

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Caracterización de la simbiosis entre árbol de leguminosa *Erythrina americana* (Colorín) y su simbiote.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
**PRESENTA**

Lira Facundo Ma. Concepción

No DE CTA.: 9106089-1

AÑO DE TÉRMINO DE LA CARRERA: 2001

ORIENTACIÓN: Bioquímica Clínica

AREA ESPECÍFICA DEL PROYECTO: Ecología Microbiana

DIRECTOR: Dr. En Tao Wang Hu

NOMBRE DEL ASESOR: Q.F.B José Oscar González Moreno

LUGAR DONDE SE DESARROLLA: I.P.N. Escuela Superior de Ciencias Biológicas.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# I. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer ante todo a Dios por permitirme terminar con lo que empecé, que ha sido una de mis metas, pero sobre todo, por darme la familia que me dio ya que sin ellos esto no hubiese sido posible.

Gracias a ti **mamuchis**, por tu infinito amor y dedicación, por darme fuerza para seguir adelante, este esfuerzo es tuyo, por tu apoyo y motivación GRACIAS.

Gracias **Don Lira** por la seguridad que siempre ha mostrado, me enseñó a pensar que puedo hacer todo lo que me propongo.

Gracias **César** por siempre estar ahí, al pendiente, observando las necesidades de los demás, anteponiendo las tuyas y en muchas ocasiones sin ser valoradas.

Gracias **Susy** más que una hermana, para mí has sido mi amiga, mi confidente y mi guía, siempre dispuesta a escucharme y aconsejarme, mucho de lo que soy te lo debo a ti, por estar cuando más te necesite, no sabes cuanto te amo.

Gracias **Angel** por la fortaleza y jovialidad que siempre muestras, siempre has tenido una sonrisa cuando la necesito, te admiro porque siempre has salido adelante sin importar las pruebas que se te presentes, tu fuerza me enseña que todo es posible siempre y cuando en verdad lo deseas.

Como no agradecerte a ti mi **kika** si eres mi cómplice, has estado a mi lado en todos mis momentos felices y difíciles, como una extensión de mí misma nunca terminaré de agradecerte.

Gracias **Mena** y **Dany** mis bebés, son mi motor, mi motivo de vivir GRACIAS porque sacrifiqué su tiempo por lograr esta meta.

Gracias **Juan** por tu gran apoyo e infinito amor que es correspondido, este logro es tan tuyo como mío, porque desde que caminas a mi lado siento tu apoyo, tu comprensión.

Gracias **Doctor En Tao** porque aún sin conocerme me tendió su mano y me apoyó por ser el que impulsó que culminó esta meta.

GRACIAS A MIS PROFESORES Y SINODALES EN ESPECIAL AL **QFB OSCARGONZALEZ** POR SU INVALUABLE AYUDA Y GUÍA.

## INDICE

<b>I. Agradecimientos</b>	2
<b>II. Resumen</b>	4
<b>III. Introducción</b>	5
<b>IV. Planteamiento del problema</b>	19
<b>V. Objetivos</b>	20
<b>VI. Hipótesis</b>	21
<b>VII. Materiales y métodos</b>	
1. Muestreo	22
2. Caracterización del suelo	23
a) pH	23
b) Humedad	24
c) Textura	25
3. Obtención del nódulo	26
4. Aislamiento	28
5. Caracterización	29
<b>VIII. Resultados</b>	
1. Caracterización de suelos	31
2. Extracción y aislamiento	31
3. Caracterización fenotípica	33
4. Análisis de Agrupación	41
<b>IX. Discusión de Resultados</b>	48
<b>X. Conclusiones</b>	50
<b>XI. Bibliografía</b>	51

## I. RESUMEN.

Se sabe que en el suelo rizosférico existen un gran número de microorganismos presentes de forma natural los cuales pueden formar asociaciones simbióticas con las plantas con las que se encuentran en contacto, dichas asociaciones dependen de la especificidad del microorganismo hacia determinada planta como es el caso de los microorganismos que pertenecen a la familia Rhizobiacea con plantas leguminosas como es el caso del Colorín, en la simbiosis entre planta y microorganismo se ven beneficiados tanto la planta (huésped) como el microorganismo (simbiónte) ya que el simbiote provee de sustratos necesarios para el desarrollo de la planta y ésta a su vez provee de alimento y refugio al simbiote.

En México existe un gran número de leguminosas las cuales forman parte de la vida cotidiana de los mexicanos, ya que se utilizan de manera común entre la población, en el caso de el colorín, éste se emplea desde la fabricación de utensilios y juguetes, como medicina tradicional o como alimento, sin embargo no existe algún que aporte información sobre los microorganismos presentes en dicha simbiosis.

El presente trabajo pretende reconocer el principal género de microorganismo (s) que participa en dicha simbiosis y si este varía dependiendo de el lugar donde crece el colorín, para esto se muestreo suelo de diferentes lugares:

Se recolectó suelo de el estado de Morelos que es el centro de diversificación del colorín, y del Distrito Federal así como de el estado de México que son lugares donde el Colorín crece como planta introducida.

Una vez recolectadas las muestras se crecieron en el laboratorio plantas de colorín, se extrajeron sus nódulos de los cuales se aislaron las bacterias presentes y se caracterizó fenotípicamente y se agruparon de acuerdo a sus características de crecimiento.

# I. INTRODUCCIÓN

Una de las interacciones más interesantes y destacadas entre las bacterias y las plantas son las que se dan entre las leguminosas y los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* (Trinick and Galbraith, 1976).

Dentro del nódulo, las bacterias fijadoras convierten el nitrógeno atmosférico en amoníaco, compuesto que proporciona el nitrógeno necesario para el crecimiento de la planta y de las bacterias. La fijación de nitrógeno en los nódulos de las plantas es de extrema importancia para mantener la fertilidad del suelo. En la práctica agrícola se utiliza para aumentar la producción de las cosechas.

El árbol de leguminosa *Erythrina americana* (Colorín) es una especie con múltiples usos entre los que se encuentran: el uso de su madera para la fabricación de juguetes, las flores se consumen como alimento en algunas comunidades, uso medicinal, entre otras. Además de que se encuentra ampliamente distribuido en México; sin embargo es importante hacer notar que hasta la fecha, no se encuentra información sobre la simbiosis del colorín y las bacterias presentes en el suelo. Con la consideración de su importancia ecológica y económica, además de tratarse de una planta nativa de México, se decidió hacer una investigación sobre la simbiosis del colorín en distintas zonas de México, Cuernavaca y el área metropolitana de la ciudad de México.

Considerando el gran número de leguminosas en distintos ecosistemas, la diversidad bacteriana no se conoce muy bien y se necesitan más investigaciones para mejorar el conocimiento sobre esas bacterias. México tiene muchas leguminosas nativas que son importantes recursos biológicos, pero su nodulación de algunas de ellas aún no se ha investigado, el colorín es una de ellas. La investigación sobre las bacterias simbiotes del colorín en Cuernavaca y en el área metropolitana puede ofrecer las características de los microorganismos

simbiontes de dicha planta, también puede ser útil para entender los efectos de los factores ambientales sobre el sistema simbiótico analizado.

