastos tropicales como *Branchiaria humidicola*, *B. decumbes*, *Paspalum notatum* y *Panicum maximum* han mostrado rangos relativamente altos de FN, supliendo más del 40% de sus necesidades de N a partir de la fijación (18).

En la asociación pasto Kallar-*Azoarcus* usando dilución del isótopo  $^{15}\text{N}$  y abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  se ha mostrado que el pasto Kallar puede fijar arriba del 26% de su contenido de N. La bacteria más abundante de plantas esterilizadas superficialmente parece ser *Azoarcus*, arriba de  $7.3 \times 10^7 \text{gr}^{-1}$  de peso seco de la raíz. Con la fusión *nif-gfp* se mostró que *Azoarcus* puede expresar los genes de la fijación de nitrógeno. Experimentos de abundancia de  $^{15}\text{N}$  natural en pasto Kallar inoculadas con la cepa silvestre de *Azoarcus* sp. BH72 o mutantes *nif*, indican que *Azoarcus* puede fijar N *in planta* y transferir el N fijado a la planta hospedera, el mecanismo aún no se conoce, pero podría ser un proceso ineficiente de muerte y mineralización de la bacteria (18).

Se conoce que una notable diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno se asocian naturalmente con plantas cultivadas en campo y se cree que estas bacterias pudieran fijar

nitrógeno dentro de estas plantas, lo cual representaría una alternativa al uso elevado de fertilizantes nitrogenados, pero aún existen dudas de los niveles de fijación de nitrógeno que se pueden alcanzar.

#### **4.- Plátano**

El plátano es una de las más importantes frutas tropicales constituyendo la base esencial para la alimentación de algunos países, esto es más de 80 millones de humanos. Es también un producto importante de la exportación, la producción mundial de plátano se estima en más de 20 millones de toneladas anuales. África es el continente que produce más plátanos para el consumo local y América es el mayor productor comercial. En la actualidad los países latinoamericanos proveen el 90% de los plátanos que se consumen en Norteamérica. Brasil es el principal exportador, Honduras es el sexto con un total de más de 1000 millones de toneladas exportadas anualmente.

En la región Pacífico Centro de México el cultivo de plátano se considera tradicional, se estableció desde los años 20s y a partir de los 50s es importante en la economía de las familias de la zona costera de Michoacán, Colima, Jalisco y Nayarit. Actualmente en esta región existen alrededor de 17,829 hectáreas sembradas con este cultivo, siendo la variedad más usada el Enano Gigante (41).

##### **4.1.- Historia y distribución**

Alejandro el Grande habló de una visión de los sabios de la India comiendo una fruta la cual se parece estrechamente al plátano. Todas las indicaciones nos llevan a creer que los plátanos son originarios de Asia. Algunas de las especies de plátano más primitivas son aún encontradas, creciendo en forma silvestre en esta región. Los plátanos fueron propagados alrededor del mundo por exploradores. El hemisferio oeste fue explorado por los españoles en el siglo XVI llevando plantas de plátano y las introdujeron a Sudamérica, América Central y el Caribe.

Los plátanos comestibles son originarios de la India y Malasia. De esos países se distribuyeron a Asia Continental, Polinesia y África. Después del descubrimiento del nuevo mundo, este cultivo se extendió por la América Tropical.

#### **4.2.- Clasificación**

Hay más de 500 nombres documentados para diferentes variedades de plátano, aún no todos son clasificados como especies individuales. Debido a la tendencia de las plantas de plátano a la mutación, los taxónomos abandonaron hace mucho tiempo el intento por clasificar a todos.

Los plátanos pertenecen a la familia *Musacea* del orden Escitaminea. El género *Musa* es el más importante de esta familia y comprende especies que producen fibras como *Musa textilis* o abacá, especies ornamentales como *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*.

Los nombres científicos más comunes propuestos para los plátanos comestibles son: *Musa paradisiaca* L. para el plátano macho y *Musa sapientum* L. para el plátano. Ambas especies incluyen un gran número de clones o cultivares a los cuales se les asignan nombres locales en las diferentes regiones.

#### **4.3.- Morfología**

El plátano es un arbusto perenne de 2 a 8 metros de altura. Tiene un rizoma o cormo basal que produce raíces adventicias y un seudotallo formado por los pecíolos superpuestos de las hojas. Sus raíces adventicias son blancas al inicio del crecimiento, se vuelven amarillas y se endurecen a medida que van envejeciendo. Las hojas miden de 1.50 a 4 metros de longitud y 0.90 metros de ancho, la hoja está formada por una vaina envolvente que se contrae gradualmente hasta transformarse en un pecíolo, redondeado por debajo y acanalado por arriba. La inflorescencia emerge ocho meses después de plantado el hijuelo. Está formado por un pedúnculo central con nudos. En los primeros 5 a 10 nudos basales se producen las flores femeninas y en los terminales las flores masculinas, al principio encerradas por brácteas.

#### 4.4.- Fertilización

El cultivo de plátano siempre se beneficia del uso de fertilizantes. La producción de plantas fertilizadas puede ser 10 veces más alta que las plantas no fertilizadas. La cantidad de fertilizante necesario depende de la fertilidad y el tipo de suelo. Ya que el potasio y el nitrógeno son fácilmente lixiviados son aplicados en intervalos regulares durante el crecimiento de la planta.

#### 4.5.- Plagas y enfermedades

La sigatoka negra es la principal enfermedad que ataca las plantas de plátano; los nemátodos y perforadores del tallo son los principales plagas. La sigatoka negra es una enfermedad que cubre de manchas la hoja, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Las hojas primeramente muestran manchas amarillas, después se tornan café y luego son negras, finalmente el tejido llega a ser necrótico y muere. Esta enfermedad puede ser controlada con aplicaciones aéreas de fungicidas que pertenecen a los grupos del benomil, bensimidazoles, ditiocarbamatos, imidazoles, metiltiofanatos o fungicidas que son aplicados en el suelo como el triadimefon y el triadimenol. En cualquier caso se deben utilizar al menos dos tipos de fungicidas que serían usados alternativamente para prevenir que el hongo desarrolle resistencia al ingrediente activo.

El plátano es amenazado por numerosos patógenos y plagas, por lo tanto, la creación de nuevas variedades de plantas de plátano resistentes a estas enfermedades y plagas con buena calidad del fruto (control del sabor, forma, color y rigidez de la pulpa) es importante para su mejoramiento. El mejoramiento genético por el método de producción clásico frecuentemente encuentra el problema de esterilidad, el cual caracteriza a la mayoría de genotipos de plátano. La hibridación somática a través de la fusión de protoplastos sería un potencial alternativo para evitar las barreras de esterilidad (1).

Los plátanos son plantas típicas de las tierras bajas húmedas, en forma general su cultivo no se recomienda en las regiones tropicales de tierras altas con una elevación mayor a los 1,000 m, siendo la única excepción las formas enanas. Las condiciones ideales para el cultivo del plátano en las tierras bajas de las regiones tropicales son los suelos aluviales, con una reacción

que varía entre un pH 4.5 y 7.5, una precipitación pluvial más o menos distribuida uniformemente por todo el año y la protección contra los vientos fuertes. Este último punto es importante, puesto que el daño excesivo a las hojas suaves que se rompen fácilmente por el viento fuerte, reduce seriamente la productividad de las plantas (32).

## **OBJETIVO**

Aislar e identificar bacterias endófitas del plátano (*Musa* spp.) y evaluar los efectos de las fijadoras de nitrógeno sobre el desarrollo de las plantas de plátano (*Musa* spp.)

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos se reportaron en el artículo: Lucía Martínez, Jesús Caballero-Mellado, José Orozco & Esperanza Martínez-Romero. (2003). **Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa spp.*)**. Plant and Soil, 00:1-13 (aceptado), el cual se presenta a continuación.

Además se presentan los siguientes resultados adicionales:

\*\* Colonización y efecto de los inóculos sobre el desarrollo de las plantas

\*\* Artículo de revisión. **Dicotomía bacteriana: simbiote o patógeno. Ejemplos en *Klebsiella*, en rhizobia ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y *Brucella-Ochrobactrum***. El cual ha sido enviado a la Revista Latinoamericana de Microbiología para su publicación.



## Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.).

Lucía Martínez<sup>1</sup>, Jesús Caballero-Mellado<sup>1</sup>, José Orozco<sup>2</sup> & Esperanza Martínez-Romero<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Ap. P. 565-A., Cuernavaca, Mor. México. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Km 35 Carretera Colima-Manzanillo, Ap. P. 88, C.P. 28100, Tecmán, Col., México. <sup>3</sup>Corresponding author\*

Received 4 July 2002. Accepted in revised form 1 April 2003

**Key words:** banana, diazotrophs, endophytes, *Klebsiella*, nitrogen fixation, *Rhizobium*

### Abstract

Nitrogen-fixing bacteria were isolated from surface sterilized banana (*Musa* spp.) plants and constituted a minor proportion of banana endophytic bacteria. Some isolates were characterized by alloenzyme profiles, biochemical tests, 16S rRNA and *rpoB* partial gene sequences, plasmid profiles and plant colonization. A large group of enterobacterial isolates that could not be clearly affiliated, most of them ascribed to group I (with characteristics of *Enterobacter cloacae*) were the diazotrophs most frequently found in banana. Different *Klebsiella* spp. and *Rhizobium* spp. were identified as well. *Klebsiella* spp. were isolated from inside the roots and stems of plants grown in the two geographical regions sampled and from tissue culture-derived plantlets. *Rhizobium* spp. isolates were obtained only from Colima where bananas are grown extensively. Group I isolates and *Rhizobium* spp. could be re-isolated from surface-sterilized banana derived from tissue culture at five months after inoculation and significant increases in stem and leaf fresh weight were obtained with some of the isolates.

### Introduction

The isolation and characterization of diazotrophic endophytic bacteria from surface sterilized plants is a growing field of research interest and a large phylogenetic diversity of bacteria associated with agronomically important crops such as rice, sugar cane and maize has been found. A rationale for the study of endophytic diazotrophs is to extend biological nitrogen fixation to important non-legume crops, thereby displacing the use of chemical N fertilizers. The inside of plants constitute adequate habitats for bacterial colonization and novel bacterial groups may be encountered therein. Nevertheless, although beneficial effects of associated diazotrophic bacteria on their hosts are known, only in a few cases is the growth promotion due to nitrogen fixation (James, 2000). Plant growth may be stimulated by bacterially-produced phytohormones (Okon and Labandera-González, 1994; Tien et al., 1979; Yanni et al., 2001), vitamin-related products (Phillips et al., 1999) or by pathogen suppression activ-

ities (Bashan and de bashan, 2002; Haque and Ghaffar, 1993).

A current problem in the analysis of the effects of the inoculated endophytes on plants is the growth promotion mediated by the resident bacteria that masks the effects of the applied inocula. To eliminate endophytic bacteria, plants derived from tissue culture with or without antibiotic treatments, are sometimes used (Holland and Polacco, 1994; Leifert et al., 1991).

Bananas are propagated vegetatively and tissue culture is a common source of plants for agricultural fields in many places (Robles-González and Orozco-Romero, 1996). Agricultural practices in commercial crops of banana include chemical nitrogen fertilization to increase yield using over 200 kg N ha<sup>-1</sup> in many countries including Brazil (Weber et al., 1999). Banana is the most widely consumed fruit in the world and in some countries it is the main source of nutrients. Commercial bananas have a narrow genetic diversity (Powledge, 1996). When this work started there was no information on banana associated nitrogen-fixing bacteria, since then some banana bacterial diazotrophs

\* FAX No: 777-317-5581. E-mail: emartine@cifn.unam.mx

have been reported. By morphological and physiological characterization, bacteria similar to *Herbaspirillum* were identified from non-sterilized banana tissues that were different from species of *Herbaspirillum* isolated from gramineous plants; other banana diazotrophs not corresponding to *Herbaspirillum* were also encountered but their taxonomic affiliation was not defined (Weber et al., 2001). Species specific oligonucleotides directed to 16S rRNA genes were used by the same authors to identify diazotrophs from water-washed banana tissue samples as *Azospirillum brasilense* and as *Herbaspirillum*-like bacteria (Weber et al., 1999). Subsequently they reported the patterns and sequences of 16S rRNA genes that allowed the identification of banana isolates as *Herbaspirillum*, *Burkholderia* and *Ochrobactrum*-related bacteria (Cruz et al., 2001). Micropropagated banana plants grew faster upon inoculation of *Herbaspirillum*-like and *Burkholderia cepacia* related bacteria (Weber et al., 2000).

The aim of this work was to isolate and characterize putative endophytic nitrogen-fixing bacteria from surface sterilized banana plants grown in fields in Mexico, and resident endophytes in small plants derived from tissue culture.

## Materials and methods

### Plant surface sterilization

Bacteria were isolated from fields of two regions separated by 800 km: Colima (104°W, 19°N) is home to many important banana plantations while Morelos (99°W, 18.5°N) has small traditional farms where bananas are grown only sporadically. The amount of fertilizer normally used in Colima is 200 kg N ha<sup>-1</sup>, 75 kg P ha<sup>-1</sup> and 150 kg K ha<sup>-1</sup>. No fertilizer is used in Morelos. Different banana genotypes such as Enano Gigante (*Musa* spp. Sub-Group *cvendish* AAA), hybrid cultivars FHIA 01, FHIA 21(AAAB), and Dominico (Sub-Group plantain AAB) were sampled. Enano Gigante is the banana commercial variety most extensively grown. Plant roots, stems or leaves were thoroughly washed with water, rinsed briefly with 96% ethanol and washed again with sterilized distilled water. Tissue culture samples were submerged in 2.4% sodium hypochlorite for 2 min and field borne samples for 10 min. Surface sterilization tests were performed by placing the samples on plates with the different media described below.

### Bacteria isolation, bacterial reference strains and transposon tagging

Plant samples were macerated in a mortar in sterile water in a 1:10 (weight/volume) ratio.

The solid and semisolid media used were acetic LGI (Cavalcante and Döbereiner, 1988), acetic LGI modified with lower sugar (10 g L<sup>-1</sup> sucrose), LGI (10 g sucrose L<sup>-1</sup>) with plant banana extract (2 g of macerated shoots in 10 mL water centrifuged and filter sterilized, referred here as plant extract medium), NFB (Döbereiner et al., 1976) and the medium used for *Azotobacter* and *Azomonas* strains in Reinhold-Hurek et al. (1993) designated here as Azo medium. Other solid media used for isolation and purification were SSM medium (Reinhold et al., 1986), Luria broth (LB), PY (3 g yeast extract, 5 g peptone and 0.7 g calcium chloride L<sup>-1</sup>), MacConkey, Congo Red (Rodríguez Cáceres, 1982). Solid media used for plant isolation with agar (14 g L<sup>-1</sup>) in plates were supplemented with yeast extract 0.05 g L<sup>-1</sup> (except Azo) and cycloheximide (100 mg L<sup>-1</sup>) Extensive colony purification was performed to achieve single strain cultures.

The following additional *Klebsiella* isolates from different hosts were used in comparison to banana *Klebsiella* isolates: from sugar cane T29A, T3A, T40B, T42A, T44C; from maize 3 (Caballero-Mellado et al., unpublished). The reference strains used were *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5<sup>T</sup>, *Rhizobium etli* CFN42, *Rhizobium undicola* LMG11875, *Sinorhizobium* sp. CFNEA156, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883<sup>T</sup>, *Klebsiella planticola* ATCC 33531<sup>T</sup>, *Klebsiella oxytoca* ATCC 13182<sup>T</sup> and *Klebsiella terrigena* ATCC 33257<sup>T</sup>.

A culture of the *Rhizobium* banana isolate F5R19 was crossed mated with *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir carrying pFAJ1819 (Xi et al., 2001) that contains a Tn5-gusA transposon that confers resistance to kanamycin. Transposon-tagged colonies of F5R19 were selected in kanamycin (Km, 60 mg L<sup>-1</sup>) and tested for growth in minimal medium (González-Pasayo and Martínez-Romero, 2000) to discard auxotrophs. Five independent colonies were chosen to be used in banana plant colonization assays.

### API 20E galleries

Two colonies of enterobacteria isolates and type strains were resuspended in 5 mL of sterilized distilled water and used to inoculate test plates from API 20E identification system (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile,

France). Plates were incubated at 37°C for 24 or 48 h and activities were revealed according to manufacturers instructions and recorded using APILAB plus automated interpretation.

#### *Acetylene reduction activity (ARA assays)*

Bacteria were grown for 3 days in different semisolid medium (Table 1) without nitrogen containing 2.3 g of agar L<sup>-1</sup> in 10 mL vials filled with 5 mL of media. Acetylene was added to attain a concentration of 12% (v/v) and ethylene production was determined after 12 h in a Varian 3300 gas chromatograph as described (Rogel et al., 2001).

#### *Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)*

The procedures described by Selander et al. (1986) were used with bacterial extracts derived from liquid cultures in different liquid media. The following metabolic enzymes were assayed: alcohol, glucose-6-phosphate, glutamate, isocitrate, leucine, lysine, malate and xanthine dehydrogenases, phosphoglucose isomerase and phosphoglucomutase.

#### *Primers for PCR reaction and sequence analysis*

Primers rD1 and fD1 (Weisburg et al., 1991) were used to amplify almost complete copies of 16S rRNA genes, also used were 16S rRNA gene internal primers for enterobacteria. KC856R (GCTCCGGAAGC-CACGCCTCAA) and 533F (Dojka et al., 1998). Primers CM7 (AACCAGTTCGCGTTGGCCTGG) and CM31b (CCTGAACAACACGCTCGGA) (Mollet et al., 1997) were for the amplification of *rpoB* genes. PCR products were sequenced as described (Rogel et al., 2001). Neighbor-joining was used to construct the dendrograms using Jukes-Cantor distances. *nifH* genes were amplified with polF and polR primers (Poly et al., 2001).

#### *Plasmid profiles*

Modified Eckhardt gels of SDS-agarose (Hynes and McGregor, 1990) were used to visualize plasmids from banana isolates and reference strains. The *Klebsiella* plasmid patterns were blotted and hybridized to the *nifH* gene of *Rhizobium etli* CFN42 (Wang et al., 1999) as described (Martínez-Romero et al., 1991).

#### *DNA hybridization*

Total DNA was extracted with the Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation kit (Amersham, Piscataway, NJ, USA) or with the Quantum Prep, Aqua Pure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Nylon filters used had blotted restricted DNA from a diversity of strains in respective lanes and were hybridized to total DNA labelled with <sup>32</sup>P using Rediprime (Amersham). Probes for hybridization were DNAs of *K. pneumoniae* ATCC13883 or 6A2 in the enterobacteria hybridization assays and DNA of F5R19 in the *Rhizobium* assays. Total hybridization was calculated and the percent of the hybridization of the homologous strain.

#### *Banana colonization assays*

One month old plantlets derived from tissue cultures of Enano Gigante that were maintained in closed glass flasks at 28°C in a growth chamber were inoculated with 10<sup>6</sup> bacteria and transferred to pots with vermiculite and Fahraeus N-free medium (Fahraeus, 1957). Plants were watered with Fahraeus N-free medium every month and a half. After one or 5 months plantlets were surface sterilized as described before and macerated. Macerates were diluted and plated on the media described. Three plants per strain were analyzed for the presence of endophytic bacteria at each sampling time. km<sup>f</sup> colonies were counted to quantify F5R19 banana colonizing bacteria. Leaf and root fresh biomass were determined at 5 months after inoculation.

#### *Plant nodulation assays*

*Acacia farnesiana* seeds were treated with concentrated sulfuric acid for 20 min and then washed extensively with sterile water, seeds were germinated in agar-H<sub>2</sub>O plates for 3–5 days, transferred to sterile vermiculite with Fahraeus N-free medium (Fahraeus, 1957) and inoculated with 100 µL of bacterial suspensions of *R. etli* strain CFN42, *Rhizobium* sp. CFNE1156 or isolated banana endophytes E2C4, E2C6, A3R3, ESR13a, FSH16b, F5R19. Nodule occupancy was verified by the isolation of bacteria following described procedures (Martínez-Romero and Rosenbluth, 1990).