Mucho se ha investigado sobre la simbiosis leguminosa-rhizobio, que es, sin lugar a dudas, una de las asociaciones más eficientes entre el reino vegetal y los microorganismos. Los esfuerzos encaminados a caracterizar y clasificar las bacterias responsables de los procesos de fijación simbiótica del nitrógeno en leguminosas, no siempre se han visto coronados por el éxito. La carencia de equipos y tecnologías adecuadas para estos fines limitaron enormemente a los científicos en épocas pasadas.

A finales del siglo XVI, Dalechamps representó gráficamente abundantes nódulos en raíces de *Ornithopodium tuberosum* (Martínez-Viera, 1986) y en los siglos posteriores, científicos como Malpighi (siglo XVIII) y Ward (siglo XIX) llamaron la atención sobre estas formaciones radiculares pero sin poder dar una explicación real a este fenómeno. Schroeter en 1886 (citado por Drouin et al., 1996) presentó su propuesta de denominar como *Phytomyxa* a los organismos causantes de las formaciones nodulares. Sólo los estudios clásicos de Hellriegel y Wilfarth (1888) por primera vez establecieron claramente que eran microbios los que, en los nódulos radiculares, permitían a las leguminosas obtener nitrógeno atmosférico mientras que otras plantas no podían.

En 1890, Beijerinck aisló y cultivó exitosamente la bacteria a partir de nódulos, denominándola *Bacillus radicola*, casi al mismo tiempo, Frank (1889) la había denominado *Rhizobium leguminosarum*, nombre que se mantiene actualmente (Young yHaukka, 1996; Sprent, 2001).

Fred et al. (1932) editaron un libro acerca de los rizobios, donde se hace una revisión exhaustiva de los conocimientos existentes y propusieron una nomenclatura basada en las características fisiobioquímicas de estas bacterias, que prácticamente no admitió cambios hasta 1982. Ellos reconocieron 6 especies: *Rhizobium leguminosarum*, causante de nodulación en los géneros *Lathyrus*,

Pisum, Vicia y Lens; *Rhizobium trifolii* en *Trifolium*; *Rhizobium phaseoli* en *Phaseolus*; *Rhizobium meliloti* en *Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*; *Rhizobium japonicum* en *Glycine max* y *Rhizobium lupin* en *Lupinus*.

A partir de la segunda década del siglo XX, se propuso por Dangeard (1926) el género *Sinorhizobium*, segregado a partir de subgrupos de *Rhizobium meliloti* con características fisiológicas que lo distinguen claramente. Más tarde, se descubre a *Sinorhizobium fredii* (1984) el cual puede formar nódulos efectivos en *Glycine max*, *Vigna unguiculata* y *Cajanus cajan*, aunque algunas cepas no nodulan efectivamente la soya, constituyendo una estrecha base genética. (Young, 1996).

El género *Mesorhizobium*, como su nombre lo indica, agrupa aquellas especies que crecen en un rango intermedio entre *Rhizobium* (rápido crecimiento) y *Bradyrhizobium* (lento crecimiento) aunque esto no constituye una regla inviolable (Young, 1996). Por primera vez, Jarvis et al. (1982) propusieron la especie *Mesorhizobium loti*, la cual provoca nódulos efectivos en *Lotus*, *Lupinus* y *Anthyllis*. Los genes de nodulación y de fijación del nitrógeno se encuentran usualmente en los cromosomas de esta especie.

La investigación avanzó y se descubrió que en todos los casos, para que haya nodulación, debe establecerse una simbiosis entre las leguminosas y rhizobios específicos para cada especie de leguminosas. Se denomina simbiosis a la asociación entre dos seres vivos con dependencia fisiológica estricta entre uno y otro.

La familia de las leguminosas es una de las más extensas y diversificadas. Son Angiospermas del orden Rosales y se dividen en tres subfamilias: Mimosoideas, Caesalpinoideas y Papilonoideas. Una característica importante es su capacidad de establecer simbiosis con bacterias del grupo *Rhizobium*., en estas tres subfamilias, el porcentaje de especies que nodulan son bastante diferentes. Se ha confirmado la nodulación radicular en 520 especies de árboles y arbustos,

pertenecientes a las subfamilias Mimosoideae (321 especies), Papilionoideae (173 especies) y Caesalpinioideae (26 especies) (Marugán Hernández, 1999).

Las especies de Parasponia en la familia Ulmaceae forman nódulos que fijan nitrógeno en la legumbre con una variedad de cepas del rhizobio que también nodulan otras legumbres. Las plantas leguminosas son muy diversas en la morfología, en hábitat, y ecología, yendo desde los anuarios de Ártico a los árboles tropicales, (de Faria et al., 1989), la simbiosis con el rhizobio no es al parecer una adaptación a un nicho ecológico especializado, más bien, depende en un poco de peculiaridad genética de leguminosas (Spaink et al., 1991).



Fig. 1 *Erythrina americana* <http://www.arbolesornamentales.com/Erythrina.htm>.

*Erythrina americana* Millar (Fig. 1) es un árbol que naturalmente se ubica entre los 1180 y 1900 m sobre el nivel del mar y se ha introducido a otros países o zonas como planta ornamental. Tiene varios nombres comunes que se usan en diferentes zonas: cáscara de chompantle, chocolín, colorín grande, equimite, pichoco, pito, piñón espinoso, quimite, patol, tusavi mixteco, parensuri, puregue, zompantli, náhuatl, laktnga, totonaco, pemoch, tenek. En China, se llama “Xiangyahong” (diente roja de elefante) por la forma de su flor. El árbol de colorín se considera como una planta cultivada en huertos familiares o solares, cerca de ríos o terrenos de viga o cultivos abandonados, este árbol se asocia a un bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo y de bosque encino.



**Fig. 2.** Foto de flores (A) y frutos (B) de *E. americana*. ([http://www.arboles.org/paginas/erythrina\\_americana.html](http://www.arboles.org/paginas/erythrina_americana.html))

El colorín es un árbol de 3 a 10 m de altura, de ramas espinosas, sus hojas están divididas, son de coloración verde pálido y tienen grupos de flores rojas como arillos. Su floración y fructificación se presenta en los meses de Marzo a Abril. Las hojas son de tamaño grande, trifoliadas y con muchas espinas, largamente pecioladas y alternadas entre si, con 3 folíolos 3 anchos y 3 grandes, en el cual el central es el mas grande que los laterales, hasta 14cm de longitud y 13 cm. de ancho. Las flores son en racimos piramidales, terminales de una coloración roja

muy llamativa, alargada, zigomorfa, apretadamente dispuestas. Sus frutos son unas vainas comprimidas y contraídas entre semilla y semilla de coloración rojo escarlata con una línea negra.

Sin duda alguna resulta ser el colorín o zompantle una de nuestras plantas mexicanas mas reconocida, no solo por sus propiedades medicinales, si no como un gran y degustador sabor para el paladar, debido a sus flores que utilizan hoy en día en la preparación de platillos del arte culinario. La capacidad tóxica de sus semillas, amerita el máximo de cuidados en su manejo medicinal.

### **Usos tradicionales**

El zompantle o colorin presenta varios usos por nuestros hierberos y curanderos tradicionales, como los siguientes:

Medicinal: la semilla molida cura el dolor de muelas, presenta propiedades narcóticas, sus hojas en una infusión se utilizan para aliviar las molestias de la erisipela, actuando también como antipirético, antivaricoso, hipnótico y sedante. Tan bien se utiliza como controlador de convulsiones tónico clónicas, y en la medicación preanestésica ya que permite relajar la pared muscular abdominal y de esta manera facilitar el trabajo de la cirugía.

Si se hierve un trozo de la corteza se puede aplicar en forma de vaporizaciones para el dolor de las muelas, en la mejilla, la decocción de la corteza si se le agrega un trozo de raíz de raspa y se bebe como agua de tiempo ayuda a hemorragias vaginales anormales, así la misma cocción de la corteza pero con raíz de zapote prieto, flores de azahar y lima real bebiéndose como agua de uso ayuda al insomnio, también coadyuva al mal de orín, mal de ojo, y para la infertilidad en la mujer.

Otros usos: Se usa en la agricultura como cerca viva y en algunas regiones se cultiva como planta de sombra sobre todo en plantaciones de cacao y café; como planta ornamental, en parques y jardines; y como materia de artesanías, por su fácil acceso y manejo, la madera es muy utilizada en la elaboración de artesanías mexicanas, en Guerrero se elaboran mascararas para las principales danzas de fiestas religiosas de los santos patronos del pueblo, también en Michoacán, y Oaxaca, entre otros Estados con grandes tradiciones, además se elaboran cucharas, fruteros, y figuras de animales policromadas.

Toxicidad: Se conoce que esta planta tiene acciones toxicas, producidas por la presencia en la planta, principalmente en las semillas y luego en la corteza y las hojas de una serie de compuestos tóxicos. Los principales síntomas tóxicos que se han reportado por el consumo de esta planta son la paralización de los músculos esqueléticos, inhibición en la transmisión de los impulsos nerviosos, dilatación de la pupila, trastornos visuales, hipotensión arterial y parálisis respiratoria.

Este tipo de efectos son a causa de uno de los alcaloides según estudios muy parecido al de la d-tubocuranina (curare); es por eso que se presentaron en algunos individuos tetanización y semiparálisis bajo los efectos del alcaloide y una sobredosis de este, producirá una parálisis muscular afectando primero a los músculos mas finos, como lo son: los músculos peri orbitales y por último a los músculos respiratorios (como el diafragma) y provocar muerte por asfixia.

Se reportó hace muchos años que colorín es una leguminosa nodulada por los rizobios (Allen & Allen 1981). Pero no hubo ningún estudio taxonómico sobre sus bacterias simbióticas. Solo Parker (2001) reportó 6 cepas aisladas de *Bradyrhizobium* de especies crecidas en Costa Rica, incluyendo *Erythrina costaricensis*. Estas 6 cepas se dividieron en 3 ETs (electrophoretic types) juntos con otras cepas aisladas de *Clitoria javitensis*, *Desmodium axillare* y *Rhynchosia pyramidalis* y se relacionaron a *B. japonicum* en filogenia del gen rRNA 16S. Otro trabajo relacionado es que se reportó la nodulación de unas cepas de *Sinorhizobium fredii*, microsimbiontes de soya, en las especies *E. variegata* y *E. vespertilio* (Bellato y col., 1997; Krishnan y Pueppke, 1994).

A partir de 1980's, Chen y col. (1988) reportaron el tercer género, *Sinorhizobium* para los rizobios que nodulan soya, pero crecen rápidamente. Después del estudio de secuencias de rRNA 16S, se amplió este género a la especie de *Rhizobium meliloti* (Dangeard 1926) y otras especies nuevas. Los reportes de las especies nuevas de rizobios estimaron más investigaciones de estas bacterias y diferentes métodos se usaron en estudios taxonómicos de estas bacterias.

Hasta la fecha, se reportaron casi 50 especies de bacterias simbióticas en los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Blastobacter*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* en clase Alfaproteobacteria, y *Burkholderia* y *Ralstonia* en Betaproteobacteria. Todos los rizobios reportados son bacilos, algunas veces pleomorficos, Gram negativos, aerobios, no forman esporas, móviles por flagelos peritricos, polares o un solo flagelo lateral o polar (FAO, 1995). Pertenecen a varias familias, incluyendo Rhizobiacea. Los rizobios son comunes en el suelo, su temperatura óptima de crecimiento en condiciones artificiales es de 25°C y su rango de pH para crecer es de 4 a 11. Aunque la investigación sobre la diversidad de rizobios ya se avanzó mucho, las especies y

los géneros definidos no son muchos, en comparación con el gran número de las leguminosas y sus diversas distribuciones.

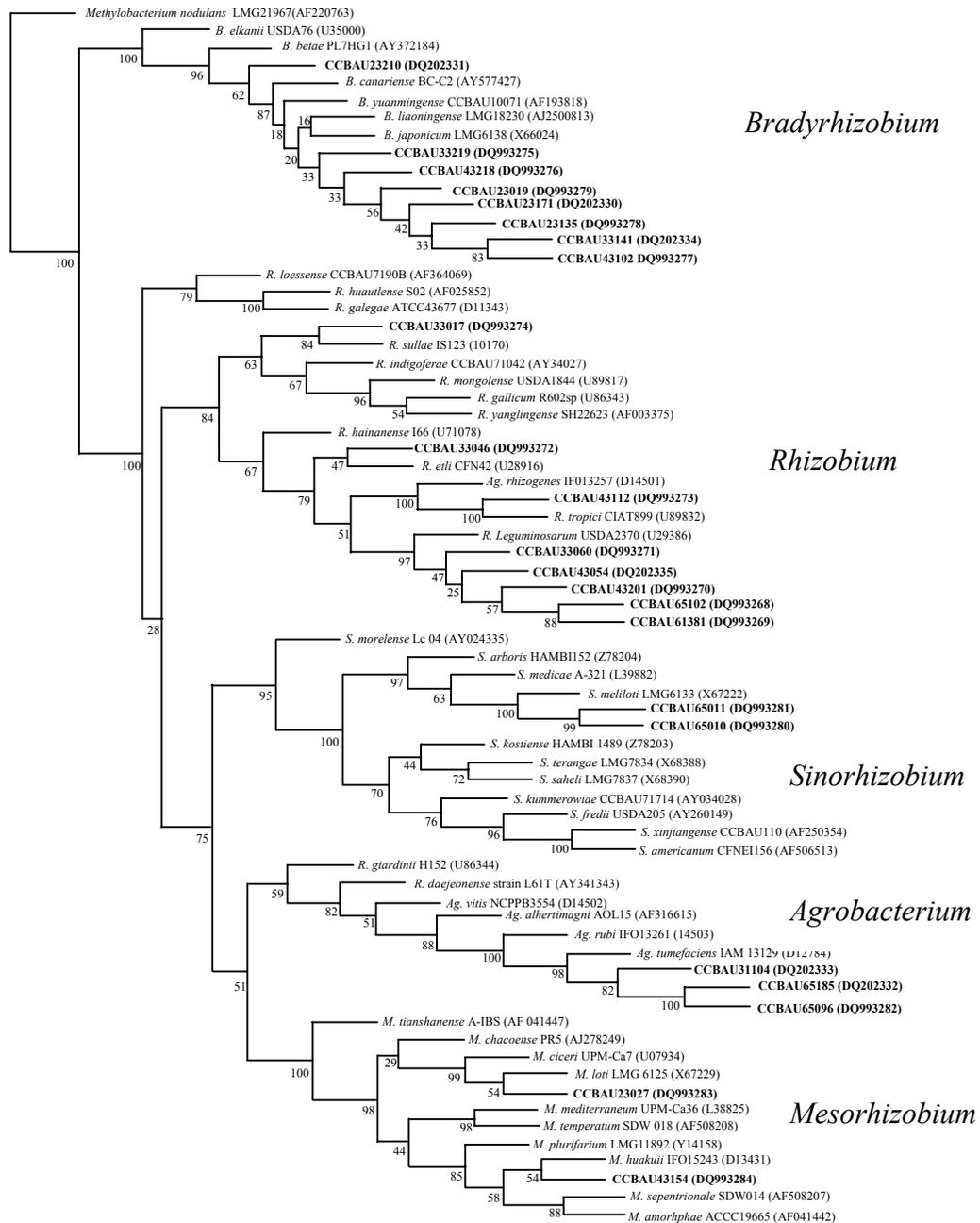
La asociación que se establece entre leguminosas y rizobios cobra gran importancia, donde los rizobios realizan la fijación del nitrógeno atmosférico a compuestos utilizables por la planta. En los últimos años el aislamiento de los rizobios asociados a leguminosas ha revelado una diversidad mucho mayor de la esperada, que refleja la complejidad de los ecosistemas naturales. Por otra parte, aunque una característica importante de la simbiosis rizobios-leguminosas es su especificidad, existen distintos grados de promiscuidad simbiótica dependiendo de las especies consideradas. En este sentido, las leguminosas altamente promiscuas parecen poseer una gran capacidad de ser colonizadas.