Table 1. Nitrogen fixing banana isolates

Strain	Geographic origin	Plant organ	Medium of isolation	ARA <sup>a</sup> nmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/vial	ARA Semisolid Medium tested
<b>Group I <i>Enterobacter</i> sp.</b>					
A4T2	Colima	Stem	Congo red	9.86	NFb
B5R5	Colima	Root	Plant extract	27.36	Plant extract
C1T5	Colima	Stem	Acetic LGI	121.87	Acetic LGI
A1T1	Colima	Stem	Acetic LGI	33.29	Acetic LGI
C1C2	Colima	Root	Acetic LGI	109.56	Acetic LGI
C1C3	Colima	Root	Acetic LGI	77.01	Acetic LGI
C1T4	Colima	Stem	Acetic LGI	47.40	Acetic LGI
C2R2	Colima	Root	LGI (10 g sucrose)	31.43	LGI(10 g sucrose)
C2R3	Colima	Root	LGI (10 g sucrose)	40.26	LGI(10 g sucrose)
E2C7	Colima	Root	LGI (10 g sucrose)	35.31	LGI(10 g sucrose)
A3C1	Colima	Root	Azo	56.43	Azo
A3C2	Colima	Root	Azo	87.61	Azo
A3R3	Colima	Root	Azo	64.11	Azo
B3C4	Colima	Root	Azo	120.53	Azo
B3T5	Colima	Stem	Azo	81.77	Azo
B3T6	Colima	Stem	Azo	83.64	Azo
C3C7	Colima	Root	Azo	132.31	Azo
C3C8	Colima	Root	Azo	168.64	Azo
C3C9	Colima	Root	Azo	268.01	Azo
C3T11	Colima	Stem	Azo	125.48	Azo
D3R12	Colima	Root	Azo	117.74	Azo
E3C13	Colima	Root	Azo	94.10	Azo
E3H14	Colima	Leaves	Azo	63.34	Azo
E3R15	Colima	Root	Azo	117.68	Azo
E3T17	Colima	Stem	Azo	44.14	Azo
F3R22	Colima	Root	Azo	81.34	Azo
F3R23	Colima	Root	Azo	78.16	Azo
C4T4	Colima	Stem	Congo red	61.76	NFb
E4H6	Colima	Leaves	Congo red	76.41	NFb
E4H7	Colima	Leaves	Congo red	49.78	NFb
A5T1	Colima	Stem	Plant extract	66.80	Plant extract
C5C8	Colima	Root	Plant extract	48.04	Plant extract
C5T9	Colima	Stem	Plant extract	31.66	Plant extract
E5T14	Colima	Stem	Plant extract	37.22	Plant extract
A3C1a	Colima	Root	Azo	125.67	Azo
<b>Group II <i>Citrobacter</i> sp.</b>					
III	Morelos	Leaves	Plant extract	67.00	Plant extract
IIIA	Morelos	Leaves	Plant extract	59.31	Plant extract
<b>Group III <i>Klebsiella</i> sp.</b>					
6A2	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	Acetic LGI	95.04	Acetic LGI
VI	Morelos	Stem	LGI (10 g sucrose)	147.31	LGI(10 g sucrose)
2S9	Colima TC <sup>b</sup>	Root	Acetic LGI	75.57	Acetic LGI
2S12	Colima TC <sup>b</sup>	Root	Acetic LGI	63.92	Acetic LGI
4A3	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	Acetic LGI	59.42	Acetic LGI
6A1	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	Acetic LGI	83.21	Acetic LGI
6A6	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	Acetic LGI	34.11	Acetic LGI
3S6	Colima TC <sup>b</sup>	Root	LGI (10 g sucrose)	66.29	LGI(10 g sucrose)
4A5	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	LGI (10 g sucrose)	35.06	LGI(10 g sucrose)
5S1a	Colima TC <sup>b</sup>	Root	LGI (10 g sucrose)	67.21	LGI(10 g sucrose)

Table 1. Continued

Strain	Geographic origin	Plant organ	Medium of isolation	ARA <sup>a</sup> nmolC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h/vial	ARA Semisolid Medium tested
5A1	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	LGI (10 g sucrose)	34.10	LGI(10 g sucrose)
3S3	Colima TC <sup>b</sup>	Root	Azo	42.00	Azo
3S4	Colima TC <sup>b</sup>	Root	Azo	67.31	Azo
3S5	Colima TC <sup>b</sup>	Root	Azo	66.29	Azo
5A1a	Colima TC <sup>b</sup>	Leaves	Azo	33.24	Azo
<b>Group IV <i>Klebsiella</i> sp.</b>					
F2R9	Colima	Root	LGI (10 G sucrose)	12.00	LGI(10 g sucrose)
C1Tb	Colima	Stem	Acetic LGI	43.07	Acetic LGI
D1T8	Colima	Stem	Acetic LGI	110.97	Acetic LGI
V1A	Morelos	Stem	LGI (10 g sucrose)	120.05	LGI (10 g sucrose)
V1B	Morelos	Stem	LGI (10 g sucrose)	131.10	LGI(10 g sucrose)
<b>Group V <i>Rhizobium</i> sp.</b>					
F5R19	Colima	Root	Plant extract	–	Plant extract
F5H16b	Colima	Leaves	Plant extract	–	Plant extract
A3R3	Colima	Root	Azo	–	Azo

<sup>a</sup>ARA: Acetylene reduction assay, measured for bacterial cultures grown in the indicated media.

<sup>b</sup>TC: Plantlets derived from tissue culture.

### Phenotypic analysis

Resistance to antibiotics, different substrate utilization and enzymatic reactions were performed using the MICRONAUT-E system (Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Germany).

## Results

### Isolation and identification of bacteria

The isolation of bacteria from surface sterilized stem, leaves, and roots normally allows the recovery of putative endophytic bacteria. Growth in semisolid nitrogen free medium has been a useful strategy to select for nitrogen fixing bacteria that are subsequently tested for acetylene reduction activity. All isolates, obtained from banana, selected by these combined criteria were grouped by morphological similarities and phenotypic characteristics. Alloenzyme patterns, PCR-RFLP and sequence of 16S rRNA genes, plasmids profiles and *rpoB* gene sequences were determined for some representatives of each group. *rpoB* gene sequences have been useful in enterobacteria systematics (Mollet et al., 1997). *rpoB* codes for the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase. DNA-DNA hybridization was performed to further define the re-

lationships of the type strains of the groups that were found to be closely related to the banana isolates.

Out of 1453 isolates from surface sterilized banana tissues, only 57 isolates reduced acetylene and were retained (Table 1). Despite some isolates only producing low levels of ethylene (e.g. B5R5, A4T2 and F2R9), these isolates were considered nitrogen-fixing bacteria because they also have *nifH* genes detectable by PCR using primers *polF* and *polR* and the ARA detected was reproducible. Negative controls and all of the non-nitrogen-fixing isolates gave undetectable ethylene in the 12 h assays used. With isolates obtained from some of the media as SSM or LB we did not detect acetylene reduction activity. Nitrogen-fixing isolates were divided into five morphological groups (Table 1). Four of these groups encompassed bacteria with colonies appearing after one day of incubation on plates with different media and having duplication times of about 35 minutes in liquid LB medium, a rich medium that allows fast generation times with Enterobacteria. Some of these bacteria were further analyzed and found to correspond to Enterobacteria from the analysis of 16S gene sequences and from the results of API 20E galleries. Their diversity and groupings were established from their metabolic enzyme patterns using 10 enzymatic activities (Figure 1).

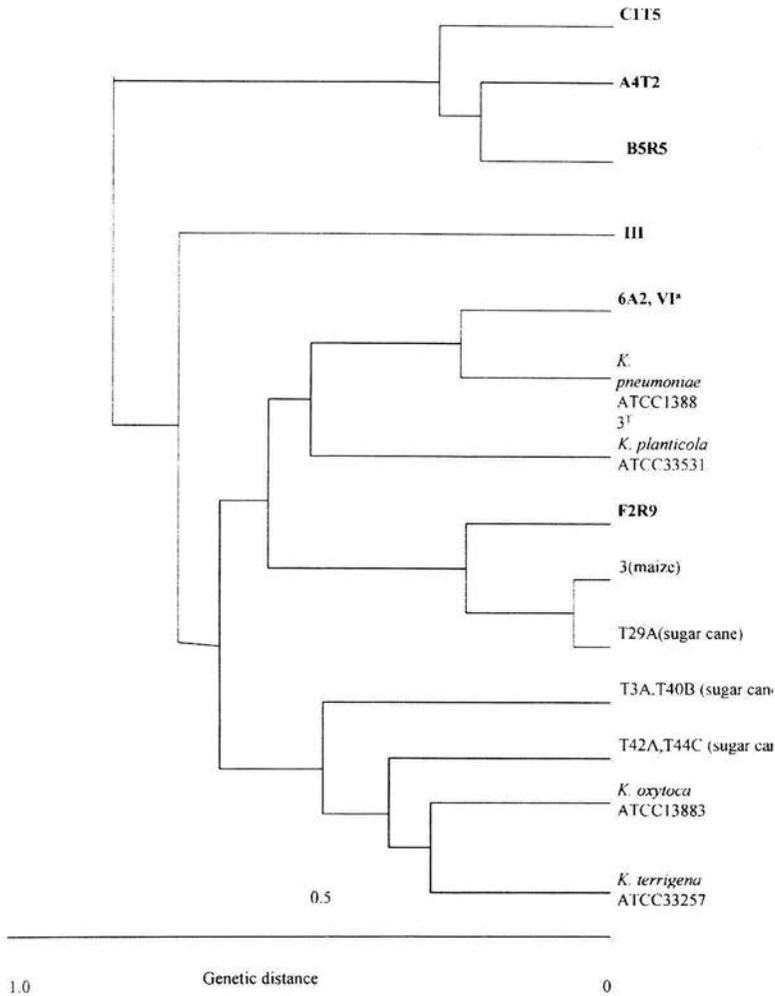


Figure 1. Genetic relatedness of *Klebsiella* isolates from banana, sugar cane and maize plants and group I isolates defined by MLEE analyses. The dendrogram was constructed from data for 10 metabolic enzymes. Banana isolates are bold. <sup>†</sup> 18 more *Klebsiella* isolates correspond to the same ET.

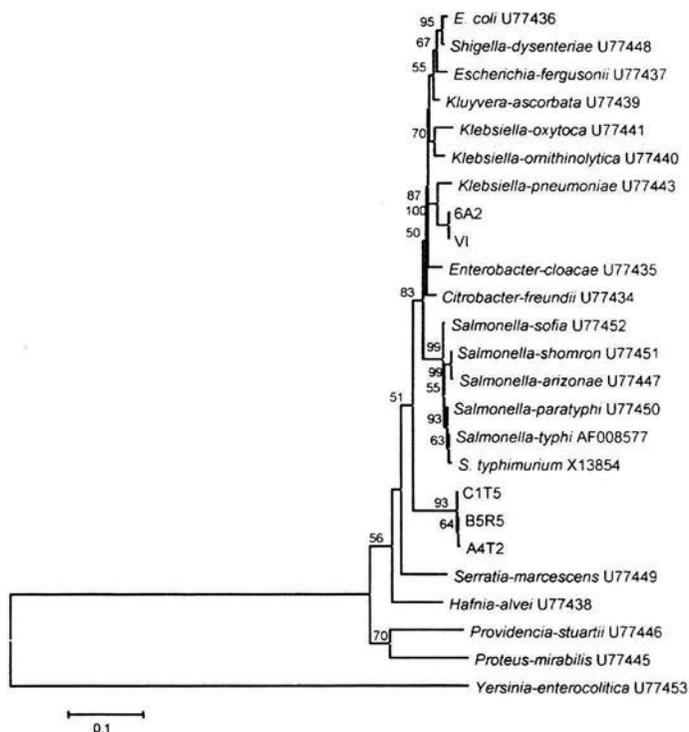


Figure 2. Relatedness among enterobacteria banana isolates and reference strains based on *rpoB* gene sequences.

### Group I

The most frequent nitrogen-fixing bacteria with 35 isolates, representing almost 60% of the total nitrogen fixing isolates, were obtained from surface sterilized banana stems, leaves and roots from Colima (Table 1). They formed a group of related bacteria placed at a genetic distance of 0.85 from other clusters of enterobacteria banana isolates based on alloenzyme analysis (Figure 1). Strains C1T5, B5R5 and A4T2 were found to be similar to *Enterobacter cloacae* (accession number AF047175) with 99% identity in the sequence of 16S rRNA genes analyzed but from the sequence of *rpoB* genes group I isolates (C1T5, B5R5 and A4T2) constituted an independent cluster (Figure 2).

API 20E galleries analysis placed isolate A4T2 in *Enterobacter cloacae* with a probability of 96.1% while isolates B5R5 and C1T5 had lower probability values (75.8%). A4T2, B5R5 and C1T5 produced acid in medium with glucose and were motile (like *E. cloacae* rice isolates, Ladha et al., 1983). Isolates B5R5 and C1T5 were identified as *E. cloacae* by the MICRONAUT E-system.

### Group II

A minority group of isolates constituting 2% of the nitrogen-fixing endophytes were obtained from leaves of Morelos plants. From the 16S rRNA gene sequence similarity, strain III was only related to *Citrobacter* (accession number AF0253669) albeit not closely

(96%). Isolates belonging to this group formed pink colonies in Acidic Koser Citrate medium. They were non motile and grew at 37 °C and they were assigned to *Pantoea agglomerans* by the MICRONAUT-E system.

#### Groups III and IV: *Klebsiella* spp.

*Klebsiella* isolates were obtained from inside stems and leaves from the field samples from both geographical regions sampled and also from inside roots from tissue culture (Table 1). Two groups (groups III and IV) were distinguished among *Klebsiella* banana isolates by morphology but also by MLEE. *Klebsiella* spp. isolates obtained previously in Mexico from sugar cane (T29A, T3A, T40B, T42A and T44C) or maize (strain 3) were included for comparison. All *Klebsiella* isolates from banana, sugar cane or maize and the reference strains grew at 37 °C on MacConkey solid media.

Using API 20E galleries the isolate 6A2 was identified as *K. pneumonia* at 90.4% identity and *Klebsiella* isolates 6A2 and VI were found to correspond with very good agreement to *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* using the MICRONAUT-E system, but they differed by their inability to use rhamnose and adonitol. In multilocus enzyme electrophoresis assays banana isolates 6A2, VI and 13 others were closely related to *K. pneumoniae* at a genetic distance of 0.3 using 10 metabolic enzymes while other *Klebsiella* isolates from banana (such as F2R9), maize, and sugarcane were at a genetic distance of 0.63 from *K. pneumoniae*. Some sugar cane isolates were found to be related to type strains of *K. oxytoca* and *K. terrigena* (Figure 1).

Banana *Klebsiella* isolates 6A2, VI, F2R9 as well as type strains from *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena* and *K. planticola* grew in Acidic Koser Citrate Medium (Bruce et al., 1981), which is used to identify *Klebsiella* (Grimont et al., 1992), forming yellow mucoid colonies while group I isolates CIT5, A4T2 and B5R5 formed pink colonies. Banana *Klebsiella* isolates were non motile like *K. pneumoniae* and *Klebsiella* rice isolates (Ladha et al., 1983).

16S rRNA gene sequences were obtained from *Klebsiella* spp. 6A2 (from tissue culture), VI from Morelos and F2R9 from Colima. Sequence identities of 97, 97 and 96% were found when 6A2, F2R9 and VI, respectively, were compared to *K. pneumoniae* accession numbers AB074192, AF009170, AF228920. The analysis of the *rpoB* gene sequence from 6A2 and

VI showed that they were clearly related to *Klebsiella* (Fig. 2). The results of total DNA hybridization showed that *Klebsiella* sp. 6A2 was related to two *Klebsiella* isolates, one from maize (strain 3) and one from sugar cane (T29A) with hybridization values of 40 and 39%, respectively, and then to *K. pneumoniae* ATCC13883<sup>7</sup> with hybridization of 30%. DNA hybridization of 6A2 to the total DNAs of *K. oxytoca*, *K. planticola* and *K. terrigena* was 7–10%, and to strain III from group II was 5%. Using *K. pneumoniae* ATCC 13883 as a probe, hybridization values of 20–23% were obtained with banana *Klebsiella* isolates 6A2, VI, F2R9 and 16% with *K. planticola*.

#### Group V: *Rhizobium* spp.

The fifth morphological group of nitrogen fixing banana bacteria was isolated from inside leaves and roots of Dominico and FHIA21 plants from Colima. These isolates formed colonies at 3 days. One of them, F5R19, resembled *Rhizobium undicola* (accession number AUY17047) on the basis of the 16S rRNA gene sequence (with 98% identity). Based on this result we determined alloenzyme patterns of some of these isolates compared with *Rhizobium undicola* type strain LMG11875 and found that isolates F5R19, F5H16b and A3R3 were related by their metabolic enzyme patterns but also by PCR-RFLP patterns of 16S rRNA genes to the *Rhizobium undicola* strain tested (Figure 3). In total DNA–DNA hybridization assays, when DNA of F5R19 was used as a probe, hybridization was 20% with DNA of *R. undicola* LMG11875, 60% with A3R3 and 100% with F5H16b. All *Rhizobium* strains tested (*R. etli* CFN42, *R. undicola* LMG11875) and rhizobia banana isolates F5R19 and F5H16 did not grow in Acidic Koser Citrate medium. Banana isolates F5R19, F5H16b and A3C1a did not nodulate bean (*Phaseolus vulgaris*) but formed small, ineffective nodules on *Acacia farnesiana*. Average nodule number per *A. farnesiana* plants was 7 and all six plants tested were nodulated with F5R19. To confirm that the bacteria recovered from the *Acacia* nodules corresponded to the inoculated strain, plasmid patterns were compared, the bacteria re-isolated from different nodules of F5R19 in *Acacia* had plasmid profiles (plasmids of around 100, 500 and >1000 kb) identical to the original strain used as inocula (Figure 4). This plasmid profile is different from that observed with type strain *R. undicola* LMG11875 (de Lajudie et al., 1998) and from A3R3, which carries plasmids of around 100, 400 and 1000 kb.

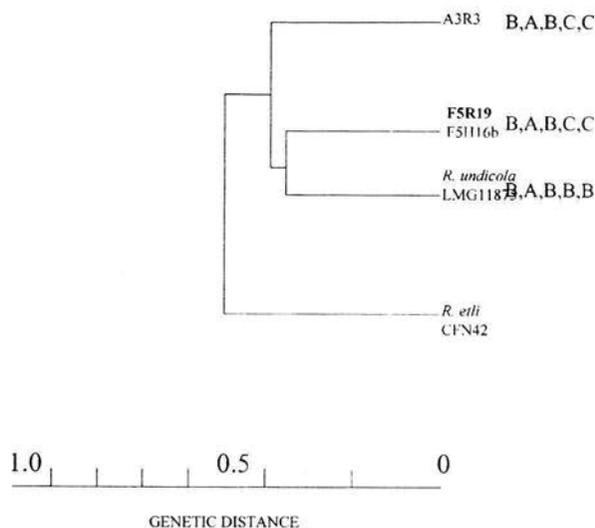


Figure 3. (A) Genetic relatedness of *Rhizobium* isolates from banana plants defined by MLEE analysis. The dendrogram was constructed from data for 10 metabolic enzymes. (B) 16S rRNA digestion patterns of PCR products of almost full-length genes. Each letter designates the digestion pattern obtained with the following restriction enzymes: *Dde*I, *Hinf*I, *Msp*I, *Sau*3A1, *Rsa*I.

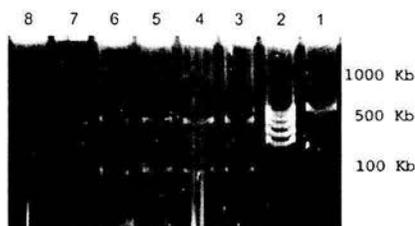


Figure 4. Plasmids visualized by a modified Eckhardt procedure. Lanes (1) *R. undicola* LMG11875<sup>T</sup>; (2) *R. etli* CFN42; (3) banana *Rhizobium* isolate F5R19; (4–8) bacteria isolated from *Acacia* nodules of plants inoculated with F5R19.