En condiciones de baja concentración de nitrógeno, las plantas leguminosas pueden formar los nódulos en la raíz, en que los rizobios se organizan el intracelularmente. Allí ellos encuentran las condiciones apropiadas por reducir el nitrógeno atmosférico a amoníaco (Geurts y Bisseling, 2002).

Los tres géneros de rizobia, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* durante muchos años se agruparon con el *Agrobacteria* y *Phyllobacteria* en una familia, la *Rhizobiaceae* (Jordan, 1984), el uso de métodos modernos, como la taxonomía numérica, la hibridación nucleica ácida, y el análisis 16S del rRNA, ha demostrado la existencia de la diversidad genética marcada dentro de esta familia (Young et al., 1991). Estos géneros se definieron principalmente por la filogenia del gen rRNA 16S (Fig. 3). Y la definición de especies se realiza por método polifásico “polyphasic approach”, incluyendo caracterización fenotípica, geonómica y filogenética (Tabla 1).

Tabla 1. Algunos métodos usados frecuentemente en estudios de taxonomía y diversidad de rhizobios

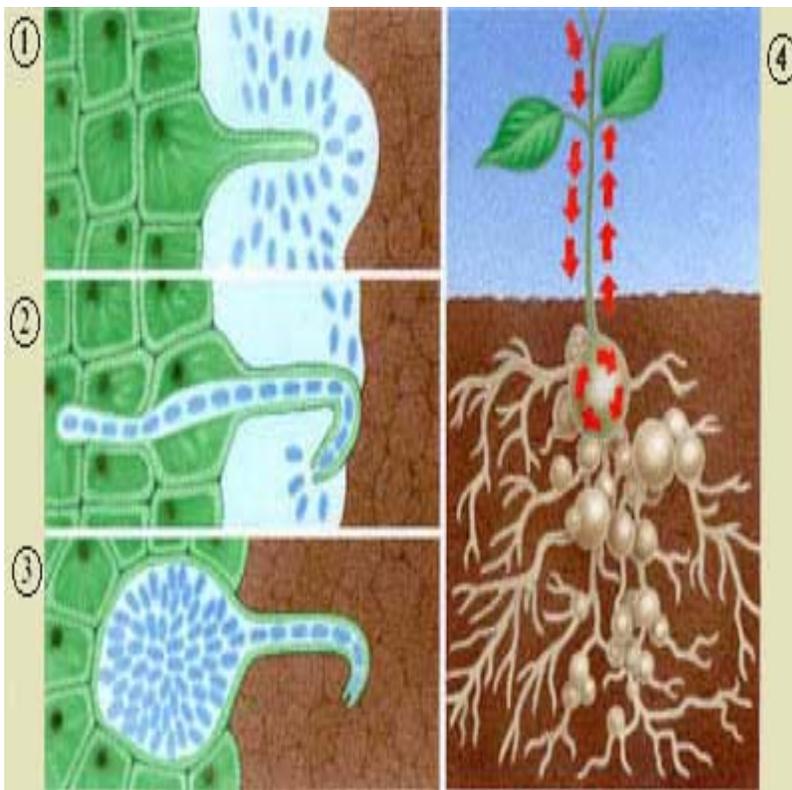
Método	Análisis de	Define
Taxonomía numérica	Características fenotípicas	Especie y diversidad fenotípica
MLEE (multilocus enzyme electrophoresis)	Enzimas metabólicas	Especie y diversidad genética
Hibridación de DNA total	Similitud del genoma entre dos cepas	Especie
RFLP y secuenciación del IGS ribosomal	Filogenia del fragmento DNA evolucionado rápidamente	Especie y diversidad genómica
RFLP y secuenciación del gen rRNA 16S basado a PCR	Filogenia del gen reservado	Género y rangos taxonómicos arriba del género
Rep-PCR (Eric-PCR, BOX-PCR)	Características del cromosoma	Diversidad en población
SDS-PAGE de proteínas	Características proteomicas	Especie y diversidad genética
Inoculación de plantas	Característica simbiótica	Rango de huéspedes
RFLP y secuenciación del gen nifH	Característica del gen simbiótico conservado	Género o especie
RFLP y secuenciación del gen nodA, nodC o nodD	Característica de genes simbióticos más variables	Especie y cepas, rango de huéspedes



**Fig. 3.** Definición de géneros de rhizobios por la filogenia de los genes rRNA 16S (citado de Liu y col. 2006, Comunicación personal)

La rizosfera es la zona del suelo que está modificada por la presencia y actividad de las raíces de las plantas. En ella se establece un microclima cuyas condiciones están alteradas por la presencia de estas raíces. Así, por ejemplo, se produce un cambio en la composición química del suelo debido a exudados radiculares, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, factores de crecimiento, nucleótidos, flavonoides y enzimas, que pueden suponer hasta un 20 % del fotosintato de la planta, siendo la exudación mayor en los ápices radiculares. Algunos de los compuestos exudados que aparecen en la rizosfera no sólo son utilizados por los microorganismos como nutrientes sino que además tienen gran importancia en la atracción de microorganismos hacia la raíz. La rizosfera es fundamentalmente heterogénea, existiendo zonas más o menos ricas en determinados compuestos y está condicionada por diversos factores como son el tipo de planta, edad de la raíz y tipo de suelo. Es precisamente en la rizosfera donde tiene lugar el inicio de la interacción Rhizobium – Leguminosa que dará lugar a la formación de nódulos radiculares.

Esta asociación, que conecta la capacidad fotosintética de la planta con la capacidad de las bacterias de reducir el nitrógeno atmosférico, es el resultado de un complejo proceso de desarrollo que requiere la expresión coordinada en el espacio y en el tiempo de un gran número de genes, tanto de la planta como de la bacteria. La simbiosis es altamente específica, y su establecimiento comienza por un intercambio de señales químicas entre ambas partes (Downie, 1994) que permite el reconocimiento e invasión de la leguminosa hospedadora apropiada por el rhizobio, seguido por la proliferación y diferenciación de una estructura altamente especializada denominada “nódulo”. Estos nódulos están localizados en las raíces, salvo en el caso de *Azorhizobium* que también es capaz de inducir nódulos en los tallos. En su interior, las bacterias, transformadas en bacteroides, como se denomina la forma simbiótica de los rhizobios, fijan nitrógeno, para lo cual reciben fuentes de carbono y energía suministradas por la planta. Figura 4



- 1 Los rhizobios se multiplican en la rizosfera e invaden los pelos radicales.
- 2 Luego, forman un hilo de infección hacia el interior de la raíz.
- 3 Ciertas células de la raíz y los rhizobios se multiplican y forman un nódulo..
- 4 Los rhizobios dentro de los nódulos se transforman en bacteroides, forma en la que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico.

Fig. 4 Esquema representativo de la simbiosis entre rhizobio y leguminosa (Martínez-Viera, 1986)

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consiste en la reducción de  $N_2$  a  $NH_4^+$ , por la enzima nitrogenasa, es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la biosfera. Curiosamente, este proceso crucial solo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, y todos ellos son procariontes y solo se observa cuando la bacteria reconoce a su hospedero, lo coloniza a través de los pelos radicales para que en la matriz de las células corticales induzca una meiosis y mitosis acelerada que da lugar a un tejido hipertrofiado denominado nódulo en el sistema radical de la leguminosa, Rhizobium ha perdido su pared celular y se ha transformado en un bacteroide, mientras que por la enzima llamada nitrogenasa fija el  $N_2$  y lo convierte en amonio.

Se considera que la fijación biológica del nitrógeno (FBN) es una de las alternativas más viables para recuperar  $N_2$  en el ecosistema (Kimball, 1980), se ha estimado que 175 millones de toneladas/año se fijan biológicamente, del cual el 70% va al suelo (Burity et al., 1989) y de éste, el 50% proviene de asociaciones nodulares como las causadas por *Rhizobium* (Carrera et al., 2004; Long, 1989).

La FBN es una ventaja para las leguminosas ya que pueden tomar nitrógeno del aire a través de la simbiosis con *Rhizobium* (Luna y Sánchez-Yáñez, 1991; Sanaratne et al., 1987). Esta es una manera de reducir la cantidad del N derivado de fertilizantes al incrementar la proporción de  $N_2$  fijado vía *Rhizobium*. Por eso se asegura el máximo beneficio de la asociación mediante el establecimiento de una bacteria que reúna cualidades de competencia y efectividad para fijar  $N_2$  en las raíces de la leguminosa. En los suelos agrícolas la asociación *Rhizobium*-leguminosa es la más importante fuente de  $N_2$ , pues se ha reportado que en las leguminosas noduladas, bajo determinadas condiciones ambientales (suelos pobres en este elemento), pueden fijar hasta los 100 kg  $N_2$ /Ha/año (FAO, 1995). Este mecanismo provee la demanda del  $N_2$  para satisfacer las necesidades nutricionales más importantes de la planta.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México la planta *Erythrina americana* se encuentra ampliamente distribuida siendo en el estado de Morelos donde se desarrolla mejor, aunque este árbol tiene múltiples usos dentro de los cuales se encuentra el consumo humano y medicinal, en algunas comunidades; el completo desconocimiento de las especies bacterianas implicada en la simbiosis con dicha planta es notable, ya que no se encuentra reportado algún estudio que revise la diversidad bacteriana que presenta este árbol en sus nódulos.

El presente trabajo es el primer estudio que investiga cual es el género principal en la simbiosis mediante la caracterización fenotípica de las bacterias simblontes de ésta especie de árbol nativo en México, además de conocer si la zona donde crece el árbol tiene relación con el simbiote encontrado.

Considerando el gran número de leguminosas en distintos ecosistemas, la diversidad bacteriana no se conoce muy bien y se necesitan más investigaciones para mejorar el conocimiento de esas bacterias. México tiene muchas leguminosas nativas que son importantes recursos biológicos, pero su nodulación de algunas de ellas aún no se ha investigado, el colorín es una de ellas, la investigación de su simbiosis puede ofrecer las características de dichos microorganismos simblontes de esa planta, también puede ser útil para entender los efectos de los factores ambientales sobre el sistema simbiótico analizado.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL.**

- Encontrar el principal simbiote bacteriano en el árbol de Colorín.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Cultivar plantas de Colorín en el laboratorio con el fin de obtener las bacterias presentes en sus nódulos.
- Caracterizar fenotípicamente la simbiosis entre el árbol de leguminosa *Erythrina americana* (colorín) y su simbiote bacteriano utilizando muestras de suelo obtenidas del Estado de México, Morelos y en el Distrito Federal e investigar sus efectos sobre el crecimiento del árbol mencionado.

#### **VI. HIPÓTESIS.**

Si se obtienen las bacterias presentes en los nódulos de las plantas de *Erythrina americana*, entonces se podrá conocer el género de las bacteria(s) simbiote(s) mediante caracterización fenotípica.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Muestreo.

#### Materiales

Bolsas plásticas negras con capacidad de 1 kg.

Guantes

Pala de jardinería

#### Método

Se reportó que el centro de diversificación de una leguminosa tiene diversos rhizobios asociados a esta planta y los rhizobios en las zonas donde la leguminosa es introducida pueden ser diferentes que los en el lugar de origen de la planta, como se evidencio en los rhizobios de frijol (Gaworzewska, E. T 1982).

Considerando que Morelos es el centro de diversificación de colorín y el Metropolitano (México D. F. y estado de México) es la zona donde colorín se cultiva como planta introducida, se escogió suelos rizosféricos de colorín en ambas zonas; en cada zona, se tomaron 5 a 6 muestras de suelo, en el mismo lugar, también se tomaron semillas y plántulas de colorín con suelo y nódulo en el momento de muestreo.

Las muestras de suelos y plántulas se guardarán en bolsas plásticas de color negro para transportar a laboratorio.

En laboratorio, las plántulas muestreadas se crecieron en la bolsa hasta hacer aislamiento de las bacterias.