#### Re-isolation assays

Plantlets derived from tissue culture were inoculated with *Klebsiella* isolates 6A2 and VI, isolate III (from group II), group I isolates A4T2, C1T5, B5R5, and A3C1a and *Rhizobium* isolates F5R19, F5H16b, and A3R3. Reisolated bacteria were identified by their morphology on plates of PY and MacConkey media and by their resistance to kanamycin in the case of

Table 2. Population of endophytic bacteria reisolated from surface sterilized banana plants previously inoculated with the indicated strain

Strain	(Cfu g [fresh wt] <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	
	Shoot	Root
<i>Enterobacter</i> -like (group I)		
A4T2	1.00 × 10 <sup>4</sup>	1.24 × 10 <sup>5</sup>
C1T5	1.06 × 10 <sup>5</sup>	2.38 × 10 <sup>5</sup>
B5R5	0.00	7.80 × 10 <sup>4</sup>
A3C1a	5.60 × 10 <sup>5</sup>	2.24 × 10 <sup>5</sup>
<i>Rhizobium</i> spp. (group V)		
A3R3	7.15 × 10 <sup>4</sup>	3.18 × 10 <sup>5</sup>
F5H16b	5.00 × 10 <sup>4</sup>	5.00 × 10 <sup>5</sup>
F5R19	2.00 × 10 <sup>5</sup>	4.70 × 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Results are means of three plants, the analysis was made 5 months after inoculation.

the *Rhizobium* isolate F5R19. No kanamycin resistant colonies were obtained from non-inoculated plant extracts. In all cases the inoculated endophyte was recovered from the inoculated plants. CFU recovered

from surface sterilized bananas ranged from  $10^4$ – $10^5$  bacteria per g of fresh tissue for group I bacteria and  $10^3$ – $10^5$  bacteria per g of fresh tissue for *Rhizobium* inoculated plants (Table 2). Non-inoculated plants did not have any *Rhizobium* strains nor strains morphologically similar to group I or group II but had inside stems and roots other putative endophytic bacteria that were not analyzed (at around  $10^3$  CFU per gram) and *Klebsiella*-like isolates similar to isolate 6A2.

Inoculation did not cause any detrimental effect on the growth of plants, on the contrary, stimulation of plant development was recorded in some cases, specially with group I bacteria and with *Rhizobium* F5R19. At 5 months after inoculation of tissue culture-derived plantlets, significant increases of plant fresh weight (stems and leaves) were obtained ( $p < 0.05$ , 't student' test) with group I isolate B5R5 and *Rhizobium* strain F5R19. Increases of over 60% were recorded in both cases.

## Discussion

In rice diazotrophs constitute a minor fraction of all associated bacteria (Barraquio et al., 1997) and the possibility of promoting nitrogen fixation in rice by increasing the proportion of diazotrophs has been suggested (Ladha and Reddy, 2000). With the experimental procedures we used, only a low proportion of diazotrophs was obtained from banana.

Based on biochemical characteristics, nitrogen-fixing bacteria associated with leaf sheaths and roots of rice were identified as *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* (Ladha et al., 1983 and references therein). *Enterobacter* strains have been isolated from stems of wild and cultivated rice (Elbeltagy et al., 2001) and from sugar cane (Mirza et al., 2001). *Pantoea* and synonymus *Enterobacter* strains have also been isolated as endophytes of cotton (Sturz et al., 1997) and alfalfa (Phillips et al., 1999). *E. cloacae* isolates when inoculated into plants promoted rice development (Fujii et al., 1987) and nitrogen fixation in rice (Elbeltagy et al., 2001; Mirza et al., 2001) and in sugar cane. Our preliminary results showed that different group I strains enhanced shoot growth in comparison to non inoculated control plants. Group I isolates were first considered to belong to *Enterobacter* genus but the distinctive grouping by *rpoB* gene sequences led us to leave their affiliation open. The dendrogram obtained from *rpoB* gene sequences is in

good agreement to the published results (Mollet et al., 1997).

Historically, the first *Klebsiella* isolates were from clinical samples but they have also been frequently encountered in plants, water and soils (Grimont et al., 1992). *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, and *K. planticola* are all capable of fixing nitrogen. Recently a modification in the taxonomy of *Klebsiella* has been proposed and *K. planticola* and *K. terrigena* have been transferred to the genus *Raoultella* (Drancourt et al., 2001). The isolation of nitrogen-fixing *Klebsiella* from rice leaves (Ladha et al., 1983) and *K. pneumoniae* from maize (Palus et al., 1996) has been reported. The genomic differences among *Klebsiella pneumoniae* clinical and maize isolates were analyzed using microarrays (Dong et al., 2001). In maize, *Klebsiella pneumoniae* was located in the intracellular space of the stem cortex, and in the root epidermis near the cortex (Chelius and Triplett, 2000). The nitrogenase reductase of *K. pneumoniae* was detected with antibodies in maize plants amended with a carbon source (Chelius and Triplett, 2000) and these bacteria have been tested as maize inoculants in the US. (Triplett, pers. comm.).

Rhizobia have been safely used as plant inoculants in agriculture for more than a hundred years. *Rhizobium* spp. and *Azorhizobium caulinodans* have been found to colonize endophytically both legumes (O'Callaghan et al., 1999) and non-legumes (Engelhardt et al., 2000; Gough et al., 1997; Gutiérrez-Zamora and Martínez-Romero, 2001; O'Callaghan et al., 2000; Yanni et al., 1997) promoting plant growth in some cases. *Rhizobium undicola* was isolated from *Neptunia natans* in Senegal and described as a novel genus *Allorhizobium*, closely related to *Agrobacterium* and capable of effectively nodulating *Acacia* spp and *Faidherbia albida* (de Lajudie et al., 1998). Recently *Allorhizobium* has been emended to become *Rhizobium* (Young et al., 2001). The differences among F5R19 and *Rhizobium undicola* suggest that they may belong to different but related species. The isolation method that we used was not designed to select for *Rhizobium* and that may explain why we obtained very few *Rhizobium* isolates since *Rhizobium* strains do not normally fix nitrogen in free-living conditions not even in semigelified medium used for other diazotrophs. The fact that they were able to colonize banana tissues in good numbers and had plant growth promotion effects indicates that they are adapted to these conditions. These isolates originally detected in semisolid medium for their capacity to reduce acet-

ylene were subsequently found not to fix nitrogen in the same medium as expected for all rhizobia. In spite of the fact that *Rhizobium* spp. do not fix nitrogen in these conditions, our interpretation is that FSR, A3R3 and FSH16b have not lost the capacity to fix nitrogen; furthermore, a plasmid with *nifH* genes was found to be stably maintained (not shown). In contrast, in subsequent subcultures, group I and II isolates and *Klebsiella* isolates were found to reproducibly fix nitrogen in free living cultures even those giving ethylene production less than 50 nmol/hr/culture.

Rhizobia colonization to non-legumes seems to be promoted by a close physical association of legumes and non-legumes in some agricultural fields (Yanni et al., 1997). In this regard, native *Acacia* spp. trees are abundant in the banana crop area in Colima where banana endophytic rhizobia were encountered.

The endophytic populations that we isolated, namely  $\gamma$ -Proteobacteria and *Rhizobium*, are certainly different from the  $\beta$ -Proteobacteria (*Burkholderia* and *Herbaspirillum*) and *Ochrobactrum*-related bacteria obtained in Brazil as banana associated bacteria (Cruz et al., 2001; Weber et al., 1999). This may be in relation to the differences in media used and the bacterial isolation procedure but the effects of the different plant genotypes, the regional endophytic populations and the environmental conditions can not be discarded to account for the different results obtained.

#### Acknowledgements

To CONACyT grant 25075-B for financial support, to Michael Molitor from Merlin-Diagnostika, Germany for performing MICRONAUT-E analysis, to J. Martínez Romero, M. A. Rogel, I. Toledo and L. Lloret for technical help.

#### References

- Barraquio W L, Revilla L and Ladha J K 1997 Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194, 15–24.
- Bashan Y and de-Bashan L E 2002 Protection of tomato seedlings against infection by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by using the plant growth-promoting bacterium *Acetivirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2637–2643.
- Bruce S K, Schick D G, Tanaka L, Jiménez E M and Montgomerie J Z 1981 Selective medium for isolation of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clinical Microbiol.* 13, 1114–1116.
- Cavalcante V and Döbereiner J 1988 A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108, 23–31.
- Chelius M K and Triplett E W 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 783–787.
- Cruz L M, Maltempi de Souza E, Weber O B, Baldani J I, Döbereiner J and Oliveira Pedrosa F 2001 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2375–2379.
- Döbereiner J, Marriel I E and Nery M 1976 Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22, 1464–1473.
- de Lajudie P, Laurent-Fulele E, Willems A, Torck U, Coopman R, Collins M D, Kersters K, Dreyfus B and Gillis M 1998 *Azorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia nutans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 4, 1277–1290.
- Dojka M A, Hugenholz P, Haack S K and Pace N R 1998 Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3869–3877.
- Dong Y, Glasner J D, Blattner F R and Triplett E W 2001 Genomic interspecies microarray hybridization: rapid discovery of three thousand genes in the maize endophyte, *Klebsiella pneumoniae* 342, by microarray hybridization with *Escherichia coli* K-12 Open Reading Frames. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1911–1921.
- Drancourt M, Bollet C, Carta A and Rousselier P 2001 Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 925–932.
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H and Minamisawa K 2001 Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5285–5293.
- Engelhard M, Hurek T and Reinhold-Hurek B 2000 Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azorectus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ. Microbiol.* 2, 131–141.
- Fahraeus G 1957 The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a single glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* 16, 374–381.
- Fujii T, Huang Y -D, Higashitani A, Nishimura Y, Iyama S, Hirota Y, Yoneyama T and Dixon R A 1987 Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. *Plant Soil* 103, 221–226.
- González-Pasayo R and Martínez-Romero E 2000 Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 572–577.
- Gough C, Vasse J, Galera C, Webster G, Cocking E and Dénarié J 1997 Interactions between bacterial diazotrophs and non-legume dicots: *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Plant Soil* 194, 123–130.
- Grimont F, Grimont P A D and Richard C 1992 The genus *Klebsiella*. In *The Prokaryotes* Second Edition, A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Eds. A Balows, H G Trüper, M Dworkin, W Harder and K -H Schleifer. pp 2775–2796. Springer-Verlag, New York.
- Gutiérrez-Zamora M L and Martínez-Romero E 2001 Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnol.* 91, 117–126.

- Haque S E and Ghaffar A 1993 Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *J. Phytopathol.* 138, 157-193.
- Holland M A and Polacco J C 1994 PPFMs and other covert contaminants: is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 197-209.
- Hynes M F and McGregor N F 1990 Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4, 567-574.
- James E K 2000 Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res.* 65, 197-209.
- Ladha J K, Barraquio W L and Watanabe I 1983 Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. *Can. J. Microbiol.* 29, 1301-1308.
- Ladha J K and Reddy P M Eds 2000 The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for Nitrogen Fixation in Rice, 9-12 Aug. 1999. Makati City (Philippines). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. 359 p.
- Leifert C, Ritchie J Y and Waite W M 1991 Contaminants of plant-tissue and cell cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7, 452-469.
- Martínez-Romero E and Rosenbluth M 1990 Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2384-2388.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante F M, Franco A A, Graham P and Pardo M A 1991 *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417-426.
- Mirza M S, Ahmad W, Latif F, Haurat J, Bally R, Normand P and Malik K A 2001 Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil* 237, 47-54.
- Mollet C, Drancourt M and Didier R 1997 *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26, 1005-1011.
- O'Callaghan K J, Davey M R and Cocking E C 1999 Xylem colonization of *Sesbania rostrata* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. In Highlights of Nitrogen Fixation Research. Eds E Martínez and G Hernández. pp 145-147. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- O'Callaghan K J, Stone P J, Hu X, Griffiths D W, Davey M R and Cocking E C 2000 Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2185-2191.
- Okon Y and Labandera-González C A 1994 Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1591-1601.
- Palus J A, Bormeman J, Ludden P W and Triplett E W 1996 A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L., and *Zea luxurians* Iltis and Doebley. *Plant Soil* 186, 135-142.
- Phillips D A, Joseph C M, Yang G P, Martínez-Romero E, Sanborn J R and Volpin H 1999 Identification of lumichrome as a *Sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12275-12280.
- Poly F, Monrozier L J and Bally R 2001 Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152, 95-103.
- Powledge F 1996 Making the Most of *Musa*. The role of the International Network for the Improvement of Banana and Plantain. In International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Eds C Picq and R Raymond. INIBAP, International Plant Genetic Resources Institute, Montpellier, France.
- Reinhold B, Hurek T, Niemann E-G and Fendrik I 1986 Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of Kallar grass. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 520-526.
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K and DeLey J 1993 *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 574-584.
- Robles-González M M and Orozco-Romero J 1996 Producción de plátano enano gigante mediante la técnica de cultivo de tejidos. Editorial Conexión Gráfica, S. A. de C. V. Guadalajara, México.
- Rodríguez Cáceres E A 1982 Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 990-991.
- Rogel M A, Hernández-Lucas I, Kuykendall L D, Balkwill D L and Martínez-Romero E 2001 Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3264-3268.
- Selander R K, Caugant D A, Ochman H, Musser J M, Gilmour M N and Whittam T S 1986 Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 873-884.
- Sturz A V, Christie B R, Matheson B G and Nowak J 1997 Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25, 13-19.
- Tien T, Gaskins M H and Hubbell D H 1979 Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016-1024.
- Wang E T, Rogel M A, García-de los Santos A, Martínez-Romero J, Cevallos M A and Martínez-Romero E 1999 *Rhizobium etli* bv. mimosae, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 1479-1491.
- Weber O B, Baldani J I and Döbereiner J 2000 Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 35, 2227-2285.
- Weber O B, Baldani V L D, Teixeira K R S, Kirchoff G, Baldani J I and Döbereiner J 1999 Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* 210, 103-113.
- Weber O B, Cruz L M, Baldani J I and Döbereiner J 2001 *Herbaspirillum*-like bacteria in banana plants. *Braz. J. Microbiol.* 32, 201-205.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A and Lane D J 1991 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
- Xi C, Dirix G, Hofkens J, De Schryver F C, Vanderleyden J and Michiels J 2001 Use of dual marker transposons to identify new symbiosis genes in *Rhizobium*. *Microbiol. Ecol.* 41, 325-332.
- Yanni Y G, Rizk R Y, Abd El-Fattah F K, Squartini A, Corich V, Giacomini A, De Bruijn F, Rademaker J, Maya-Flores J and Ostrom P 2001 The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Austr. J. Plant Physiol.* 28, 845-870.
- Yanni Y G, Rizk R Y, Corich V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, De Bruijn F, Stoltzfus J, Buckley D, Schmidt T M, Mateos P F, Ladha J K and Dazzo F B 1997 Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194, 99-114.

Young J. M., Kuykendall L. D., Martínez-Romero E., Kerr A. and Sawada H. 2001 A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn. 1942 and *Allorhizobium undicola* de

Lajudie et al. (1998) as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 89–103.

## RESULTADOS ADICIONALES

### 2.1) Colonización

Los aislados bacterianos, endófitos de plantas de plátano caracterizados como especies de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Rhizobium* (ver artículo) fueron probados para determinar su capacidad de colonizar la planta hospedera de la cual fueron aisladas. En esta prueba se utilizaron plántulas provenientes de cultivo de tejidos con el fin de utilizar plántulas libres de microorganismos y determinar la colonización y el efecto sobre el desarrollo de la planta de plátano por parte de la bacteria inoculada.

Para esto se realizó previamente una prueba, esterilizando la superficie de las plántulas de cultivo de tejidos de donde se obtuvo un extracto, el cual fue inoculado sobre placas de medio de cultivo MacConkey en donde se observó un ligero crecimiento de un tipo de colonia bacteriana la cual presentó características morfológicas diferentes a los aislados de plátano a probar, además no se observó crecimiento bacteriano en el 70% de las plántulas analizadas. Estos datos nos indicaron que este tipo de plántulas fueron las adecuadas para la prueba de colonización bacteriana.

Se inocularon los aislados endófitos de plátano en la raíz de plántulas estériles provenientes de cultivo de tejidos y éstas se establecieron para su desarrollo en macetas y matraces utilizando vermiculita como soporte, manteniéndolas en condiciones de invernadero.

Después de un mes de desarrollo de las plantas, estas se analizaron mediante la esterilización de la superficie de las mismas, macerando la parte aérea y la raíz, obteniendo el extracto respectivo. Las bacterias reaisladas fueron identificadas por su morfología sobre placas de medio de cultivo PY y MacConkey y por su resistencia a antibióticos en el caso de los aislados de *Rhizobium*. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) recuperadas del interior fue de  $10^3$  a  $10^6$  bacterias por gramo de peso fresco para el caso de las enterobacterias y de  $10^3$ - $10^7$  bacterias por gramo de peso fresco para plantas inoculadas con aislados del grupo de *Rhizobium*. Las plantas no inoculadas (controles) no presentaron aislados semejantes al grupo de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Rhizobium*, pero algunas colonias se asemejaron a aislados de *Klebsiella*, muy parecidas a la cepa 6A2, además se observó una bacteria con características diferentes a las mencionadas pero esta no fue analizada.

Los aislados inoculados se recuperaron del interior de las plantas de plátano, indicando que éstos aislados tienen la capacidad de colonizar el hospedero inicial, del cual fueron aislados.

## 2.2) Efectos de la inoculación en plantas de plátano

### 2.2.1) Condiciones de laboratorio

Además de analizar la capacidad de colonización de los aislados se determinó su efecto sobre el desarrollo de las plantas de plátano. Para esto se inocularon plántulas de plátano estériles provenientes de cultivo de tejidos a nivel de raíz.

Las plántulas utilizadas para este análisis provenían de dos condiciones, unas tratadas con gentamicina y otras no tratadas con el antibiótico. El tratamiento con gentamicina se realizó para “limpiar” a las plántulas completamente de bacterias y de esta manera observar claramente que los efectos sobre la planta se deben a las bacterias inoculadas.

Las plantas fueron mantenidas bajo condiciones de laboratorio y después de cinco meses de desarrollo se determinó el peso fresco de la parte aérea y de la raíz, observando que en general las plantas tratadas con gentamicina mostraron mayor crecimiento que las plantas derivadas de cultivo de tejidos sin adicionar el antibiótico (ver Fig. 1), posiblemente porque el antibiótico eliminó las bacterias presentes que aparentemente, en cierta medida son patógenas permitiendo que la planta desarrollara mejor con los inóculos aplicados.

De acuerdo con la Fig. 1A se observa que los aislados del grupo de *Enterobacter* (C1T5, B5R5) y los relacionados con *Rhizobium* (F5R19) promovieron el crecimiento de la parte aérea en comparación a las plantas controles no inoculadas. Con respecto a la raíz, plantas con inóculos semejantes a *Klebsiella* (F2R9) y *Rhizobium* (F5R19) presentaron mayor peso fresco con respecto a los controles no inoculados (Fig. 1B).

Con el análisis estadístico (prueba t de “student”) se observa un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del peso fresco de la parte aérea en las plantas inoculadas con los aislados semejantes a *Enterobacter* (B5R5) y *Rhizobium* (F5R19).

### 2.2.2) Condiciones de vivero

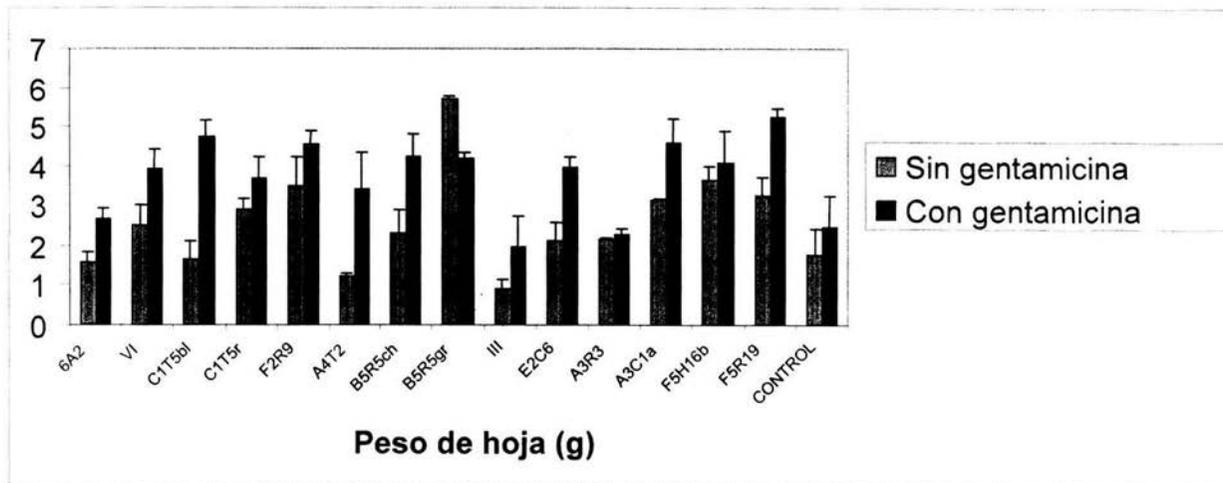
Para determinar el efecto de estos aislados endófitos sobre las plantas de plátano en las condiciones naturales de las cuales fueron aislados, se estableció un experimento de vivero en campos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Tecomán, Colima, lugar donde fueron muestreadas las plantas de plátano para el aislamiento inicial de bacterias endófitas.