- Se utilizaron suelos obtenidos de Cuernavaca, Ciudad de México (Periferia de la escuela) y Edo. México (Ixtapaluca) para inocular las semillas.
- Tomar de cada tipo de suelo 7 muestras, de éstas se utilizara 1g para sembrar por triplicado las semillas germinadas de cada grupo.

## 2. Caracterización de suelo.

Las muestras de suelo se analizaron sobre su pH, humedad y contenido de materiales orgánicos y nutrientes, por métodos recomendados. Para determinar la humedad y el pH del suelo se usaron los métodos de Lemos et al. (2002).

### a)pH

#### Materiales

Balanza de dos platos

Potenciómetro

Espátula

Pipetas graduadas de 5 mL

Vasos de precipitado 50 mL

Varilla de vidrio (para agitar)

Solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01M

#### Método

- 1) Pesar 5 gramos de suelo y se añadió 5 ml de solución de  $\text{CaCl}_2$  0.01M, se agito para homogenizar y se dejar que sedimente.
- 2) Con el sobrenadante medir el pH en el potenciómetro.

## **b) Humedad**

### Materiales

Horno

Desecador

Balanza analítica

Cajas petri

pinzas

### Método

- 1.- Poner a peso constante una caja de petri de vidrio en un horno a 180°C durante dos horas.
- 2.- Pasar la caja de petri a un desecador y dejar enfriar, para posteriormente pesar.
- 3.- Pesar 10 gramos de la muestra de suelo tamizada en la caja de petri a peso constante.
- 4.- Secar el sistema en un horno a 60°C hasta peso constante ( Aproximadamente 24 horas).
- 5.- Una vez alcanzado el peso constante, pasar el sistema a un desecador y dejar enfriar.
- 6.- Pesar nuevamente el sistema.
- 7.- Calcular el porcentaje de humedad de la muestra de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = [ (P_i - P_f) / 10 ] \times 100$$

Donde:

$P_i$  es el peso de la caja con 10 gramos de suelo húmedo.

$P_f$  Peso de la caja con el suelo seco.

## c) Textura

### Materiales

Balanza de dos platos

Placa de calentamiento

Frascos de vidrio 250 mL

Pipetas de 10 mL

Batidora

Cilindro 1000 cc

Hidrómetro

Termómetro

Peróxido de hidrógeno

Calcón (hexametáfosfato de sodio al 5% en agua destilada).

Alcohol amílico

### Método

- a) Pesar 50 gramos de suelo y colocarlo en un frasco de vidrio con capacidad de 250 mL.
- b) Eliminar la materia orgánica adicionando 15 mL de peróxido de hidrógeno y calentando la muestra en una placa de calentamiento.
- c) Una vez eliminada la materia orgánica adicionar 10ml de calcón (hexametáfosfato de sodio al 5% en agua destilada) y se colocó en el vaso de la batidora con agua suficiente para que llegue hasta unos 10 cm del vaso.
- d) Dispersar por 20 minutos.
- e) Vaciar la muestra en un cilindro de 1000cc, con cuidado de no perder material de suelo, completar el volumen con el hidrómetro adentro.
- f) Una vez completado el volumen, agitar la suspensión con el embolo unas 10 veces para lograr homogeneidad en la suspensión. Si se produce espuma que impida leer en el hidrómetro adicionar 5 gotas de alcohol amílico, en

cada lectura efectuada tomar la temperatura para obtener el factor de corrección.

g) Tomar la primera lectura a los 20 segundos y la segunda lectura a las 2 horas.

h) los cálculos se efectúan mediante la fórmula

$$\% \text{ de arena} = 100 - \frac{1^{\text{a}} \text{ lectura corregida}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ de arcilla} = 100 - \frac{2^{\text{a}} \text{ lectura corregida}}{\text{peso de la muestra}} \times 100$$

$$\% \text{ de limo} = 100 - (\% \text{ de arena} + \% \text{ de arcilla})$$

### **3. Obtención nódulo.**

#### Materiales

Vasos de precipitado de 250 mL

Pipetas graduadas de 10 mL

Paño

Lima metálica triangular

Cajas petri

Papel filtro

Incubadora

Vasos de unicel 1 L

Tijeras

Pinzas de disección

Agua Destilada

Agua destilada Estéril

Hipoclorito de sodio 25%

Alcohol etílico 95%

Vermiculita

Solución de nutritiva libre de nitrógeno

Método

En este trabajo, se emplearon las semillas de *E. americana* (color rojo) obtenidas de Morelos y la ciudad de México.

1) Esterilización por superficie:

a) Lavar las semillas con agua destilada para eliminar el exceso de suelo.

b) Secar con un paño.

c) Limar por el centro para favorecer la germinación.

d) Sumergir en una solución de etanol al 95% durante 30 segundos.

e) Decantar la solución de etanol y se sumergen en una solución de hipoclorito de sodio al 25% por 5 minutos

f) lavar con agua destilada estéril por lo menos 6 veces.

2) Germinar las semillas

a) en cajas de petri estériles a las cuales se les coloca en el fondo papel filtro y agua destilada estéril, sobre el papel filtro colocar de 6 a 8 semillas y colocar en incubación a 28°C por 8 días aproximadamente.

b) Cuando las semillas presentan una raicecilla de aproximadamente 1 cm. colocar en vasos de unicel con capacidad de 1 litro que contienen vermiculita y aproximadamente 1g de suelo y regar con solución nutritiva libre de nitrógeno.

4) Dejar transcurrir aproximadamente 3 meses hasta observar los nódulos en las raíces de las plantas.

5) De cada planta extraer 3 nódulos con ayuda de tijeras y pinzas.

## 7. Aislamiento de los nódulos.

Materiales.

Tijeras

Pinzas de disección

Vasos de precipitado de 250 mL

Pipetas graduadas de 10 mL

Asas bacteriológicas

Mechero bunsen

Portaobjetos

Microscopio

Placas de medio PY

Cristal violeta

Safranina

Alcohol-acetona

Agua corriente

glicerol (20% w/v)

Método

- a) Extraer los nódulos (3 por planta).
- b) Esterilizar por superficie de la misma forma que se esterilizan las semillas.
- c) Aplastar con una pinza cada nódulo sobre una placa de medio PY (Caseína 5g; Extracto de levadura 3g;  $\text{CaCl}_2$  0.6g; agar 18g; agua destilada 1 L).
- d) Sembrar por estría, incubando a 28° C, hasta su crecimiento (3 a 14 días).
- e) Usar las colonias obtenidas para purificar por estría cruzada tres veces en mismo medio de cultivo.
- f) Realizar tinción de Gram para verificar que las bacterias obtenidas son gram negativas.
- g) Guardar Los aislados purificados se en glicerol (20% w/v) a -20°C.

## 8. Caracterización fenotípica.

### Materiales

Placas de medio Básico ( $K_2HPO_4$  0.5 g;  $MgSO_4$  0.2 g; NaCl 0.1 g; extracto de levadura 0.02 g; agua destilada 1 L; pH 7.2), a las cuales se les adicionó  $NH_4NO_3$  y 0.1% de cada compuesto problema (azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno).

Placas de medio PY modificado con diferentes concentraciones de sales.