En este experimento se evaluó el efecto de dos tratamientos de inoculación, por un lado se obtuvo un multi-inóculo compuesto con tres de las cepas del grupo de *Enterobacter* (A4T2, B5R5, C1T5) y un segundo tratamiento fue con el aislado semejante a *Rhizobium undicola* (F5R19), además de que se evaluaron cuatro niveles de fertilización nitrogenada, 0 %, 25%, 50% y 75% de la dosis recomendada (200 Kg N ha<sup>-1</sup>). Las plántulas utilizadas en este análisis fueron plántulas estériles provenientes de cultivo de tejidos (1 mes) y plántulas de cultivo de tejidos en etapa de aclimatación (2 meses).

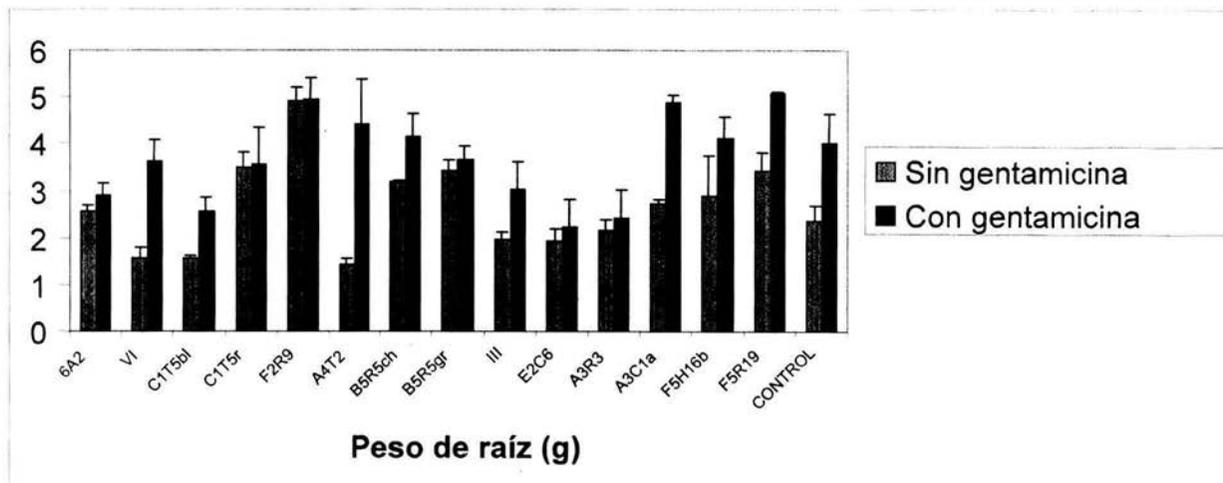
Los parámetros analizados fueron peso fresco, peso seco, número de hojas, longitud de tallo y contenido de nitrógeno total, observando que los resultados obtenidos no fueron significativos de acuerdo al análisis estadístico, esto es que los datos obtenidos de las plantas control (no inoculadas) fueron semejantes a las plantas inoculadas.

FIG 1.Efecto de los inóculos sobre la biomasa (peso fresco) de las plantas.

A



B



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

**Dicotomía bacteriana: simbiote o patógeno. Ejemplos en *Klebsiella* , en rhizobia ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y *Brucella-Ochrobactrum*.**

Lucía Martínez, Julio Martínez Romero, Esperanza Martínez Romero\*  
Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM.

\* Autor para la correspondencia. Dirección: Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Ap. Postal 565- A. Cuernavaca, Mor. México.

Tel: 777-3-13-16-97

Fax: 777-3-17-55-81

## Resumen

Bacterias muy cercanas genéticamente pueden presentar comportamientos diversos. Mientras unas son patógenas otras son inocuas o benéficas. En algunos casos estas diferencias se explican por la presencia de islas de patogenicidad o de genes de virulencia en elementos móviles. En otros, como en *Klebsiella* esta distinción es menos clara. Las *Klebsiella* se aíslan frecuentemente de plantas y cepas de *Klebsiella pneumoniae* de maíz se han utilizado en experimentos de campo mejorando el desarrollo de las plantas. Las bacterias del género *Klebsiella* de origen clínico o ambiental (del agua) parecen ser igualmente virulentas. Se desconocen en gran medida los determinantes genéticos que están involucrados en la interacción de *Klebsiella* con animales o plantas. En otras bacterias como en *Rhizobium* la información genética para interactuar con plantas, formar nódulos y fijar nitrógeno se encuentra en plásmidos o islas simbióticas que pueden perderse o transferirse entre bacterias. La transferencia natural de la información genética para la nodulación es la que explica que también existan  $\beta$ -Proteobacterias de los géneros *Ralstonia* y *Burkholderia* con capacidad para nodular leguminosas. En estos géneros existen patógenos de humanos o de plantas o también bacterias del suelo. *Ochrobactrum* y *Brucella* son dos géneros relacionados genéticamente con diferente grado de patogenicidad. *Brucella* es un patógeno agresivo de mamíferos, mientras que *Ochrobactrum* es un patógeno oportunista que se encuentra frecuentemente asociado a plantas. Hay genes que en *Brucella* se requieren para virulencia mientras que en *Rhizobium* se requieren para simbiosis con plantas. Otros factores comunes entre simbioses y patógenos para interactuar con sus hospederos son los pilis y fimbrias para adherirse, los sistemas de secreción y algunos sistemas de dos componentes, estos pudieran predisponer a algunos simbioses para convertirse en patógenos. Existe un gran desconocimiento de como y cuando pueda ocurrir esto.

1 Closely related bacteria may show very different behaviors. While some bacteria are  
2 pathogenic, others are harmless or even beneficial. In some cases these differences can be  
3 explained by the presence of pathogenicity islands or mobile elements with virulence genes. In  
4 other cases, as in *Klebsiella*, the distinction is less clear. *Klebsiella* are frequently isolated from  
5 plants and *Klebsiella* strains from maize have been used in field experiments improving plant  
6 development. *Klebsiella* are similarly virulent no matter if the isolates are clinical or  
7 environmental (from water). The genetic determinants that are involved in plant- or animal-  
8 *Klebsiella* interactions are unknown. In other bacteria, such as rhizobia ( $\alpha$ -Proteobacteria), the  
9 genetic information needed to interact with plants is found in plasmids or symbiotic islands that  
10 can be lost or transferred between bacteria. Natural transfer of genetic information for nodulation  
11 explains why *Ralstonia* and *Burkholderia*,  $\beta$ -Proteobacteria, are able to nodulate legumes. These  
12 bacterial genera comprise human and plant pathogens as well as soil bacteria. Two genetically  
13 close bacteria, *Ochrobactrum* and *Brucella* show a different degree of pathogenicity. While  
14 *Brucella* is an aggressive mammal pathogen *Ochrobactrum* is only an opportunistic pathogen  
15 frequently found associated to plants. Some genes that are required for virulence in *Brucella*, are  
16 required in *Rhizobium* to establish symbiosis with plants. Other common factors from pathogens  
17 and symbionts involved in host interaction are pilis and fimbriae for attachment secretion  
18 systems and some two component systems and these may predispose some symbionts to become  
19 pathogens, there is a lack of knowledge of how and when may this occur.

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27

## 1           Introducción

2           Existen numerosos casos de bacterias cercanamente relacionadas que tienen  
3           comportamientos (fenotipos) muy distintos. Mientras unas son benéficas (mutualistas) o ino-  
4           cuas, otras son patógenas, no sólo de plantas sino también de humanos. A estas bacterias se les  
5           encuentra en las  $\alpha$  o  $\beta$  o  $\gamma$  Proteobacterias, en las Gram positivas y también en *Flavobacterium* y  
6           *Sphingobacterium* de la división CFB de Bacteria. En las arqueas no se han detectado patógenos.

7           La disyuntiva simbiote-patógeno se explica en buena parte, en algunas bacterias,  
8           incluyendo la bien estudiada *Escherichia coli*, por la presencia de paquetes de genes de  
9           patogenicidad, llamados islas de patogenicidad<sup>86, 87, 99</sup>, pero también el ambiente es determinante  
10          en que una bacteria se establezca como patógeno o no. Así por ejemplo las cepas de *E. coli*  
11          uropatogénicas que causan infecciones en vías urinarias, no son patógenas en el intestino. En el  
12          famoso *Bacillus anthracis* (agente causal del antrax) una isla de patogenicidad en un plásmido  
13          codifica la toxina letal para humanos<sup>67</sup>. También existen islas de patogenicidad en *Helicobacter*  
14          *pylori*, causante de gastritis y cáncer gástrico<sup>35</sup>, en *Salmonella*<sup>10, 35, 51</sup> y en otras.

15          En cambio en *Pseudomonas aeruginosa* los genes de virulencia se encuentran dispersos  
16          en el genoma, parece no existir diferencias genéticas claras o islas de patogenicidad que  
17          distingan a los aislamientos clínicos de los ambientales y se considera que todas estas bacterias  
18          son patógenos potenciales para el ser humano<sup>23</sup> pero recientemente se ha reconocido una  
19          pequeña isla genómica en *P. aeruginosa* que determina la glucosilación del flagelo y que se  
20          encuentra en ciertas cepas patógenas<sup>3</sup>. Hay cepas de *P. aeruginosa* que son patógenas de plantas,  
21          de mamíferos y de invertebrados como *Caenorhabditis elegans*. *P. aeruginosa* es un agente  
22          etiológico importante en infecciones oportunistas intrahospitalarias y ha atraído un gran interés  
23          recientemente porque infecta los pulmones de pacientes con fibrosis quística y porque tiene  
24          potencial biotecnológico y en biorremediación<sup>83</sup>.

25          En este artículo revisaremos la relación de las *Klebsiella* clínicas con los aislamientos de  
26          agua o de plantas así como también los rhizobia, simbioses o patógenos de plantas y  
27          *Ochrobactrum* clínicos y ambientales en relación con *Brucella*, patógeno de mamíferos. Además

1 se discutirán las  $\beta$ -Proteobacterias que nodulan plantas leguminosas, de los géneros *Burkholderia*  
2 y *Ralstonia* que se encuentran inmersas entre bacterias del suelo o patógenos de humanos y  
3 plantas.

4 Los enfoques moleculares han permitido clarificar las relaciones genéticas entre las  
5 bacterias. Las secuencias de los genes ribosomales y más recientemente de diversos genes se han  
6 utilizado para elaborar reconstrucciones de árboles que tratan de reflejar las relaciones y  
7 filogenias entre bacterias y es en el marco de referencia de estas relaciones genéticas que  
8 podemos situar a los patógenos o a los simbioses y compararlos para poder obtener los  
9 determinantes genéticos involucrados en cada tipo de interacción.

#### 10 *Klebsiella*

11 Las bacterias del género *Klebsiella* se han encontrado cada vez con mayor frecuencia  
12 asociadas a septicemia, neumonía en infecciones urinarias intrahospitalarias. Se estima que un  
13 8% de estas infecciones en EEUU y en Europa son causadas por *Klebsiella*, principalmente de  
14 las especies *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*<sup>71</sup>. *Klebsiella* coloniza las mucosas de los mamíferos. En  
15 los humanos se encuentran en los epitelios de la nariz, faringe y en el tracto intestinal<sup>9</sup>. También  
16 se les ha asociado con artritis en humanos, con mastitis en bovinos<sup>32</sup>, con rinitis crónica atrófica  
17 y hasta con diarreas hemorrágicas o infecciones fatales. Se ha propuesto inmunizar a las personas  
18 de alto riesgo contra la *Klebsiella*<sup>71</sup>.

19 Históricamente las especies de *Klebsiella*, como las de muchas otras bacterias, se  
20 establecieron basándose en su patología o en su origen y ha prevalecido una gran confusión en su  
21 nomenclatura<sup>32, 34, 71</sup>. El género *Klebsiella* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza,  
22 como en el agua, en suelos y plantas y también en desagües y se piensa que la colonización en  
23 humanos ocurre a partir de diversas fuentes<sup>57</sup>.

24 En las plantas *Klebsiella* no causa enfermedades. Es de notar que las *Klebsiella*  
25 *pneumoniae* aun de origen clínico, *K. oxytoca* y *K. planticola* son fijadores de nitrógeno (datos  
26 de nuestro laboratorio indican que *K. terrigena* también es fijadora de nitrógeno) y es muy  
27 común que bacterias fijadoras de nitrógeno se encuentren asociadas con plantas. El interés de

1 estudiar bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas es el que las bacterias proporcionen  
2 a las plantas parte del nitrógeno que requieren y que no se necesite utilizar tan altas cantidades de  
3 fertilizantes químicos en los cultivos agrícolas<sup>46, 93</sup>. Se ha demostrado que cepas de *K.*  
4 *pneumoniae* entran al maíz<sup>11</sup> y que dentro de sus raíces las bacterias producen la enzima  
5 nitrogenasa encargada de la fijación de nitrógeno<sup>12</sup> y que fijan nitrógeno en trigo mientras que en  
6 maíz sólo si se les provee de una fuente adicional de carbono<sup>12</sup>. Se han realizado experimentos  
7 de inoculación de maíz liberando *K. pneumoniae* en campos agrícolas en EE.UU. Se ha descrito  
8 que la utilización de 5-cetogluconato distingue a las cepas de *Klebsiella pneumoniae* ambientales  
9 de las clínicas y que las ambientales no tienen cápsulas tipo K1a K6<sup>32</sup>. En un enfoque más  
10 dirigido, se encontraron factores de virulencia como hemaglutininas, los sideróforos enterobactin  
11 y aerobactin, polisacáridos capsulares y pilis, tanto en cepas clínicas como en bacterias de *K.*  
12 *pneumoniae* aisladas de aguas superficiales. Esto significaría que estos aislados ambientales de  
13 *K. pneumoniae* no son menos virulentos que los clínicos<sup>70</sup>. Esto ya se había observado en otros  
14 aislados de agua y clínicos que fueron igualmente virulentos para matar ratones<sup>57</sup>. Se ha  
15 encontrado que cepas de *Klebsiella* patógenas son capaces de colonizar superficies vegetales de  
16 papa y lechuga<sup>52</sup> y se ha discutido que las plantas pudieran ser reservorios de *Klebsiella*  
17 oportunistas. Los factores de virulencia sí se encontraron con menos frecuencia en los aislados  
18 de *K. oxytoca* y *K. planticola* en las aguas referidas anteriormente<sup>70</sup>.

19 Mientras que la mayoría de los aislados clínicos pertenecen a *K. pneumoniae*, *K.*  
20 *oxytoca* y a *K. granulomatis* (que se supone es el agente causante de la donovanosis, una  
21 ulceración genital), es menor la proporción de éstos que corresponde a *K. terrigena* y *K.*  
22 *planticola*. Sin embargo, *K. planticola* representa un 8-19% de los aislados clínicos de *Klebsiella*  
23 y *K. terrigena* un 0.4% de éstos<sup>62</sup>. Cepas de *K. planticola* han sido aisladas de arroz<sup>53</sup>. Por otro  
24 lado se ha encontrado que *K. planticola* y *K. ornithinolytica* son las bacterias que causan  
25 envenenamiento al comer pescado descompuesto que contiene grandes cantidades de histamina  
26 producida por estas bacterias<sup>50</sup>.

27 Un diagrama de las relaciones genéticas entre especies de *Klebsiella* que se derivan del

1 análisis de las secuencias de algunos genes utilizados como marcadores moleculares en este caso  
2 ejemplificados por *gyrA* que codifica para la subunidad A de la DNA girasa y *parC* el cual  
3 codifica para la subunidad C de la topoisomerasa IV se presenta en la Fig. 1 y parece observarse  
4 que se distinguen en linajes separados (pero cercanos) las bacterias con los diferentes grados de  
5 virulencia que hemos asignado de acuerdo a la presencia de determinantes de virulencia<sup>70</sup> o a la  
6 frecuencia infectiva<sup>62</sup>.

7 La virulencia de *K. pneumoniae* esta relacionada a su capacidad de adquirir fierro ya  
8 que se incrementó cuando se le transfirieron a una cepa los genes para la producción del  
9 sideróforo aerobactin y de su receptor. Estos genes se encuentran localizados en un plásmido de  
10 180 Kb en *K. pneumoniae*<sup>66</sup>. De igual manera se ha observado que la alta concentración de fierro  
11 en la sangre estimula la virulencia de *K. pneumoniae* en ratón<sup>8</sup>. En un bajo porcentaje de cepas  
12 de *Klebsiella pneumoniae* (de las tres subespecies), de *K. oxytoca* y de *K. planticola* se ha  
13 encontrado la isla de alta patogenicidad de *Yersinia* spp. que codifica para la producción del  
14 sideróforo yersiniabactin, su regulación y su receptor que determinan virulencia tanto en ratones  
15 como humanos. En *Klebsiella* estos genes pueden servir para obtener fierro y parece ser que esta  
16 isla no es un factor de virulencia en *Klebsiella* excepto tal vez en los casos de pacientes  
17 inmunocomprometidos<sup>4, 79</sup>.

18 En *Klebsiella* spp. se desconoce si existen otras islas de patogenicidad y tampoco cuáles  
19 son los determinantes genéticos que condicionan la interacción con las plantas. Estos últimos  
20 pudieran ser plasmídicos o cromosomales y participar en la interacción con los humanos. Se han  
21 observado plásmidos tanto en aislamientos clínicos (Jesús Silva, comunicación personal) como  
22 en bacterias aisladas de plantas. En una cepa obtenida del interior de plátano se observaron 3  
23 plásmidos con tamaños de 210 kb, 110 kb y 100 kb que no portan los genes de nitrogenasa *nif*.  
24 Por otro lado, se ha observado que las *Klebsiella* de plantas son resistentes a ácido nalidíxico,  
25 carbenicilina, eritromicina y sensibles a carbenicilina en presencia de ácido clavulánico, sin  
26 embargo son menos resistentes a algunos otros antibióticos a los que las klebsiellas clínicas son  
27 resistentes ya que poseen  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro codificadas en plásmidos<sup>2, 82</sup>. Es

1 interesante notar que un pariente cercano de *Klebsiella*, *Erwinia herbicola*, es un patógeno de  
2 plantas y su patogenicidad depende de plásmidos que portan islas de patogenicidad, sería  
3 interesante determinar si estos plásmidos de *Erwinia* existen en *Klebsiella*.

#### 4 Rhizobia

5 Desde hace varios años se ha reconocido que las bacterias patogénicas de plantas (que  
6 forman tumores en los tallos o excesivo crecimiento de raíces) y las bacterias simbióticas,  
7 fijadoras de nitrógeno se encuentran muy cercanamente relacionadas, tanto que se ha sugerido en  
8 varias ocasiones que se les consideren dentro del mismo género<sup>31, 78</sup>. Sólo recientemente se  
9 planteó una propuesta formal para unificar los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium* dentro del  
10 género *Rhizobium*<sup>103</sup>, sin embargo esta propuesta no ha sido apoyada por varios investigadores<sup>21</sup>  
11 a pesar de que los argumentos biológicos apuntan en la dirección de que se trata de un solo  
12 género<sup>28</sup>.

13 En los árboles filogenéticos basados en los genes 16S ribosomales pero también en los  
14 genes de la atpasa (*atpD*) y genes involucrados en recombinación (*recA*) se observa a las  
15 especies simbióticas y patogénicas entremezcladas (Fig. 1). También las simbióticas se  
16 encuentran alternando con bacterias no simbióticas (que no son patógenas), éstas se han descrito  
17 dentro de los géneros *Sinorhizobium*<sup>76</sup>, *Rhizobium*<sup>54, 80, 84</sup> y *Mesorhizobium*<sup>88</sup>. Estas bacterias no  
18 simbióticas carecen de plásmidos simbióticos o de la información genética para nodular, y  
19 pueden convertirse en simbioses al readquirir un plásmido simbiótico<sup>76, 80</sup> o la información para  
20 nodulación y fijación de nitrógeno contenida en lo que se ha llamado una isla simbiótica con  
21 localización cromosomal<sup>89</sup>.

22 Así también es la presencia de un plásmido simbiótico o de un plásmido de  
23 tumorogénesis (Ti o Ri) lo que explica en buena medida los diferentes fenotipos en rhizobia.  
24 Llama la atención que genes *fix* y *nif* se hayan encontrado en cepas patogénicas formadoras de  
25 tumores y se ha discutido que las cepas patogénicas surgieran de las fijadoras de nitrógeno<sup>81</sup>. Se  
26 sabe que estos plásmidos pueden ser transferidos de una bacteria a otra tanto en el laboratorio  
27 como en el campo. Las bacterias formadoras de tumores al perder el plásmido Ti o Ri se vuelven

1 inocuas. Este proceso ocurre en la naturaleza o en el laboratorio. Estas cepas pueden ser  
2 receptoras de plásmidos incluyendo los simbióticos y usándolas hemos convertido en  
3 experimentos de laboratorio a un patógeno en un simbiote capaz de formar nódulos fijadores de  
4 nitrógeno en plantas de frijol<sup>58</sup>.

5 *Rhizobium tropici* es una bacteria que forma nódulos en un buen número de especies  
6 leguminosas<sup>37</sup> y que se ha utilizado exitosamente como inoculante en Brasil<sup>42</sup>. No sólo por la  
7 secuencia de los genes ribosomales<sup>100, 102</sup> sino también de citrato sintasa (Hernández-Lucas et  
8 al., en preparación), homología ADN-ADN y tolerancia a la acidez<sup>60</sup>, el pariente más cercano de  
9 *R. tropici* es [*Agrobacterium*] *rhizogenes* que provoca la proliferación tumoral de raíces en  
10 plantas. Es más, en [*A.*] *rhizogenes* se encuentran los genes *teu* (datos no publicados),  
11 originalmente descritos en *R. tropici*<sup>77</sup> que están involucrados en el transporte de compuestos  
12 exudados por las raíces de frijol. Las bacterias de *A. rhizogenes* al adquirir el plásmido  
13 simbiótico de *R. tropici* se convierten en simbioses, pero por retener el plásmido Ri, son a la vez  
14 patógenos y simbioses (Martínez-Romero, datos no publicados).

15 A su vez, cepas de *Rhizobium* que normalmente nodulan y fijan nitrógeno en frijol  
16 pueden volverse patógenos y formar tumores en tallos al adquirir el plásmido Ti<sup>27,40</sup>. Tanto los  
17 patógenos convertidos a simbioses como los simbioses convertidos a patógenos son menos  
18 eficientes en formar nódulos y fijar nitrógeno o en formar tumores que las cepas originales<sup>41, 58,</sup>  
19 <sup>94</sup>.

20 Los genomas completos de las rhizobia han revelado que existen grandes similitudes  
21 entre los diferentes géneros simbioses (*Rhizobium* y *Mesorhizobium*) y patógenos  
22 (*Agrobacterium*)<sup>101</sup> y se ha reconocido un genoma ancestral de *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*  
23 que pudo existir hace 400-500 millones de años<sup>64</sup>. En ese momento las plantas terrestres estaban  
24 surgiendo y pudiera ser que estas bacterias han estado asociadas a las raíces de las plantas  
25 durante largos periodos antes de adquirir fenotipos diversos. La capacidad de nodulación de estas  
26 bacterias debe haber surgido posterior a la aparición de las leguminosas que son sus hospederos  
27 y seguramente la nodulación disparó la radiación de especies de rhizobia. El tiempo de origen de

1 las leguminosas se desconoce pero ya estaban divergiendo hace 65 millones de años, por lo que  
2 esta familia debe ser más antigua a pesar de que algunas especies (incluyendo las de clima  
3 templado) sean más recientes<sup>6,75</sup>. Hasta el momento no hay manera de fechar cuando apareció la  
4 nodulación ni la tumorigénesis.

5 Por otro lado los genomas de rhizobia han mostrado diferencias importantes que atañen  
6 no sólo al tamaño del cromosoma sino también a su organización y secuencias. En  
7 [*Agrobacterium tumefaciens*] existe un cromosoma lineal que no se sabe si se encuentre también  
8 en otras rhizobia pero se sabe que existe en las cepas de [*A. tumefaciens*] que se han encontrado  
9 causando infecciones (aunque muy raramente) en humanos (Goodner, comunicación personal).  
10 Sin embargo, no se ha realizado la comparación de [*Agrobacterium*] *tumefaciens* con cepas  
11 simbióticas (de *Rhizobium galegae*, *R. huautlense*, [*Alo*]rhizobium *undicola*,<sup>17</sup> y *Rhizobium*  
12 spp.<sup>14, 59</sup>) que son las más cercanas con [*A. tumefaciens*]. Datos de nuestro laboratorio indican  
13 que una de estas cepas tiene una organización genómica que pudiera ser semejante a  
14 *Agrobacterium* y el mismo número de copias ribosomales que éste (datos no publicados).

15 Las cepas nodulantes más cercanas a [*Agrobacterium*] *tumefaciens* se han aislado de  
16 nódulos de soya en Paraguay<sup>13</sup> y nódulos de la planta *Neptunia natans* en África<sup>17</sup>, así como  
17 asociada al interior de raíces y plantas de plátano en Colima, México pero capaces de nodular  
18 acacias en el laboratorio<sup>59</sup>. Es el interés de nuestro grupo realizar una comparación más extensa  
19 de estas bacterias simbióticas con sus parientes más cercanos patógenos de plantas ya que estas  
20 cepas parecen llenar el espacio que aparentemente separa a *Rhizobium* del antes llamado  
21 *Agrobacterium*.

22 Es también la transferencia lateral y la adquisición de la información genética para  
23 nodulación la que explica la existencia de bacterias simbióticas capaces de nodular en grupos  
24 bacterianos en los cuales no se habían detectado simbiontes formadores de nódulos; éstos son las  
25  $\beta$ -Proteobacterias. Todo el grupo de rhizobia conocido hasta entonces pertenecía a las  $\alpha$ -  
26 Proteobacterias. Se han encontrado tanto especies de *Burholderia*<sup>65</sup> ahora designadas *B.*  
27 "*tuberum*" y *B.* "*phymatum*"<sup>97</sup> como de *Ralstonia taiwanensis*<sup>14</sup> con plásmidos que llevan genes

1 de nodulación junto con genes de fijación de nitrógeno (Boivin, comunicación personal).  
2 Mientras que los genes *nod* se asemejan a los de las  $\alpha$ -Proteobacterias, los genes *nif* son  
3 parecidos a genes de otros fijadores de nitrógeno del mismo grupo dentro de las  $\beta$ -  
4 Proteobacterias por lo que se piensa que los genes de nodulación de rhizobia fueron transferidos  
5 a algunas cepas fijadoras de nitrógeno de *Burkholderia* y *Ralstonia*. Curiosamente los genes *nif*  
6 de estas  $\beta$ -Proteobacterias tienen semejanza al de *Azorhizobium caulinodans*. La secuenciación  
7 del plásmido simbiótico de *Ralstonia* arrojará luz sobre el origen de estos plásmidos y esto es un  
8 proyecto que se está llevando a cabo en Francia (Boivin, comunicación personal). Dentro de *R.*  
9 *taiwanensis* que agrupa cepas que nodulan y fijan nitrógeno en mimosas también se incluye un  
10 aislamiento clínico de un paciente con fibrosis quística<sup>14</sup>. En el género *Ralstonia* se encuentran  
11 patógenos de diversas plantas, se desconoce hasta el momento si las cepas de *Ralstonia* que  
12 nodulan leguminosas pudieran ser también patógenas de otras plantas, lo que sí se sabe es que  
13 éstas no son patógenos de tabaco (C. Boivin, comunicación personal).

14 El género *Burkholderia* ha recibido gran interés porque las bacterias de la especie *B.*  
15 *cepacia* causan graves infecciones en pacientes con fibrosis quística<sup>30</sup>. Se ha descrito que los pili  
16 tipo cable sirven para adherirse a los pulmones de estos enfermos<sup>96</sup> pero se desconoce si los  
17 aislados de plantas tienen este tipo de pilis. De las 32 especies descritas de *Burkholderia* un poco  
18 más del 10% son patógenos de humanos y otro porcentaje parecido se han descrito como  
19 fijadoras de nitrógeno mientras que sólo el 5% se han descrito como noduladoras de  
20 leguminosas, pero este porcentaje puede incrementarse porque de leguminosas nativas de Brasil  
21 se han aislado un buen número de *Burkholderias* que aún no se publican (Moreira, comunicación  
22 personal). Tanto *B. cepacia* como otras especies de *Burkholderia* han sido aisladas de plantas de  
23 arroz<sup>5, 90</sup>, de caña de azúcar<sup>20</sup>, de maíz<sup>18, 20</sup> y de café. Algunas especies de *Burkholderia* son  
24 fijadoras de nitrógeno<sup>5, 20</sup>, algunas se han encontrado que son benéficas y promueven el  
25 crecimiento de las plantas<sup>5, 7, 90, 91, 92</sup> y otras pueden degradar muy eficientemente compuestos  
26 contaminantes. Sin embargo se ha propuesto una moratoria para el uso de *Burkholderia* en la  
27 agricultura por el posible riesgo para la salud<sup>39</sup>.

1 En una historia que se asemeja a las de otras bacterias, en *Flavobacterium* y  
2 *Sphingobacterium* se encuentran bacterias de origen clínico o ambiental, algunas de ellas  
3 aisladas como bacterias psicrófilas de la Antártida o del interior del arroz<sup>69</sup> y hasta no  
4 cultivables<sup>45</sup>. En los últimos 50 años, varias especies de los géneros *Flavobacterium* y  
5 *Sphingobacterium* se han encontrado regularmente causando enfermedades en peces y en  
6 humanos, especialmente en infecciones intrahospitalarias o en personas inmunosuprimidas.  
7 Llama la atención que una de estas bacterias (*S. multivorum*, aislada de suelo pero que se ha  
8 descrito como patógeno oportunista de humanos) que pertenece a un linaje alejado de las  
9 Proteobacterias sea capaz de expresar un plásmido simbiótico de *Rhizobium* y formar nódulos en  
10 trébol<sup>22, 47</sup>. Sin embargo nosotros no pudimos transferir el plásmido simbiótico de *R. tropici* a  
11 *Sphingobacterium antarcticum* (datos no publicados).

12

13

#### 14 *Brucella-Ochrobactrum*

15 *Brucella* es un patógeno intracelular de mamíferos. La brucelosis se considera el  
16 principal problema agropecuario en el noroeste de México y es endémica en este país y en países  
17 subdesarrollados pero se ha erradicado en otros países. Las especies en *Brucella* (*B. abortus*, *B.*  
18 *suis*, *B. melitensis* y otras) se asignaron por el hospedero que infectan pero son tan cercanas entre  
19 sí que se argumenta que el género *Brucella* es monoespecífico<sup>25</sup>.

20 Existen publicados los genomas de dos especies de *Brucella*, *B. suis*<sup>68</sup> y *B. melitensis*<sup>63</sup> y  
21 se observan semejanzas importantes con los genomas secuenciados de bacterias simbiotes,  
22 *Mesorhizobium huakuii*<sup>49</sup> (originalmente publicado como *M. loti* pero realmente la cepa  
23 pertenece a *M. huakuii*<sup>95</sup>), *Sinorhizobium meliloti*<sup>24</sup> y con el patógeno de plantas, [*Agrobacterium*  
24 *tumefaciens*]. Hay evidencia que sugiere que *Brucella* compartió ancestros con rhizobia que es  
25 un simbiote intracelular de plantas y que evolucionó de una bacteria del suelo o que se  
26 encontraba asociada a plantas<sup>68</sup>. De igual manera se supone que *Mycobacterium tuberculosis*  
27 surgió de una bacteria del suelo<sup>16</sup>.

1 Se ha observado similitud entre algunos genes de *Brucella abortus* y genes de  
2 rhizobia. Algunos de estos genes tienen un papel simbiótico en *Rhizobium*, mientras que  
3 participan en virulencia en *Brucella*, como los genes *bac* (diferenciación de bacteroide), con  
4 homólogos de *Brucella*<sup>29</sup>. *R. meliloti* y *Brucella* comparten la organización del gene *bac* y  
5 aledaños (G. Walker, comunicación personal). La secuencia de aminoácidos de BacA es similar  
6 al producto del gene *sbmA* de *E. coli*<sup>44</sup>. Las mutantes de *E. coli* en *sbmA* se vuelven resistentes a  
7 microcina B17, un antibiótico de tipo peptídico. Las mutantes de *Brucella* en estos genes no  
8 sobreviven bien en macrófagos y tienen una patogenicidad disminuida en ratón<sup>56</sup>.

9 Además, en *Brucella* se ha descrito un sistema regulatorio de dos componentes BvrR y  
10 BvrS (por *Brucella* virulencia relacionado) con parecido a los genes *chvI-exoS* de *Sinorhizobium*  
11 *meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens*. Las mutantes de *Brucella* en estos genes tienen capacidad  
12 reducida para invadir macrófagos y a una línea transformada de células de humano y no se  
13 replican intracelularmente<sup>85</sup>. Los genes *ChvI-exoS* se encuentran en el cromosoma en *S. meliloti*  
14 y en [*A. tumefaciens*]. ExoS en *S. meliloti* está involucrado en regular la producción de  
15 succinoglucano, se requiere en el establecimiento de la simbiosis y las mutantes en *chvI* de [*A.*  
16 *tumefaciens*] son incapaces de formar tumores en plantas.

17 El pariente más cercano de *Brucella* es *Ochrobactrum*. Los genes 16S ribosomales de  
18 *Brucella* y *Ochrobactrum* son 98% idénticos y hasta se pudiera considerar que *Brucella* y  
19 *Ochrobactrum* están dentro del mismo género. Las especies de este género se encuentran como  
20 patógenos oportunistas en infecciones en humanos o asociadas a plantas o en el suelo o agua<sup>55</sup>.  
21 Hay más diversidad genética en *Ochrobactrum* que en *Brucella* lo que sugiere que *Brucella*  
22 surgió de *Ochrobactrum*. El linaje de *Ochrobactrum-Brucella* se encuentra entre varios otros  
23 géneros de bacterias que se asocian a plantas y parecería que *Ochrobactrum* es intermedio entre  
24 un patógeno y un simbiote. La especie de *Ochrobactrum* más cercana a *Brucella* se ha  
25 denominado *O. intermedium*<sup>98</sup>.

26 En *Ochrobactrum* al igual que en *Rhizobium* se encuentran plásmidos de alto peso  
27 molecular<sup>48</sup> mientras que en ninguna especie de *Brucella* se observan plásmidos<sup>76</sup>. En nuestro

1 laboratorio hemos transferido los plásmidos simbióticos de *R. tropici* a *Ochrobactrum anthropi* y  
2 a *Brucella melitensis*. Las cepas de *Ochrobactrum* al adquirir estos plásmidos se convirtieron en  
3 bacterias capaces de nodular y fijar nitrógeno en plantas de frijol pero las de *Brucella* sólo fueron  
4 capaces de inducir escasas protuberancias que no fijan nitrógeno en las raíces de frijol (Rogel et  
5 al., datos no publicados). Parece que en *Brucella* la evolución hacia un patógeno agresivo  
6 significó sacrificar determinantes genéticos requeridos en la colonización de plantas, pero aun así  
7 las brucelas son capaces de sobrevivir bien en las raíces de plantas de frijol (datos no publicados  
8 de nuestro laboratorio) y se sabe que también sobreviven en el suelo.

9  
10  
11

## 12 Conclusiones y perspectivas

13 Bacterias del grupo *Burkholderia cepacia* que representan un riesgo para la salud se  
14 encuentran normalmente asociadas a maíz en Europa<sup>5, 15</sup> y *Salmonella* y *E. coli* se han  
15 encontrado asociados a germinados de alfalfa en EE.UU.<sup>26, 61, 72</sup>. En bacterias como en  
16 *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* los pili tipo 4 son factores de  
17 virulencia que juegan un papel esencial en la adherencia y en la colonización de la superficie de  
18 sus hospederos, sorprendentemente este tipo de pilis también se requieren para la adhesión a las  
19 células vegetales de una  $\beta$ -Proteobacteria, *Azoarcus*<sup>19</sup> que es considerada benéfica, que fija  
20 nitrógeno y que se asocia a plantas y a hongos<sup>43</sup>. En la interacción de algunas cepas de  
21 *Rhizobium* con plantas, se necesita la función del sistema de secreción tipo III, este es bien  
22 conocido en varias bacterias patógenas de plantas y animales para inyectar proteínas a sus  
23 hospederos. Las mutantes pierden virulencia e incluso se han propuesto a los componentes de  
24 este sistema de secreción como un blanco para antimicrobianos.

25 Parecería que existe una predisposición genética en las bacterias que colonizan plantas  
26 para infectar animales<sup>36, 56</sup> y que genes o paquetes discretos de genes que se pueden fácilmente  
27 perder o adquirir de bacterias filogenéticamente lejanas o cercanas, pueden alterar drásticamente

1 el comportamiento bacteriano y determinar que miembros de un grupo opten por ser patógenos o  
2 simbioses en sus diferentes modalidades.

3           Aún no se entienden bien los mecanismos moleculares y las ventajas selectivas que  
4 llevan a la evolución de la patogenicidad. Parece que la transferencia lateral es un proceso  
5 continuo y que las islas de patogenicidad están en constante evolución, como también parecen  
6 estarlo las islas de simbiosis y los plásmidos simbióticos en los que parecen ensayarse diferentes  
7 combinaciones de genes. Además de estos elementos móviles, los fagos pueden participar en la  
8 evolución y transferencia de factores de virulencia<sup>73</sup>. Los caminos hacia la patogenicidad  
9 también pueden ser graduales mediante sucesivas adiciones de genes que explicarían los  
10 diferentes grados de virulencia que se encuentran en algunas bacterias cercanas genéticamente.  
11 Las adquisiciones de estos genes pueden rastrearse en el marco de los árboles filogenéticos los  
12 cuales son más sólidos en la medida en que mejor reflejen el marco genómico común que  
13 constituye una especie. Los genomas secuenciados de bacterias emparentadas pero con fenotipos  
14 opuestos son de una utilidad invaluable para entender la evolución de la patogenicidad y sus  
15 bases genéticas<sup>99</sup>, pero los caminos hacia la patogenicidad pueden ser más sutiles que esto.  
16 Cambios en la expresión de genes comunes entre simbioses y patógenos o mutaciones puntuales  
17 pueden determinar que una bacteria sea patógena o no<sup>33</sup>. Dado el gran desconocimiento que  
18 existe de las interacciones entre microorganismos, de la frecuencia de transferencia lateral de  
19 información genética en condiciones naturales y de sus consecuencias adaptativas no podemos  
20 predecir cuándo o cómo surgirá un nuevo patógeno o un patógeno conocido con una  
21 patogenicidad exacerbada. Una de las últimas clonas epidémicas de *Vibrio cholera* corresponde a  
22 un linaje que se consideraba ambiental. En *V. cholera* hay cepas patogénicas y no patogénicas<sup>74</sup>.  
23 *Yersinia pestis*, agente causal de la peste surgió de *Y. pseudotuberculosis* hace aproximadamente  
24 1500 años. La diferencia en patogenicidad se atribuye a dos plásmidos uno de los cuales codifica  
25 para una fosfolipasa necesaria para la transmisión por pulgas<sup>1,38</sup>.

26           Con los numerosos ejemplos revisados en los que bacterias cercanamente relacionadas  
27 presentan fenotipos contrastantes, se hace evidente la capacidad de las bacterias de adaptación

1 rápida para colonizar nuevos nichos y comportarse en algunos casos como patógenos, los  
2 mecanismos más comunes que hemos enfatizado son debidos a la transferencia lateral de  
3 información genética.

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

1 Referencias.

- 2 1. Achtman, M., K. Zurth, G. Morelli, G. Torrea, A. Guiyoule & E. Carniel. 1999. *Yersinia*  
3 *pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc.  
4 Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:14043-14048.
- 5 2. Arlet, G., D. Nadjar, J. L. Herrmann, J. L. Donay, M. Rouveau & A. Lagrange Philippon.  
6 2001. Plasmid-Mediated Rifampin Resistance Encoded by an arr-2-Like GeneCassette in  
7 *Klebsiella pneumoniae* Producing an ACC-1 Class C beta-lactamase. Antimicrob. Agents  
8 Chemother.45:2971-2972.
- 9 3. Arora, S. K., M. Bangera, S. Lory, & R. Ramphal. 2001. A genomic island in *Pseudomonas*  
10 *aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.  
11 98:9342-9347.
- 12 4. Bach, S., A. de Almeida, & E. Carniel. 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present  
13 in different members of the family *Enterobacteriaceae*. FEMS Microbiol. Lett 183:289-294.
- 14 5. Balandreau, J., V. Viallard, B. Courmoyer, T. Coenye, S. Laevens, P. Vandamme. 2001.  
15 *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. Appl. Environ.  
16 Microbiol. 67:982-985.
- 17 6. Bermingham, E. & C. Dick. 2001. The *Inga* - newcomer or museum antiquity? Science.  
18 293:2214-2216.
- 19 7. Bevivino, A., S. Tabacchioni, L. Chiarini, M. V. Carusi, M. Del Gallo & P. Visca. 1994.  
20 Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*.  
21 Microbiol. 140:1069-1077.
- 22 8. Brewer, R. J., R. B. Galland & H. C. Polk. 1982. Amelioration by muramyl dipeptide of the  
23 effect of induced hyperferremia upon *Klebsiella* infection in mice. Infect. Immun. 38:175-  
24 178.
- 25 9. Brisse, S, & J. Verhoef. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella*  
26 *oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC*  
27 genes sequencing and automated ribotyping. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:915-924.