Placas de medio PY modificado con diferente pH.

NaOH 5%

HCl concentrado

Placas de medio PY

Asas bacteriológicas

Mechero Bunsen

### El Rango de temperatura

Sembrar por triplicado en placas de medio PY las cepas obtenidas a distintas temperaturas (4, 10, 28, 37, 44°C).

### Rango de pH

Sembrar por triplicado en placas de medio PY modificando el pH (4, 4.5, 5.0, 5.5, 6, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11), con HCl concentrado o NaOH concentrado.

### Resistencia a Salinidad

Sembrar por triplicado en placas de medio PY modificando la concentración salina (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0%) con NaCl.

De los datos obtenidos se realizo una taxonomía numérica usando coeficiente Ssm y método de UPGMA (Sneath y Sokal, 1973).

## VIII. RESULTADOS.

### 1. Caracterización de los suelos.

Para la caracterización del suelo, se determinaron la textura, pH, porcentaje de humedad y porcentaje de materia orgánica a través de métodos estandarizados. Los resultados obtenidos para el análisis del suelo se presentan en Tabla 2.

Tabla 2. Características de los suelos muestreados:

Lugar de muestreo	Textura del suelo	pH	% humedad	% materia orgánica
Estado de Morelos	Arcillo arenoso	4.8	45.0	17.45
Ciudad de México	Arcillo arenoso	4.5	22.5	14.95
Estado de México	Arcillo arenoso	6.5	31.5	8.72

### 2. Extracción y aislamiento de rizobios

De las plantas noduladas que se recolectaron en el muestreo de campo, como obtenidas en el laboratorio en condiciones de invernadero se extrajeron los nódulos radicales (Figura 5) con lo que se consiguió un total de 63 nódulos. Los cuales presentaron color que varió desde rosa pálido hasta púrpura intenso y su tamaño fue de 1 hasta 12 mm de diámetro.

Cuando en una misma caja se logró identificar más de un tipo de colonia bacteriana, se sometió a purificación, a través del método de estría cruzada (en medio PY) hasta obtener cepas puras, para asegurar lo anterior, se realizó tinción

de Gram, en éste caso se buscaba observar que todas las bacterias tuvieran aproximadamente la misma magnitud en cuanto a ancho y que fueran bacilos Gram negativos.

Se logró obtener 51 aislados puros (Tabla 3) de los cuales 29 se aislaron de suelo de Morelos, 15 del distrito y 7 del estado de México. Del total 61.2% crecen lentamente, el 34.6% es de crecimiento rápido, el 4.2% restante no su morfología colonial fue muy diversa entre sí.



Figura A.



Figura B.

Figura 5. Efecto de nodulación sobre el crecimiento de colorín (A) y (B) morfología de los nódulos de colorín

La figura 5A muestra dos plantas obtenidas en el laboratorio, la primera de ellas no presenta desarrollo de nódulos y se caracteriza por poseer hojas de color amarillo debido a la clorosis ocasionada por falta de nutrientes, mientras que la segunda planta si desarrolló nódulos y su aspecto es básicamente el de una planta sana. En la figura 5B se observa la planta que si tiene nódulos, de los cuales se extraen las bacterias fijadoras de Nitrógeno.

**Tabla 3.** Aislados usados en el estudio

Aislado	Crecimiento	Origen	pH de suelo
1, 4, 5, 12, 21, 26, 34, 35	L	Cuernavaca	4.8
11, 48	R		
16, 31, 36,	R		
6, 10, 15, 43	L		
8, 23, 39, 40, 45, 47	L		
13	R		
2, 25, 30, 41, 42, 46, 49	L	Mexico D. F.	4.5
3, 20, 50	R		
7, 14, 17, 32, 44	R		
9, 29,	R		
33	R		
24, 27	L	Edo. de Mexico	6.5
18,	L		
19, 28	R		
22, 37, 38, 51	R		

L= Lento crecimiento de 8 a 11 días

R= Rápido crecimiento de 4 a 6 días

### 3. Caracterización fenotípica

En cuanto a la morfología colonial se agruparon en 2 grupos: 1) De lento crecimiento es decir de 8 a 11 días, las cuales presentaron colonias puntiformes, de color beige, butirosas, de aspecto húmedo, redondas y 2) de rápido crecimiento, es decir de 4 a 6 día, redondas, de 1 a 3 mm, mucoides, de color beige, lisas, convexas.

Las cepas se sembraron por triplicado para medir cada parámetro de las cuales se tomo positivo cuando se observó crecimiento en dos de las tres placas sembradas. Los resultados se presentan en las Tablas 4 a 7.

Tabla 4. Crecimiento de los aislados de nódulos de colorín en medio PY a distintas temperaturas

Colonia	Crecimiento	Origen	Temperatura °C				
			4	10	28	37	44
1	L	C	-	-	+	+	-
2	L	DF	-	-	+	-	-
3	R	DF	-	-	+	+	-
4	L	C	-	+	+	-	-
5	L	C	-	+	+	-	-
6	L	C	-	+	+	+	-
7	R	DF	-	+	+	-	-
8	L	C	-	+	+	-	-
9	R	DF	-	+	+	-	-
10	L	C	-	-	+	+	-
11	R	C	-	+	+	-	-
12	L	C	-	+	+	-	-
13	R	C	-	+	+	-	-
14	R	DF	-	+	+	-	-
15	L	C	-	-	+	+	-
16	R	C	-	-	+	+	-
17	R	DF	-	-	+	-	-
18	L	EM	-	-	+	-	-
19	R	EM	-	+	+	+	-
20	R	DF	-	+	+	+	-
21	L	C	-	+	+	+	-
22	R	EM	-	+	+	+	-
23	L	C	-	+	+	+	-
24	L	EM	-	+	+	-	-
25	L	DF	-	+	+	-	-
26	L	C	-	-	+	+	-

27	L	EM	-	-	+	+	-
28	R	EM	-	-	+	+	-
29	R	DF	-	-	+	+	-
30	L	DF	-	-	+	+	-
31	R	C	--	+	+	-	-
32	R	DF	-	+	+	-	-
33	L	EM	-	-	+	-	-
34	L	C	-	+	+	+	-
35	L	C	-	+	+	+	-
36	R	C	-	+	+	-	-
37	R	EM	-	-	+	-	-
38	R	EM	-	-	+	+	-
39	L	C	-	-	+	+	-
40	L	C	-	-	+	+	-
41	L	DF	-	-	+	+	-
42	L	DF	-	-	+	+	-
43	L	C	-	+	+	-	-
44	R	DF	-	+	+	-	-
45	L	C	-	+	+	-	-
46	L	DF	-	-	+	+	-
47	L	C	-	+	+	-	-
48	R	C	-	-	+	-	-
49	L	DF	-	+	+	+	-
50	R	DF	-	+	+	+	-
51	R	EM	-	+	+	+	-

L= Lento crecimiento de 8 a 11 días

R= Rápido crecimiento de 4 a 6 días

C= Cuernavaca

DF= Distrito Federal

EM= Edo. México

Tabla 5. Crecimiento de los aislados de nódulos de colorín a en medio PY a diferentes pHs