- 1 10. Calva, E. 2001. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud  
2 pública. pp.57-68. In E. Martínez Romero, J. Martínez Romero, J (Eds.). Microbios en  
3 Línea. Coordinación de la Investigación Científica. Universidad Nacional Autónoma de  
4 México.
- 5 11. Chelius, M. K. & E. W. Triplett. 2000. Diazotrophic endophytes associated with maize. pp.  
6 779-791. In Triplett, E. W. (Ed.). Prokaryotic Nitrogen Fixation: A Model System for the  
7 Analysis of a Biological Process. Horizon Scientific Press, Norfolk, U. K.
- 8 12. Chelius, M. K. & E. W. Triplett. 2000. Immunolocalization of dinitrogenase reductase  
9 produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. Appl. Environ.  
10 Microbiol. 66:783-787.
- 11 13. Chen, L. S., A. Figueredo, F. O. Pedrosa & M. Hungria. 2000. Genetic characterization of  
12 soybean rhizobia in Paraguay. Appl. Environ. Microbiol. 66:5099-5103.
- 13 14. Chen, W.- M., S. Laevens, T. M. Lee, T. Coenye, P. De Vos, M. Mergeay & P. Vandamme.  
14 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp., nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and  
15 sputum of a cystic fibrosis patient. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1729-1735.
- 16 15. Chiarini, L., V. Giovannelli, A. Bevivino, C. Dalmastrì & S. Tabacchioni. 2000. Different  
17 portions of the maize root system host *Burkholderia cepacia* populations with different  
18 degrees of genetic polymorphism. Environ. Microbiol. 2:111-118.
- 19 16. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V., Gordon, K.  
20 Eiglmeier, et. al. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the  
21 complete genome sequence. Nature. 393:537-543.
- 22 17. de Lajudie. P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck, R. Coopman, M. D. Collins, K.  
23 Kersters, B. Dreyfus and M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov.,  
24 nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Syst.  
25 Bacteriol. 48:1277-90.
- 26  
27

- 1 18. Di Cello, F., A. Bevivino, L. Chiarini, R. Fani, D. Paffetti, S. Tabacchioni & C. Dalmastrì.  
2 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere  
3 at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4485-4493.
- 4 19. Dörr, J., T. Hurek & B. Reinhold-Hurek. 1998. Type IV pili are involved in plant-microbe  
5 and fungus-microbe interactions. *Mol. Microbiol.* 30:7-17.
- 6 20. Estrada-de los Santos, P., R. Bustillos-Cristales & J. Caballero-Mellado. 2001. *Burkholderia*,  
7 a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic  
8 distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2790-2798.
- 9 21. Farrand, S. K., P. B. van Berkum & P. Oger. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the  
10 family *Rhizobiaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003 (en prensa).
- 11 22. Fenton, M. & B. D. W. Jarvis. 1994. Expression of the symbiotic plasmid from *Rhizobium*  
12 *leguminosarum* biovar *trifolii* in *Sphingobacterium multivorum*. *Can. J. Microbiol.* 40:873-  
13 879.
- 14 23. Foght, J. M., D. W. S. Westlake, W. M. Johnson & H. F. Ridgway. 1996. Environmental  
15 gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are  
16 taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiol.*  
17 142:2333-2340.
- 18 24. Galibert, F., T. M. Finan, S. R. Long, A. Pühler, et al. 2001. The composite genome of the  
19 legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293:668-672.
- 20 25. Gándara, B., A. López Merino, M. A. Rogel & E. Martínez-Romero. 2001. Limited genetic  
21 diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 39:235-240.
- 22 26. Gandhi, M., S. Golding, S. Yaron & K. R. Matthews. 2001. Use of green fluorescent protein  
23 expressing *Salmonella* Stanley to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa  
24 sprouts. *J. Food. Prot.* 64:1891-1898.
- 25 27. García- de los Santos A & S. Brom. 1997. Characterization of two plasmid-borne *lpsB* loci of  
26 *Rhizobium etli* required for lipopolysaccharide synthesis and for optimal interaction with  
27 plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:891-902.

- 1 28. Gaunt, M. W., S. L. Turner, L. Rigottier-Gois, S. A. Lloyd-Macgilp & J. P. W. Young. 2001.  
2 Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of  
3 rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:2037-2048.
- 4 29. Glazebrook, J., A. Ichige & G. C. Walker. 1996. Genetic analysis of *Rhizobium meliloti*  
5 *bacA-phoA* fusion results in identification of *degP*: Two loci required for symbiosis are  
6 closely linked to *degP*. *J. Bacteriol.* 178:745-752.
- 7 30. Govan, J. R., J. E. Hughes & P. Vandamme. 1996. *Burkholderia cepacia*: medical,  
8 taxonomic and ecological issues. *J. Med. Microbiol.* 45:395-407.
- 9 31. Graham, P. H. 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of the  
10 root-nodule bacteria of legumes. *J. Gen. Microbiol.* 35:511-517.
- 11 32. Grimont, F., P. A. D. Grimont & C. Richard. 1992. The genus *Klebsiella*. In A. Balow, H. G.  
12 Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K-H Schleifer (eds). *The Prokaryotes*, 2nd. Edition  
13 Springer Verlag, New York.
- 14 33. Groisman, E. A. & H. Ochman. 1994. How to become a pathogen. *Trends Microbiol.* 2:289-  
15 294.
- 16 34. Hedegaard, J., S. A. de A Steffensen, N. Norskov-Lauritsen, K. K. Mortensen, H. U.  
17 Sperling-Petersen. 1999. Identification of *Enterobacteriaceae* by partial sequencing of the  
18 gene encoding translation initiation factor 2. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:1531-1538.
- 19 35. Hensel, M. 2000. *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol. Microbiol.* 36:1015-1023.
- 20 36. Hentschel, U., M. Steinert & J. Hacker. 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis  
21 and pathogenesis. *Trends Microbiol.* 8:226.
- 22 37. Hernández-Lucas I, L. Segovia, E. Martínez-Romero & S. G. Pueppke. 1995. Phylogenetic  
23 relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl.*  
24 *Environ. Microbiol.* 61:2775-2779.
- 25 38. Hinnebusch, B. J., E. R. Fischer, & T. G. Schwan. 1998. Evaluation of the role of the  
26 *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-  
27 dependent blockage of the flea. *J. Infect. Dis.* 178:1406-1415.

- 1 39. Holmes, A., J. Govan & R. Goldstein. 1998. Agricultural use of *Burkholderia*  
2 (*Pseudomonas*) *cepacia*: A threat to human health? *Emerging Infectious Diseases* 4:221-227.
- 3 40. Hooykaas, P. J. J., P. M. Klapwijk, M. P. Nuti, R. A. Schilperoort & A. Rorsch. 1977.  
4 Transfer of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid to avirulent agrobacteria and to  
5 *Rhizobium ex planta*. *J. Gen. Microbiol.* 98:477-484.
- 6 41. Hooykaas, P. J. J. & R. A. Schilperoort. 1984. The molecular genetics of crown gall  
7 tumorigenesis. *Adv. Genet.* 22:209-283.
- 8 42. Hungria, M. & M. A. T. Vargas. 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain  
9 legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop Res.* 65:151-164.
- 10 43. Hurek, T., B. Wagner & B. Reinhold-Hurek. 1997. Identification of N<sub>2</sub>-fixing plant- and  
11 fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl. Environ.*  
12 *Microbiol.* 63:4331-4339.
- 13 44. Ichige, A. & G. C. Walker. 1997. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti bacA* gene:  
14 functional interchangeability with the *Escherichia coli sbmA* gene and phenotypes of  
15 mutants. *J. Bacteriol.* 179:209-216.
- 16 45. Jacobi, C. A., B. Abmus, H. Reichenbach & E. Stackebrandt. 1997. Molecular evidence for  
17 association between the Sphingobacterium-like organism "*Candidatus comitans*" and the  
18 myxobacterium *Chondromyces crocatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:719-723.
- 19 46. James, E. K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops*  
20 *Res.* 65:197-209.
- 21 47. Jarvis, B. W. D., L. J. H. Ward & E. A. Slade. 1989. Expression by soil bacteria of  
22 nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* *Appl. Environ. Microbiol.*  
23 55:1426-1434.
- 24 48. Jumas-Bilak, E., S. Michaux-Charachon, G. Bourg, M. Ramuz & A. Allardet-Servent. 1998.  
25 Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the *Proteobacteria*. *J.*  
26 *Bacteriol.* 180:2749-2755.

27

- 1 49. Kaneko T, Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K.  
2 Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M.  
3 Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M.  
4 Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada & S. Tabata. 2000. Complete genome structure of the  
5 nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7:331-338.
- 6 50. Kanki, M., T. Yoda, T. Tsukamoto & T. Shibata. 2002. *Klebsiella pneumoniae* produces no  
7 histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine  
8 producers. Appl. Environ. Microbiol. 68:3462-3466.
- 9 51. Kingsley, R. A. & A. J. Baumler. 2002. Pathogenicity islands and host adaptation of  
10 *Salmonella* serovars. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 264:67-87.
- 11 52. Knittel, M. D., R. J. Seidler, C. Eby & L. M. Cabe. 1977. Colonization of the botanical  
12 environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. Appl. Environ. Microbiol. 34:557-  
13 563.
- 14 53. Ladha, J. K., W. L. Barraquio & I. Watanabe. 1983. Isolation and identification of  
15 nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants.  
16 Can. J. Microbiol. 29:1301-1308.
- 17 54. Laguerre, G., M. Bardin & N. Amarger. 1993. Isolation from soil of symbiotic and  
18 nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. Can. J. Microbiol.  
19 39:1142-1149.
- 20 55. Lebuhn, M., W. Achouak, M. Schloter, O. Berge, H. Meier, M. Barakat, A. Hartmann & T.  
21 Heulin. , 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples  
22 and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp., nov. and *Ochrobactrum*  
23 *grignonense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:2207-2223.
- 24 56. LeVier, K., R. W. Phillips, V. K. Grippe, R. M. Roop II & G. C. Walker. 2000. Similar  
25 requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular  
26 survival. Science 287:2492-2493.

27

- 1 57. Matsen, J. M., J. A. Spindler & R. O. Blosser. 1974. Characterization of *Klebsiella* isolates  
2 from natural receiving waters and comparison with human isolates. *App. Microbiol.* 28:672-  
3 678.
- 4 58. Martínez, E., R. Palacios & F. Sánchez. 1987. Nitrogen-fixing nodules induced by  
5 *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.*  
6 169:2828-2834.
- 7 59. Martínez, L., J. Caballero-Mellado, J. Orozco & E. Martínez-Romero. 2003. Diazotrophic  
8 bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant Soil* (accepted).
- 9 60. Martínez-Romero, E. 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant Soil*  
10 161:11-20.
- 11 61. Mohle-Boetani, J. C., J. A. Farrar, S. B. Werner, D. Minassian, R. Bryant, S. Abbott, L.  
12 Slutsker & D. J. Vugia. 2001. *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* infections associated  
13 with sprouts in California, 1996-1998. *Ann. Intern. Med.* 135:239-247.
- 14 62. Monnet, D. & J. Freney. 1994. Method for differentiating *Klebsiella planticola* and  
15 *Klebsiella terrigena* from other *Klebsiella* species. *J. Clin. Microbiol.* 32:1121-1122.
- 16 63. Moreno, E. & I. Moriyon, I. 2002. *Brucella melitensis*: A nasty bug with hidden credentials  
17 for virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. 99:1-3.
- 18 64. Morton, R. A. 2001. Comparison of chromosomal genes from *M. loti* and *S. meliloti* suggest  
19 an ancestral genome. p. 42. In 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Program  
20 and Abstract Book. Hamilton, Canada.
- 21 65. Moulin, L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by  
22 members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411:948-950.
- 23 66. Nassif, X. & P. J. Sansonetti. 1986. Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae*  
24 K1 and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infec. Immunity* 54:603-  
25 608.
- 26  
27

- 1 67. Okinaka, R. T., K. Cloud, O. Hampton, A. R. Hoffmaster, K. K. Hill, P. Keim, T. M.  
2 Koehler, G. Lamke, S. Kumano, J. Mahillon, D. Manter, Y. Martinez, D. Ricke, R. Svensson  
3 & P. J. Jackson. 1999. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis*  
4 plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J. Bacteriol.* 181:6509-6515.
- 5 68. Paulsen, I. T., R. Seshadri, K. E. Nelson, J. A. Eisen, J. F. Heidelberg, T. D. Read, R. J.  
6 Dodson, L. Umayan, et al. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities  
7 between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*  
8 99:13148-13153.
- 9 69. Phillips, D. A., E. Martínez-Romero, G. Yang & C. M. Joseph. 2000. Release of nitrogen: a  
10 key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation. pp.  
11 205-217. In J. K. Ladha, P. M. Reddy, P. M. (Eds.). *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice.*  
12 IRRI, Makati City, Philippines.
- 13 70. Podschun, R., S. Pietsch, C. Höller & U. Ullman. 2001. Incidence of *Klebsiella* species in  
14 surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3325-  
15 3327.
- 16 71. Podschun R & U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology,  
17 taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:589-603.
- 18 72. Ponka, A., Y. Andersson, A. Siitonen, B. de Jong, M. Jahkola, O. Haikala, A. Kuhmonen &  
19 P. Pakkala. 1995. *Salmonella* in alfalfa sprouts. *Lancet* 345:462-463.
- 20 73. Pradel, N., S. Leroy-Setrin, B. Joly & V. Livrelli. 2002. Genomic subtraction to identify and  
21 characterize sequences of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl. Environ.*  
22 *Microbiol.* 68:2316-2325.
- 23 74. Reeves, P. R. & R. Lan. Cholera in the 1990s. *Br. Med. Bull.* 54:611-623.
- 24 75. Richardson, J. E., R. T. Pennington, T. D. Pennington & P. M. Hollingsworth. 2001. Rapid  
25 diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science.* 293:2242-  
26 2245.
- 27

- 1 76. Rogel, M. A., I. Hernández-Lucas, L. D. Kuykendall, D. L. Balkwill & E. Martínez-Romero.  
2 2001. Nitrogen-fixing nodules with *Ensifer adhaerens* harboring *Rhizobium tropici*  
3 symbiotic plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 67:3264-3268.
- 4 77. Rosenblueth, M., M. F. Hynes & E. Martínez-Romero. 1998. *Rhizobium tropici* *teu* genes  
5 involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. Mol. Gen.  
6 Genet. 258:587-598.
- 7 78. Sawada, H., H. Ieki, H. Oyaizu & S. Matsumoto. 1993. Proposal for rejection of  
8 *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for  
9 *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes* Int. J. Syst. Bacteriol. 43:694-  
10 702.
- 11 79. Schubert, S., A. Rakin, H. Karch, E. Carniel & J. Heesemann. 1998. Prevalence of the “high-  
12 pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic  
13 to humans. Infect. Immun. 66:480-485.
- 14 80. Segovia, L., D. Piñero, R. Palacios & E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil  
15 population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol.  
16 57:426-433.
- 17 81. Sessitsch, A., J. G. Howieson, X. Perret, H. Antoun & E. Martínez-Romero. 2002. Advances  
18 in *Rhizobium* research. Crit. Rev. Plant. Sci. 21:323-378.
- 19 82. Silva, J., C. Aguilar, Z. Becerra, F. López-Antuñano & R. García. 1999. Extended-Spectrum  
20  $\beta$ -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteria in Mexico. Microbial Drug Resist.5:189-  
21 193.
- 22 83. Soberón, G. 2001. *Pseudomonas aeruginosa*. pp. 37-55. In E. Martínez Romerò, J. Martínez  
23 Romero (Eds.). Microbios en Línea. Coordinación de la Investigación Científica.  
24 Universidad Nacional Autónoma de México.
- 25 84. Soberón-Chávez, G. & R. Nájera. 1989. Isolation from soil of *Rhizobium leguminosarum*  
26 lacking symbiotic information. Can. J. Microbiol. 35:464-468.

- 1 85. Sola-Landa, A., J. Pizarro-Cerdá, M- J. Grilló, E. Moreno, I. Moriyón, J-M. Blasco, J.- P.  
2 Gorvel & I. López-Goñi. 1998. A two-component regulatory system playing a critical role in  
3 plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion  
4 and virulence. *Mol. Microbiol.* 29:125-138.
- 5 86. Souza, V., A. Castillo & L. E. Eguiarte. 2002. The evolutionary ecology of *Escherichia coli*.  
6 *Am. Scientist.* 90:332- 341.
- 7 87. Souza, V., M. Rocha, L. Sander & L. E. Eguiarte. 2001. Historia natural, ecología y  
8 evolución de la patogenicidad en *Escherichia coli*. pp. 69-89. In: E. Martínez Romero. J.  
9 Martínez Romero (Eds.). *Microbios en Línea*. Coordinación de la Investigación Científica.  
10 Universidad Nacional Autónoma de México.
- 11 88. Sullivan, J. T., B. D. Eardly, P. van Berkum & C. W. Ronson. 1996. Four unnamed species  
12 of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl. Environ.*  
13 *Microbiol.* 62:2818-2825.
- 14 89. Sullivan, J. T., H. N. Patrick, W. L. Lowther, D. B. Scott & C. W. Ronson. 1995. Nodulating  
15 strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the  
16 environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 92:8985-8989.
- 17 90. Trần Van, V., O. Berge, J. Balandreau, S. Ngô Kê & T. Heulin. 1996. Isolement et activité  
18 nitrogénasique de *Burkholderia vietnamiensis*, bactérie fixatrice d'azote associée au riz  
19 (*Oryza sativa* L) cultivé sur un sol sulfaté du Viêt-nam. *Agronomie* 16:479-491.
- 20 91. Trần Van, V., O. Berge, S. Ngo Ke, J. Balandreau & T. Heulin. 2000. Repeated beneficial  
21 effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield  
22 component in low fertility sulphate acid soils of Vitenam. *Plant Soil* 218:273-284.
- 23 92. Trần Van, V., P. Mavingui, O. Berge, J. Balandreau & T. Heulin. 1994. Promotion de  
24 croissance du riz inoculé par une bactérie fixatrice d'azote, *Burkholderia vietnamiensis*,  
25 isolée d'un sol sulfaté acide du Viêt-nam. *Agronomie* 14:697-707.
- 26 93. Triplett, E. W. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation  
27 in monocots. *Plant Soil* 186:29-38.

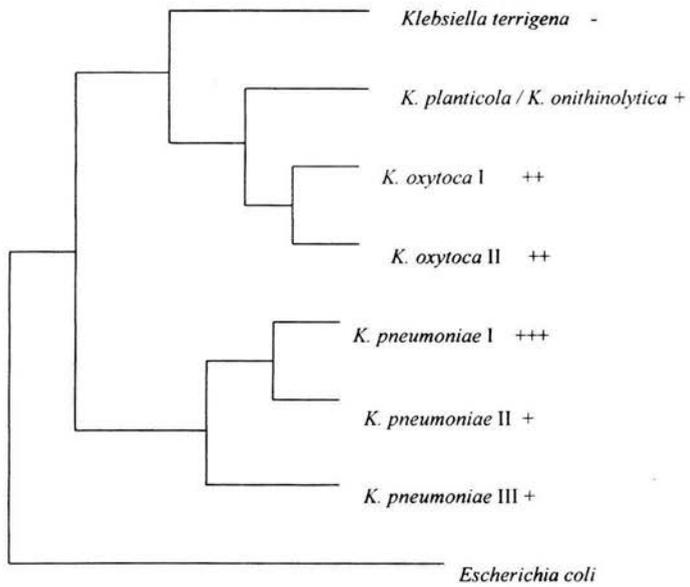
- 1 94. Truchet, G., C. Rosenberg, J. Vasse, J. -S. Julliot, S. Camut & J. Denarié. 1984. Transfer of  
2 *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: Host-specific nodulation  
3 by atypical infection. J. Bacteriol. 157:134-142.
- 4 95. Turner, S. L., X. -X. Zhang, F. -D. Li & P. W. Young. 2002. What does a bacterial genome  
5 sequence represent? Mis-assignment of MAFF303099 to the genospecies *Mesorhizobium*  
6 *loti*. Microbiol. 148:3330-3331.
- 7 96. Tyler, S. D., K. R. Rozee & W. M. Johnson. 1996. Identification of IS1356, a new insertion  
8 sequence, and its association with IS402 in epidemic strains of *Burkholderia cepacia*  
9 infecting cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 34:1610-1616.
- 10 97. Vandamme, P., J. Goris, W-M. Chen, P. De Vos & A. Willems. 2002. *Burkholderia tuberum*  
11 sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. Syst  
12 Appl. Microbiol. 25:507-512
- 13 98. Velasco J., C. Romero, I. López-Goñi, J. Leiva, R. Díaz & I. Moriyón. 1998. Evaluation of  
14 the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of  
15 *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella*  
16 spp. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:759-768.
- 17 99. Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett III, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckeles,  
18 S. -R. Liou, et al. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome  
19 sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:17020-17024.
- 20 100. Willems, A. & M. D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria  
21 based on 16S rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 43:305-313.
- 22 101. Wood, D. W., J. C. Setubal, R. Kaul, D. E. Monks, J. P. Kitajima, V. K. Okura, Y. Zhou, L.  
23 Chen et al. 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens*  
24 C58. Science 294:2317-2322.
- 25 102. Yanagi, M. & K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and  
26 related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. FEMS  
27 Microbiol. Lett. 107:115-120.

1 103. Young, J.M., L. D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. 2001. A  
2 revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus. and the  
3 inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie  
4 et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola*  
5 and *R. vitis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:89-103.

6

7

8



El número de + es correlativo al grado de patogenicidad.

Fig. 1. Relaciones genéticas entre especies de *Klebsiella* derivado del análisis de las secuencias de los genes *gyrA* y *parC*.

## DISCUSION Y PERSPECTIVAS

En la investigación sobre fijación de nitrógeno se han contemplado dos caminos distintos para que las plantas no-leguminosas fijen nitrógeno. Uno es la modificación genética de éstas generando plantas transgénicas que porten genes *nif* y *fix*. El otro es la utilización de organismos fijadores de nitrógeno que puedan aportar a las plantas el nitrógeno que requieren. De las bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a plantas, las endófitas generaron grandes expectativas y abrieron un nuevo capítulo en la investigación sobre fijación de nitrógeno por lo que investigadores de todo el mundo se avocaron a su estudio. Después de algunos años el entusiasmo se ha tornado un poco en escepticismo y se ha generado una gran duda si las bacterias asociadas pueden contribuir sustancialmente con nitrógeno fijado a las plantas.

Al momento de iniciar esta tesis no existía ningún reporte sobre bacterias endófitas de plátano. Escogimos plátano por su importancia alimenticia, valor comercial y por los problemas que existen en el cultivo de esta planta, entre ellos las graves infecciones por hongos. Debido a lo anterior se probaron varios de los aislamientos que se obtuvieron para determinar su efectos como supresores del hongo patógeno *Mycosphaerella fijiensis* y aunque se identificaron algunos de los candidatos para inhibir a este hongo se decidió no continuar con esta parte del proyecto y el esfuerzo se centró en la identificación de los fijadores de nitrógeno.

Mientras este proyecto estaba en curso se reportó el aislamiento de endófitos de plátano en Brasil (27). Estos son muy diferentes a las poblaciones que nosotros encontramos, mientras que ellos identifican *Herbaspirillum*, *Burkholderia* y *Ochrobactrum*, nosotros encontramos principalmente enterobacterias y esporádicamente rhizobia. Entre las posibles explicaciones para obtener diferentes especies bacterianas a las del grupo de Brasil, destacan las diferentes variedades de plátano utilizadas, las diferentes poblaciones nativas de bacterias existentes en ambos países y las condiciones ambientales incluyendo temperatura, humedad y tipo de suelo así como los procedimientos y medios usados en el aislamiento de las bacterias. Cabe recalcar que los aislamientos brasileños no son de plantas esterilizadas en la superficie.

En otras plantas incluyendo maíz y caña de azúcar es muy común encontrar enterobacterias (J. Caballero, comunicación personal). Del interior del maíz se ha aislado *Klebsiella* que se ha empezado a estudiar ampliamente incluyendo un proyecto genómico parcial. De acuerdo a la información proporcionada por el Dr. Triplett, estas bacterias corresponden a *K*.

*pneumoniae*.

En este trabajo identificamos dos tipos de *Klebsiella* tanto por sus características morfológicas como por sus patrones de enzimas metabólicas, pero estas diferencias no fueron claras en los porcentajes de hibridación de ADN total. Bajo este último criterio los dos grupos se parecen, pues la cepa 6A2 presentó un alto nivel de hibridación (40%) con otros aislados de maíz y de caña de azúcar que se agrupan con los aislados de plátano de otro grupo morfológico. El nivel de hibridación del ADN de 6A2 con *K. pneumoniae* fue de sólo el 30%, sin embargo estas cepas son parecidas en sus perfiles de enzimas metabólicas y claramente distinguibles del otro grupo morfológico representado por F2R9 (Fig. 1, del artículo). Las discrepancias en los resultados derivados de metodologías usadas en sistemática bacteriana, se han observado frecuentemente (29) y es difícil distinguir cual es el criterio que indica la relación más certera. Ante la incapacidad de lidiar con estas discrepancias, se aduce la existencia de transferencia lateral y recombinación en la información genética.

A reserva de analizar más aislados clínicos con enzimas metabólicas, parecería que los aislados clínicos aquí representados por la cepa tipo de *K. pneumoniae* pudiera ser un linaje limitado dentro de toda la diversidad de especies de *Klebsiella* de plantas y del ambiente (ver dendrograma Fig. 1). Esta hipótesis nos gustaría probarla analizando los electroferotipos de un buen número de aislamientos clínicos. También sería interesante determinar si las cepas clínicas son capaces de colonizar plantas.

La situación taxonómica de los otros aislados de plátano tanto del grupo I como de rhizobia también es discutible. El grupo I fue el más frecuentemente aislado y tienen características de *Enterobacter cloacae*. Bacterias atribuidas a esta especie fueron aisladas de plantas de arroz y se reportó que estimulan el crecimiento vegetal, sin embargo la caracterización fue muy limitada y solo se basó en pruebas bioquímicas muy generales. Como dato curioso, del interior del tracto digestivo de termitas se han aislado *Enterobacter* fijadoras de nitrógeno (12). Si nosotros no hubiéramos realizado el análisis de la secuencia del gen *rpoB*, seguramente también hubiéramos concluido que se trataba de *Enterobacter cloacae*. Como es muy considerable la separación de las cepas del grupo I por la secuencia del *rpoB* preferimos posponer su clasificación en espera de más datos. No solamente se ha utilizado *rpoB* para establecer filogenias de enterobacterias sino también de *Mycobacterium* (24) y de cianobacterias (37), tal vez convendría secuenciar otros genes de estas bacterias. También queremos conseguir

la cepa tipo y cepas de referencia de *E. cloacae* para poder hacer las comparaciones pertinentes de fenotipos, hibridación ADN-ADN, etc.

Algunas cepas del grupo de *Rhizobium* se situaron claramente cercanos a *R. undicola* por el parecido de sus secuencias, patrones de restricción del gen 16S ribosomal y por sus perfiles de enzimas metabólicas. Sin embargo, los bajos niveles de hibridación de ADN total sugieren que pudiera tratarse de especies diferentes, esto se tendrá que analizar con más detalle, porque para proponer una nueva especie se requieren otras cepas. Desafortunadamente sólo contamos con tres cepas de este tipo pues no logramos obtener más usando Acacias como plantas trampa en experimentos posteriores de inoculación con macerados de plátano. La especie *R. undicola* se propuso originalmente como perteneciente a un nuevo género *Allorhizobium*, independientemente de *Rhizobium* y *Agrobacterium* pero con características de ambas. A semejanza de *Rhizobium*, las cepas de *R. undicola* son capaces de nodular y fijar nitrógeno en leguminosas, son semejantes a *Agrobacterium* por su secuencia de genes ribosomales, pero constituyen un linaje independiente. En la propuesta de unificación de *Rhizobium* y *Agrobacterium*, *Allorhizobium undicola* quedó comprendido dentro de *Rhizobium*.

*R. undicola* fue aislada de nódulos de la leguminosa tropical *Neptunia natans* que crece en zonas inundadas de Senegal en África. Es interesante que las bacterias más cercanas a *R. undicola* son las aisladas de plátano en Colima. En plátano no hay una presión de selección para que la bacteria presente genes de nodulación por lo que pensamos que el plásmido simbiótico en este fondo genético bacteriano debe ser más o menos estable y tal vez no representa una transferencia reciente. Para probar esta hipótesis estamos por determinar la secuencia de los genes *nif* de estas cepas y su estabilidad en subcultivos. Como se mencionó en el artículo presentado las cepas de *Rhizobium* de plátano son capaces de nodular *Acacia farnesiana*, además sabemos que como *Agrobacterium* las cepas parecen tener 4 copias de genes 16S ribosomales y que algunas de estas, residen en un megareplicón (tal vez cromosoma lineal) como en *Agrobacterium*.

Hemos también determinado el porcentaje de hibridación de las cepas de plátano con *Agrobacterium tumefaciens* C58 y estos valores (aprox. 30%) apoyan la cercanía entre estas bacterias. Otras cepas de rhizobia parecidas a *Agrobacterium* (*R. tumefaciens*) se han reportado de nódulos de soya en Paraguay. Actualmente contamos con estas cepas y el estudio de estas, incluyendo las de plátano permitirá esclarecer la controversia que existe en la relación entre

### *Agrobacterium* y *Rhizobium*.

Las otras cepas del grupo morfológico V resultaron ser muy diferentes a *R. undicola*, tanto por electroferotipos, hibridación DNA-DNA y patrones de digestión del gen 16S ribosomal.

Analizando las diferentes características y los puntos de vista para definir un microorganismo que vive dentro de la planta nosotros consideramos como bacteria endófitas aquella que se encuentra dentro de la planta sin causarle daño, teniendo la capacidad de recolonizar a la planta de la cual fue aislada. La confirmación de que una bacteria es endófitas de una planta se observa en su capacidad de recolonizarla, en este trabajo se comprobó que tanto las cepas del grupo I como diferentes cepas de *Rhizobium* fueron reaisladas del interior en experimentos de inoculación. Faltaría un análisis visual mediante microscopía para determinar dónde se encuentran estas bacterias, sin embargo este tipo de trabajos ya se han realizado para otros endófitos de plantas y aunque ilustrativos, no han redituado en mayores avances en el conocimiento de las interacciones de los endófitos. Tal vez el mayor anhelo cuando se trabaja con bacterias endófitas es el encontrar que son capaces de incrementar el desarrollo de las plantas en comparación con los controles no inoculados. Los resultados preliminares con un número muy limitado de plantas en el laboratorio indicó que la inoculación con bacterias del grupo I y rhizobia incrementó el peso fresco de las plantas.

Parece que las plántulas de cultivo de tejidos tienen una bacteria que inhibe el crecimiento vegetal, sensible a gentamicina, por lo que las plantas tratadas previamente con el antibiótico crecen mejor. Es en estas condiciones donde más claramente se ven los efectos de inoculación con los endófitos. La interpretación de esto es que la gentamicina "limpia" de endófitos a las plantas y entonces se hacen patentes los efectos de estos al añadirlos. Se conoce que algunas bacterias proporcionan a las plantas hormonas, vitaminas y otras sustancias que estimulan el crecimiento vegetal. También algunas bacterias inhiben el crecimiento de patógenos, producen sideróforos o estimulan la respuesta de defensa de las plantas. No sabemos el mecanismo por el cual las bacterias probadas promueven el crecimiento del plátano.

Hemos realizado dos intentos de inoculación en las condiciones que usa el INIFAP para propagar y crecer las plantas derivadas de cultivo de tejidos, las cuales son entregadas a los campesinos y agricultores de la zona de Colima. Los resultados no han sido alentadores, esto se puede deber a que existen naturalmente en este lugar estas bacterias y contaminan a los

controles no inoculados. En este caso no habría plantas control, libres de endófitos con que comparar los efectos de la inoculación. Vale la pena recordar que encontramos endófitos residentes en las plantas derivadas de cultivo de tejidos.

La falta de respuesta a la inoculación no significa que las bacterias no tengan un papel funcional dentro de las plantas, esta situación parecería análoga a la del problema de la inoculación del frijol en México. En este caso existe una amplia y diversa población de *R. etli* que forman nódulos por lo que los controles no inoculados normalmente están nodulados profusamente y esto ocasiona que las diferencias entre los controles y los tratamientos inoculados raramente sean constatadas.

Un proyecto derivado en el que estamos trabajando es la caracterización con otros marcadores moleculares de las cepas de *Klebsiella* para definir si corresponden a una nueva especie de *Klebsiella*. Finalmente esta tesis ha generado una nueva línea de investigación que pudiera ser de gran interés. Durante la caracterización de los endófitos de plátano se probó la resistencia a antibióticos de varios de ellos y se encontró que las cepas de *Klebsiella* eran resistentes a amoxicilina pero no a amoxicilina en presencia de ácido clavulánico. El ácido clavulánico es inhibidor de las  $\beta$ -lactamasas que degradan a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. El ácido clavulánico lo produce *Streptomyces clavuligerus* que fue aislado del suelo de Sudamérica (42). Nos pareció interesante que los aislados de plantas tuvieran estos genes y decidimos caracterizarlos con más detalle definiendo de que tipo de  $\beta$ -lactamasas se trata, para esto se estableció una colaboración con el grupo del Dr. Jesús Silva del Instituto Nacional de Salud Pública que trabaja con lactamasas de aislados clínicos de *Klebsiella*. En Europa se ha reportado que *Klebsiella* se encuentra cada vez con más frecuencia como patógeno oportunista en infecciones intrahospitalarias, se le atribuyen el 8% de estas. Se ha cuestionado mucho sobre los reservorios naturales de las resistencias a antibióticos y tal vez los aislados ambientales pudieran serlo. Es de nuestro interés estudiar las  $\beta$ -lactamasas en los endófitos de plantas de plátano y tal vez esto sea el inicio de un proyecto mucho más amplio de ecología de las resistencias a antibióticos en aislados ambientales y de plantas.

## CONCLUSIONES

- \* Los aislados endófitos fijadores de nitrógeno de plantas de plátano son semejantes a especies de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Rhizobium*, algunas pudieran corresponder a especies nuevas dentro de *Klebsiella* y *Rhizobium*.
- \* La posición taxonómica de las bacterias semejantes a *Enterobacter* es todavía incierta, porque la secuencia del gen *rpoB* las coloca fuera de este género.
- \* Los aislados bacterianos endófitos de plantas de plátano mostraron la capacidad de recolonizar el hospedero del cual fueron aislados.
- \* La inoculación de los aislados del grupo de *Enterobacter* y los semejantes a *Rhizobium* en planta de plátano ocasionó un incremento de la biomasa (peso fresco) de la parte aérea en comparación a los controles no inoculados.
- \* El aislado semejante a *Rhizobium* (F5R19) tiene la capacidad de nodular raíces de plantas de *Acacia farnesiana* y esta colocada filogenéticamente cercano a *Agrobacterium*.

## REFERENCIAS

- 1.- Assani A., Haïcour R., Wenzel G., Foroughi-Wehr B., Bakry F., Côte F. X., Ducreux G., Ambroise A. and Grapin A. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science*. 162: 355-362, 2002.
- 2.- Boonjawat J., Chaisiri P., Limpananont J., Soontaros S., Pongsawasdi P., Chaopongpang S., Pornpattkul S., Wongwaitayakul B., Sangduan L. Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria. *Plant Soil*. 137: 119-125, 1991.
- 3.- Chelius M. K. and Triplett E. W. Diazotrophic endophytes associated with maize. ISBN 779-791, 2000.
- 4.- Chelius M. K. and Triplett E. W. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* Associated with *Zea mays* L. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(2) 783-787, 2000.
- 5.- Christensen H. and Olsen J. E. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the beta subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol. Letter*. 161: 89-96, 1998.
- 6.- Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 52: 531-547, 2002.
- 7.- Doolittle F. W., Phylogenetic classification and the Universal Tree. *Science*, 284: 2124 - 2128, 1999.
- 8.- Dykhuizen D. E. Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria?. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73: 25-33, 1998.

- 9.- Eisen J. A. The RecA Protein as a Model Molecule for molecular Systematic Studies of Bacteria: Comparison of Trees of RecAs and 16S rRNAs from the same Species. *J. Mol. Evol.* 41: 1105-1123, 1995.
- 10.- Engener T., Hurek T. and Reinhold-Hurek B. Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph on rice roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 71-75, 1998.
- 11.- Estrada de los Santos P., Bustillos Cristales R. and Caballero Mellado J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6): 2790-2798, 2001.
- 12.- Eutick M. L., O'Brien R. W. and Slaytor M. Bacteria from the Gut of Australian Termites. *Appl Environ Microbiol.* 35(5): 823-828, 1978.
- 13.- Finan T. M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorhölter F. K., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B. and Pühler A. The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 9889-9894, 2001.
- 14.- Fuji T., Huang Y., Higashitani A., Nishimura Y., Iyama S., Hirota Y., Yoneyama T. and Dixon R. A. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. *Plant and Soil.* 103: 221-226, 1987.
- 15.- Gillis M., Van Tran V., Bardin R., Goor M., Hebbar P., Willems A., Segers P., Kersters K., Heulin T. and Fernandez M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:274-289, 1995.
- 16.- Gutiérrez Zamora M. L. and Martínez Romero E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and Maize (*Zea mays* L.). *J. Biotechnology.* 1-9, 2001.

- 17.- Inokuma H., Brouqui P., Drancourt M. and Raoult D. Citrate Synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic Analysis and identification of *Ehrlichia*. J Clin Microbiol. 39(9): 3031-3039, 2001.
- 18.- James E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Research. 65: 197 - 209, 2000.
- 19.- James E. K. , Gyaneshwar P., Barraquio W. L., Mathan N. and Ladha J. K. Endophytic diazotrophs associated with rice. In: Ladha J. K., Reddy P. M., editors. The quest for nitrogen fixation in rice. Proceedings of the Third Working Group Meeting on Assessing Opportunities for nitrogen Fixation in Rice. Los Baños, Laguna, Philippines. Makati City (Philippines): International Rice Research Institute. p.119-140, 2000.
- 20.- James E.K. and Olivares F.L. Infection and colonization sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Plant Sci. 17: 77-119, 1998.
- 21.- James E. K., Olivares F. L., Baldani J. I., Döbereiner J. *Herbaspirillum* and endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp. Bot. 48: 785-797, 1997.
- 22.- James E. K., Reis V. M., Olivares F. L., Baldani J. I. and Dobereiner J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Bot. 45: 757-766, 1994.
- 23.- Kabayashi, D.Y. and J. D. Palumbo. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In C.W. Bacon and J.F. White (ed), Microbial endophytes. Marcel Dekker, Inc. New York.p. 199-233, 2000.
- 24.- Kim B. J., Lee S. H, Lyu M.A., Kim S. J., Bai G. H., Kim S. S., Chae G. T., Kim E. C., Cha C. Y., Kook Y. H. Identification of mycobacterial species by comparative sequences analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). J. Clin. Microbiol. 37: 1714-1720, 1999.

- 25.- Kumada Y., Benson D. R., Hillemann D., Hosted T. J., Rochefort D. A., Thompson C. J., Wohlleben W. and Tateno Y. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90: 3009-3013, 1993.
- 26.- Ladha J. K., Garcia M., Miyan S., Padre A. T., Watanabe I. Survival of *Azorhizobium caulinodans* in the soil rhizosphere of wetland rice under *Sesbania rostrata*-rice rotation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 454-460.
- 27.- Magalhães Cruz L., Maltempi de Souza E., Baler Weber O., Baldani J. I., Dobereiner J. and Oliveira Pedrosa F. 16S Ribosomal DNA Characterization of nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L) Merrill). *Applied and Environ. Microbiol.* 67(5):2375-2379, 2001.
- 28.- Maidak B. L., Larsen N., McCaughey M. J., Overbeek R., Olsen G. J., Fogel K. J., Blandy J. and Woese C. R. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22:3485-3488, 1994.
- 29.- Martínez-Romero E., Wang E. T., López Merino A., Caballero-Mellado J., Rigel M.A., Gándara B., Toledo I. and Martínez-Romero J. Ribosomal Gene Based Phylogenies on trial: The Case of *Rhizobium* and Related Genera. In: Pierre J. G. M., De Wit, Bisseling T., Stiekema W. J., editors. *Proceedings of the 9th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. Amsterdam, the Netherlands. p. 59-64, 1999.
- 30.- Mollet C., Drancourt M. and Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Molecular Microbiol.* 26 (5): 1005-1011, 1997.
- 31.- Mukopadhyay K., Garrison N. K., Hinton D. M., Bacon C. W., Khush G. S., Peck H. D., Datta N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia.* 134:151-159, 1996.
- 32.- Ochse J.J., Soule M.J. Jr., Dijkman M. J. y Wehlburg C. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Volumen I, Edit. Limusa pp. 435-463, México, 1976.

- 33.- Olivares F. L., Baldani V. L. D., Reis V. M., Baldani J. I., Döbereiner J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. Biol. Fertil. Soils. 21:197-200, 1996.
- 34.- Olivares F. L., James E. K., Baldani J. I., Döbereiner J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. New Phytol. 135:723-737, 1997.
- 35.- Patriquin D. G. and Döbereiner J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Can. J. Microbiol. 24: 734-742, 1978.
- 36.- Quispel A. Molecular signals in Plant-Microbe Communications (Verma, D. P. S. ed), pp 471-491, CRC Press.
- 37.- Rajaniemi et.al. Proceedings of the 5<sup>th</sup> European Workshop on the Molecular Biology of cyanobacteria, Stockholm. 2002.
- 38.- Reinhold-Hurek B. and Hurek T. Interactions of Gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other Diazotrophs: Identification, localization and perspectives to study their function. Critical Reviews in Plant Sciences. 17(1): 29-54, 1998.
- 39.- Reinhold - Hurek B. and Hurek T. Life in grasses diazotrophic endophytes. Trends in Microbiology 6 (4): 139 - 144, 1998.
- 40.- Rhodes-Roberts M. The taxonomy of some nitrogen fixing *Bacillus* species with special reference to nitrogen fixation in the aerobic Endospore-forming bacteria. Classification and identification. Edited by R.C.W., Berkeley & M. Goodfellow, London: Academic press. 315 - 335, 1981.

- 41.- Robles Gonzáles M. and Orozco Romero J. Producción de plátano enano gigante mediante la técnica de cultivo de tejidos. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro, Campo Experimental Tecoman. Folleto para productores No. 1, 1-12, 1996.
- 42.- Romero J., Liras P. and Martin J. F. Isolation and biochemical characterization of *Streptomyces clavuligerus* mutants in the biosynthesis of clavulanic acid and cephamycin C. *Appl Microbiol and Biotech*, 27: 510-516, 1999.
- 43.- Sawada H., Ieki H., Oyaizu H. and Matsumoto S. Proposal for rejection of *Agrobacterium tumefaciens* and revised descriptions for the genus *Agrobacterium* and for *Agrobacterium radiobacter* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:694-702, 1993.
- 44.- Schloter M., Wiehe W., Assmus B., Steindl H., Becke H., Hoeflich G. and Hartmann A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2038-2046, 1997.
- 45.- Sevilla M. and Kennedy C. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: Triplett E. W. (Ed), *Nitrogen Fixation in Bacteria: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press, UK, in press.
- 46.- Shatters R. G., Liu Y. and Kahn M. L. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 268: 469-475, 1993.
- 47.- Silva C., Vinuesa P., Eguiarte L. E., Martínez-Romero E. and Souza V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a Traditionally Managed Milpa Plot in Mexico: Population Genetics and Biogeographic Implications. *Appl Environ Microbiol*, 69(2): 884-893, 2003.

- 48.- Spiers A. J., Buckling A. and Rainey P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 146: 2345 - 2350, 2000.
- 49.- Stoltzfus J. R., So R., Malarvizhi P. P., Ladha J. K. and de Bruijn F. J. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil*. 194: 25-36, 1997.
- 50.- Sullivan J. T. and Ronson C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe*-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 5145-5149, 1998.
- 51.- Taboada H., Encarnación S., Vargas M. C., Mora Y., Martínez-Romero E. and Mora J. Glutamine Synthetase II Constitutes a Novel Taxonomic Marker in *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* Species. *Int J Syst Bacteriol*, 46(2): 485-491, 1996.
- 52.- Tan Z., Hurek T., Vinuesa P., Müller P., Ladha J. K. and Reinhold-Hurek B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA Intergenic spacer-targeted PCR. *App. and Environ. Microbiology*, 67: 3655 - 3664, 2001.
- 53.- Triplett E. W. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil*. 186: 29-38, 1996.
- 54.- Turner S. L. and Young W. J. P. The Glutamine Synthetases of Rhizobia: phylogenetics and Evolutionary Implications. *Mol. Biol. Evol.* 17 (2): 309 - 319, 2000.
- 55.- Vermeiren H., Vanderleyden J., Hai W. Colonization and *nifH* expression on rice roots by *Alcaligenes faecalis* A15. In: Malik KA, Mirza MA, Ladha JK, editors. Nitrogen fixation with non-legumes. Dordrecht (Netherlands): Kluwer Academic publishers. p 287-305, 1998.
- 56.- Willems A. and Collins M. D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal DNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:305-313, 1993.

- 57.- Woese C. R. Bacterial Evolution. *Microbial. Rev.* 51: 221-271, 1987.
- 58.- Yanii Y. G., Rizk R. Y., Corich V., Squartini A., Ninke K., Philip-Hollingsworth S., Orgambide G. De Bruijn F., Stoltzfus J., Buckley D., Schmidt T. M., Mateos P. F., Ladha J. K. and Dazzo F. B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant and Soil.* 194: 99-114, 1997.
- 59.- Yanni G. Y., Rizk Y., El-Fattah A. F. K., Squartini A., Corich V., Giacomini A., de Bruijn F., Rademaker J., Maya-Flores J., Ostrom P., Vega-Hernández M., Hollingsworth I. R., Martínez-Molina E., Mateos P., Velásquez E., Wopereis J., Triplett E., Umali-García M., Anarna A. J., Rolfe G. B., Ladha K. J., Hill J., Mujoo R., K. Ng P. and Dazzo B. F. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 1-26, 2001.
- 60.- Yoo I. D., Fujii T., Sano Y., Komagata K., Yoneyama T., Iyama S. and Hirota Y. Dinitrogen Fixation of rice- *Klebsiella* Associations. *Crop Science.* 26: 297-300, 1986.
- 61.- You C. and Zhou F. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Can. J. Microbiol.* 35: 403-408, 1989.

## **A N E X O S**

## METODOLOGIA

Las plantas de plátano con una altura aproximada de 1m fueron muestreadas en el estado de Colima en campos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el Estado de Morelos en huertos familiares. Además se obtuvieron plántulas provenientes de cultivo de tejidos.

Las plantas muestreadas fueron lavadas perfectamente con agua para eliminar residuos de suelo. Una vez lavada la planta fue dividida en los diferentes tejidos como es la hoja, pseudotallo, corno y raíz (para las plántulas de cultivo de tejidos sólo en la parte aérea y subterránea), cada zona fue esterilizada en la superficie, para las plantas provenientes de campo con alcohol al 96% por 10 min., enseguida se lavó perfectamente con agua destilada estéril 5 veces y enseguida se esterilizó con hipoclorito de sodio al 2.4% durante 10 min., finalmente se lavó con agua destilada estéril 5 veces. Las plántulas provenientes de cultivo de tejidos son más sensibles por lo que en este caso se le adicionó alcohol al 96% por 5 min., después se lavó perfectamente por 5 veces con agua destilada estéril y se continuó con hipoclorito de sodio al 2.4% por 2 min., después se lavó con agua destilada estéril 5 veces.

La planta estéril fue macerada en  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  10mM y cada macerado fue inoculado en diferentes medios de cultivo, los cuales fueron utilizados con diferentes fuentes de carbono a distintas concentraciones y diferentes valores de pH (Tabla No.1). De esta manera se obtuvieron distintas morfologías coloniales, las cuales fueron seleccionadas y sembradas sobre placas del mismo medio de cultivo del cual fueron aisladas para su purificación, además los aislados de plantas de plátano de Colima fueron inoculados sobre tubos con medios semisólido libre de nitrógeno. Los tubos con crecimiento bacteriano fueron sembrados nuevamente en las mismas condiciones para su purificación (por tres ocasiones), después fueron sembrados sobre placas de medio de cultivo sólido y de esta manera purificarlos completamente.

Los aislados purificados se agruparon morfológicamente en diferentes medios de cultivo (LGI, LGI 10g de sacarosa y MacConkey). De cada grupo morfológico se seleccionaron aislados representantes que fueron inoculados en viales con medio semisólido libre de nitrógeno (Tabla No. 1) para determinar la reducción de acetileno (ARA), prueba indirecta que permitió conocer si los aislados tienen la capacidad de fijar nitrógeno. En estos aislados, ARA positivos, se observaron distintas morfologías coloniales las cuales fueron separadas en grupos y de estos se seleccionaron representantes que fueron analizados para determinar su posición taxonómica.

## **1.- Pruebas bioquímicas (API 20E)**

Tomar dos colonias aisladas de la cepa en estudio e inocular en tubos con 5 ml. de H<sub>2</sub>O destilada estéril y agitar mezclando perfectamente. Tomar una galería API 20E por cepa y colocar la solución bacteriana previamente preparada en cada una de las celdas (tubo) de la galería, en las pruebas CIT, VP y GEL colocar la solución en el tubo y cúpula. Incubar las galerías a 37°C y leer los resultados a las 24 y 48 horas de incubación.

## **2.- Electroforesis de enzimas multilocus (MLEE)**

### **a) Obtención del Extracto bacteriano**

Inocular en medio de cultivo líquido cada aislado por analizar y crecer durante 24 horas en agitación, cada uno de estos fue centrifugado por 10 min. a 10,000 rpm, el precipitado se resuspende en 500 µl de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 10mM y se coloca en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se le adicionó 50 µl de lisosima por tubo y se agitó manualmente, incubar a temperatura ambiente por 10 min. y conservar a menos 70°C.

### **b) Preparación del gel**

Pesar 12.72 g de almidón y 2.7 g de agarosa, estos colocarlos en un matraz Kitazato y adicionar 90 ml de buffer tris citratos pH=8 (1:30) y agitar rápidamente. 90 ml del tris citratos transferirlos a un matraz Erlenmeyer de 200 ml y calentar hasta ebullición, adicionarlo al matraz Kitazato con la solución almidón-agarosa y agitar perfectamente. Calentar por 50 seg. ésta solución y agitar, después calentar hasta inicio de ebullición y volver a agitar, enseguida calentar y hervir perfectamente, desgasificar, calentar y desgasificar nuevamente para eliminar las burbujas de aire y vaciar la solución a un molde previamente calibrado.

### **c) Electroforesis**

Cortar uno de los extremos del gel (parte superior). Tomar el extracto bacteriano y agitarlo manualmente, cortar pequeños cuadros de papel filtro y tomar uno de ellos para humedecerlo con el extracto, una vez impregnado con este se coloca sobre el extremo cortado del gel. Este proceso se realiza para cada uno de los aislados bacterianos (extracto) por analizar y en los extremos de las muestras colocar el colorante. Con la parte cortada del gel cubrir los pequeños papeles conteniendo el extracto bacteriano (muestras), colocarlo en la cámara de corrimiento la cual contiene tris citratos pH=8 (1:20). Encima del gel colocar un vidrio y sobre este una placa de hielo, correr a 130 volts por 4 horas aproximadamente.

### **d) Revelado de los geles**

Cortar el gel entre las muestras para indicar los carriles donde ha emigrado cada una de ellas, eliminar los pequeños papeles y cortar el gel en 3 capas, lo que permitió revelar 3 enzimas,

una por cada corte (capa). Colocar cada una de las capas en una charola y adicionar la solución con el sustrato de la enzima a revelar. Se observaron pequeñas manchas sobre el gel, lo que nos indicó la distancia de migración de cada una de las cepas analizadas, en cada una de las enzimas probadas. Enseguida se realizó la lectura de cada uno de los aislados en comparación con la cepa de referencia. Con los resultados se realizó el análisis de datos mediante una matriz de coeficientes de distancia genética para obtener el dendrograma respectivo.

### **3.- Extracción de DNA total**

Inocular las cepas en medio líquido y crecer toda la noche. De este cultivo tomar 1 ml. y centrifugar por 2 min. a máxima velocidad, resuspender el precipitado con 300 µl de solución de lisis y calentar a 80°C por 10 min., dejar enfriar perfectamente. Adicionar 5 µl de RNAsa manteniéndolo a 37°C por una hora. Después se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionó 200 µl de solución de precipitación de proteínas, se mezcló manualmente y se centrifugó por 15 min., el sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 ml que contiene 600 µl de isopropanol al 100%. Se centrifuga la solución por 2 min. a máxima velocidad y se observa un precipitado blanco, eliminar el sobrenadante y adicionar 500 µl de etanol al 70% frío, mezclar y centrifugar por 2 min. a máxima velocidad enseguida eliminar por completo el etanol y secar al vacío por 10 min. Hidratar la muestra que contiene el DNA con agua destilada estéril (mq) y calentar a 65°C por una hora para disolver perfectamente el DNA.

### **4.- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) de genes para secuenciación**

En una reacción de 50 µl adicionar: dNTPs 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, oligos 10 pmol, Buffer PCR 10x, Taq polimerasa 0.5 Unidades. En cada reacción adicionar 0.5 µl del DNA respectivo y colocar los tubos de reacción en un termociclador programado con las condiciones de acoplamiento y extensión de acuerdo al oligonucleótido a utilizar, realizándose 35 ciclos de la reacción. Purificar la muestra y prepararla a una concentración de 25 ng/reacción y añadir el primer respectivo para la secuencia.

### **5.- Patrones de restricción (ARDRA)**

Amplificar (PCR) el gen 16S rRNA y mezclar con H<sub>2</sub>O (MQ) destilada estéril, buffer respectivo de la enzima y la enzima de restricción. Adicionar el 10% del buffer y de la enzima con respecto al volumen final de la reacción. Incubar a 37°C por 4 horas y realizar la electroforesis en un gel de agarosa al 3%.

## **6.- Eckhardt (Perfil de plásmidos)**

### **a) Preparación del gel**

Pesar 0.7 gr. de agarosa, adicionar 90 ml de tris boratos 1x (TBE), fundir la agarosa completamente y adicionar 10 ml de SDS al 10% en TBE y vaciar a un molde previamente calibrado.

### **b) Preparación de las muestras**

Inocular las cepas en medio de cultivo líquido y crecer en agitación toda la noche. Posteriormente ajustar la densidad óptica de 0.4 a 0.6 de cada uno de los cultivos. De estos cultivos tomar 100 µl y colocarlos en tubos Eppendorf (previamente colocados en hielo), adicionar a cada tubo 500 µl de sarkosyl 0.3% en TBE frío y agitar ligeramente. Centrifugar por 2 min. a máxima velocidad a temperatura ambiente y decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 20 µl de solución de lisis y descargar en cada pozo del gel previamente preparado

### **c) Electroforesis y tinción del gel**

La electroforesis se realizó primeramente a 5 volts por 20 min., después a 70 volts por 10 horas. El gel se tiñe con bromuro de etidio para su revelado.

## **7.- Transferencia (gel)**

Colocar el gel en una solución de despurinización (HCl 0.25 N) por 15 min. en agitación, después lavar con agua destilada, enseguida adicionarle buffer de desnaturalización (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 N) por 30 min. en agitación y lavar con agua destilada, finalmente adicionar buffer de neutralización (Trisma 0.5 M, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM) por 30 min. en agitación. Después de los lavados colocar la transferencia como sigue: placa de vidrio y encima el gel (invertido), sobre este la membrana de nylon y enseguida papel filtro whatman (3 capas), después las toallas absorbentes y finalmente una placa de vidrio con peso para que se realice la transferencia más eficientemente, manteniéndola de esta manera toda la noche. Secar la membrana a temperatura ambiente y fijarla a 80°C por 2 horas.

## **8.- Hibridación de la membrana**

### **a) Prehibridación**

Colocar las membranas en un tubo de hibridación con 12 ml. de solución de prehibridación (Rapid-hyb buffer) y mantenerlas en el horno a 65°C a un mínimo de 4 hrs.

### **b) Hibridación**

El DNA utilizado como sonda se desnaturalizó a 95°C por 15 min. enseguida se colocó en hielo por 10 min. y se transfirió a una reacción Rediprime al cual se le adicionó 3µl de <sup>32</sup>P, agitar

perfectamente e incubar a 37°C por 10 min. Posteriormente detener la reacción calentando a 95°C por 5 min., después enfriar en hielo. Pasar la sonda marcada al tubo de hibridación que contiene la membrana manteniéndolo a 65°C por 15 hrs. aproximadamente.

c) Lavados de la membrana

Preparar una solución de SSC más SDS al 10% a diferentes concentraciones (2x, 1x, 0.5x, 0.1x,) dependiendo de la astringencia a manejar. Realizar el primer lavado con solución SSC 2x por 10 min. en agitación, enseguida checar el grado de <sup>32</sup>P radioactivo sobre la membrana (contador de radioactividad) y realizar el mismo proceso con las diferentes soluciones a utilizar, en algunas ocasiones se realizó el lavado a 65°C (alta astringencia), el último lavado se llevó a cabo con la solución SSC 2x sin adicionar SDS en agitación por 10 min. Posteriormente se coloca la membrana a 65°C por 1 hr. para el secado de la misma.

d) Exposición y revelado

Colocar la membrana en un casete de exposición, encima de ésta una película (film) para diagnóstico Kodak (cuarto oscuro) y dejar exponiendo (el tiempo depende del tipo de hibridación realizada). Revelar el film utilizando revelador y fijador así como agua para lavado de la misma.

Tabla 1.- Medios de cultivo para el aislamiento de bacterias endófitas de planta de plátano (*Musa spp.*)

Medio	Componentes	Cantidad /l	pH	Referencias
LGI 100 g <sup>b,c</sup> LGI 10 g <sup>b,c</sup>	Azúcar o sacarosa <sup>a</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O Extracto de levadura Azul de bromotimol 1.0% Verde de bromocresol 0.8 %	100 g o 10 g 0.2 g 0.6 g 0.2 g 0.02 g 0.002 g 0.01 g 0.05 g 2 ml 1 ml	5.5	Cavalcante <i>et al</i> , 1988
Azo <sup>b,c</sup>	Glucosa CaCO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O Azul de bromotimol 1.0 %	10 g 5 g 0.1 g 0.1 g 0.9 g 5 mg 10 mg 1 ml	----	Reinhold-Hurek <i>et al</i> , 1993
Rojo congo <sup>b,c</sup>	Acido málico KOH K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O NaCl FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O Extracto de levadura Rojo congo 0.25 %	5 g 4.8 g 0.5 g 0.2 g 0.1 g 0.01 g 0.05 g 15 ml	6.8- 7	Rodríguez-Cáceres, 1982
Extracto de planta <sup>b,c</sup>	Sacarosa K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O Extracto de levadura *Extracto de planta Azul de bromotimol 1.0%	10 g 0.2 g 0.6 g 0.2 g 0.02 g 0.002 g 0.01 g 0.05 g 10 ml 2 ml	6.2	Presente trabajo

Medio	Componentes	Cantidad /l	pH	Referencias
NFb <sup>c</sup>	Acido málico	5 g	6.8	Döbereiner et. al., 1976
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g		
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2 g		
	NaCl	0.1 g		
	CaCl <sub>2</sub>	0.02 g		
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.002 g		
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.1 g		
	KOH	4.8 g		
	FeSO <sub>4</sub>	0.5 g		
	Azul de bromotimol 1.0%	2 ml		

<sup>a</sup> 100 g de azúcar para LGI 100 g y 10 g de sacarosa para LGI 10 g.

<sup>b</sup> Medio sólido para usar 14 g/l de agar

<sup>c</sup> Medio semisólido con 2.3 g/l de agar (para la prueba de reducción de acetileno) sin extracto de levadura.

\* Extracto de planta de plátano.