Colonia	pH														
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	11.0
1	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
11	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
12	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
13	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
14	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
16	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
17	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
18	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
19	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
20	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
21	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
22	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
23	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
24	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
25	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
26	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

27	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
28	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
29	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
30	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
31	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
32	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
33	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
34	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
35	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
36	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
37	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
38	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
39	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
40	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
41	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
42	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
43	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
44	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
45	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
46	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
47	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
48	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
49	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
50	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
51	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Tabla 6. Crecimiento de los aislados de nódulos de colorín en medio PY adicionado con NaCl de diferentes concentraciones

colonia	Concentración NaCl (%)							
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
1	+	+	+	+	+	+	-	-
2	-	+	+	+	+	-	-	-
3	-	+	+	+	+	-	-	-
4	-	+	+	+	+	-	-	-
5	-	+	+	+	+	-	-	-
6	-	-	+	+	+	+	+	-
7	-	-	+	+	+	+	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	-
11	-	+	+	+	+	-	-	-
12	-	+	+	+	+	-	-	-
13	-	-	+	+	+	+	-	-
14	+	+	+	+	+	+	-	-
15	+	+	+	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	+	+	+	-
17	-	+	+	+	+	+	+	-
18	-	-	+	+	+	+	+	-
19	+	+	+	+	+	+	+	-
20	-	+	+	+	-	-	-	-
21	-	+	+	+	-	-	-	-
22	+	+	+	+	+	+	-	-
23	+	+	+	+	+	+	+	-
24	-	+	+	+	+	-	-	-
25	-	-	+	+	+	-	-	-
26	-	-	+	+	-	-	-	-

27	-	-	+	+	+	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	-	-
29	+	+	+	+	+	+	-	-
30	-	+	+	+	-	-	-	-
31	+	-	+	+	+	+	-	-
32	+	+	+	+	+	+	+	-
33	-	+	+	+	-	-	-	-
34	-	+	+	+	+	-	-	-
35	-	+	+	+	+	-	-	-
36	+	+	+	+	+	+	+	-
37	-	+	+	+	+	-	-	-
38	-	+	+	+	-	-	-	-
39	+	+	+	+	+	+	-	-
40	-	+	+	+	-	-	-	-
41	-	+	+	+	-	-	-	-
42	-	+	+	+	-	-	-	-
43	+	+	+	+	+	+	-	-
44	+	+	+	+	+	+	+	-
45	-	+	+	+	+	-	-	-
46	-	+	+	+	+	-	-	-
47	-	+	+	+	+	-	-	-
48	-	+	+	+	+	-	-	-
49	-	+	+	+	-	-	-	-
50	-	+	+	+	-	-	-	-
51	+	+	+	+	+	+	-	-

Tabla 7. Crecimiento de los aislados de nódulos de colorín en medio Básico con distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

Cepa	Fuente de carbono o nitrógeno																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
2	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
3	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
4	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
5	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
6	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
10	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
11	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
12	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
13	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
14	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
15	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
16	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
18	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
21	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
22	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
23	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
24	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
25	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
26	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+

27	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
28	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
29	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
30	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
31	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
32	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
33	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
34	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
35	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
36	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
37	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
38	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
39	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
40	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
41	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
42	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
43	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
44	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
45	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
46	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
47	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
48	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
49	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
50	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+
51	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

1. D-alanina
2. N-acetilglucosamina
3. adonitol
4. D-arabinosa
5. D-fucosa
6. L-leucina

7. L-lisina
8. Malonato
9. L-ornitina}piruvato
10. piruvato
11. D-rafinosa
12. D-tartrato

13. L-tartrato
14. L-tirosina
15. L-valina
16. L-xilosa
17. L-fenilalanina
18. D-fucosa

19. Arginina
20. L-aspartato
21. Citrato
22. L-glutamato
23. glutarato
24. L-iso-leucina
25. D-lactato

## 4. Análisis de agrupación

Con los resultados obtenidos de las características fenotípicas estudiadas se construyó una matriz binaria dando el valor de 1 a las características positivas esto es las cepas que presentaron crecimiento bajo la condición estudiada y el valor de 0 cuando no se observó crecimiento, los valores estudiados fueron 28 y se encuentran enlistadas en forma vertical, el número de cepa se encuentra enlistado de forma horizontal (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados de crecimiento de los aislados presentados en forma binario

Caracte-	Cepas
----------	-------

rísticas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10°C	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
28°C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37°C	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
44°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 4.5	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
pH 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 5.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 6.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 7.5	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
pH 8	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
pH 8.5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
pH 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
pH 9.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
pH 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 10.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 0.5%	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
NaCl 1%	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
NaCl 1.5%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl 2.5%	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
NaCl 3%	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
NaCl 3.5%	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
NaCl 4%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 7. (Continuación)

	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
4°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10°C	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
28°C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37°C	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1
44°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 4.5	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0
pH 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 5.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 6.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pH 7.5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
pH 8	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0
pH 8.5	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
pH 9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
pH 9.5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 10.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 0.5%	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
NaCl 1%	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl 1.5%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl 2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl 2.5%	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1
NaCl 3%	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
NaCl 3.5%	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 4%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Una vez elaborada la matriz, los datos obtenidos se agruparon mediante el programa NTSYS lo que nos dio por resultado el siguiente dendrograma (Fig. 6). Con base en este dendrograma, solo 4 pares de cepas tenían características idénticas y todas además fueron diferentes. Estos resultados indicaron que las bacterias aisladas fueron muy diversas. Todos los aislados en el estudio se agruparon conjunto en la similitud de 0.76 y pueden dividir en 3 grupos (phena) en la similitud de 0.8.

El primer grupo que incluye las cepas 1, 2, 26, 3, 4, 5, 48, 33, 11, 49, 24, 50, 25, 20, 21, 34, 27, 46, 30, 41, 42. El segundo grupo incluye las cepas 6, 17, 18, 7, 32, 36, 10, 16, 14, 43, 19, 28, 44, 15, 31. El tercer grupo incluye las cepas 8, 9, 22, 51, 23, 29, 13, 45, 47, 37, 38, 40, 39. En cada de los tres grupos, se incluyeren aislados de los tres sitios de muestreo y de crecer rápido y lento (Tabla 8, Fig. 6).

Tabla 8

Aislado	Crecimiento	Grupo	Origen	pH de suelo
1, 4, 5, 12, 21, 26, 34, 35	L	I	Cuernavaca	4.8
11, 48	R	I		
16, 31, 36,	R	II		
6, 10, 15, 43	L	II		
8, 23, 39, 40, 45, 47	L	III		
13	R	III		
2, 25, 30, 41, 42, 46, 49	L	I	Mexico D. F.	4.5
3, 20, 50	R	I		
7, 14, 17, 32, 44	R	II		
9, 29,	R	III		
33	R	I		
24, 27	L	I	Edo. de Mexico	6.5
18,	L	II		
19, 28	R	II		
22, 37, 38, 51	R	III		

L= Lento crecimiento de 8 a 11 días

R= Rápido crecimiento de 4 a 6 días

C= Cuernavaca

DF= Distrito Federal

EM= Edo. México

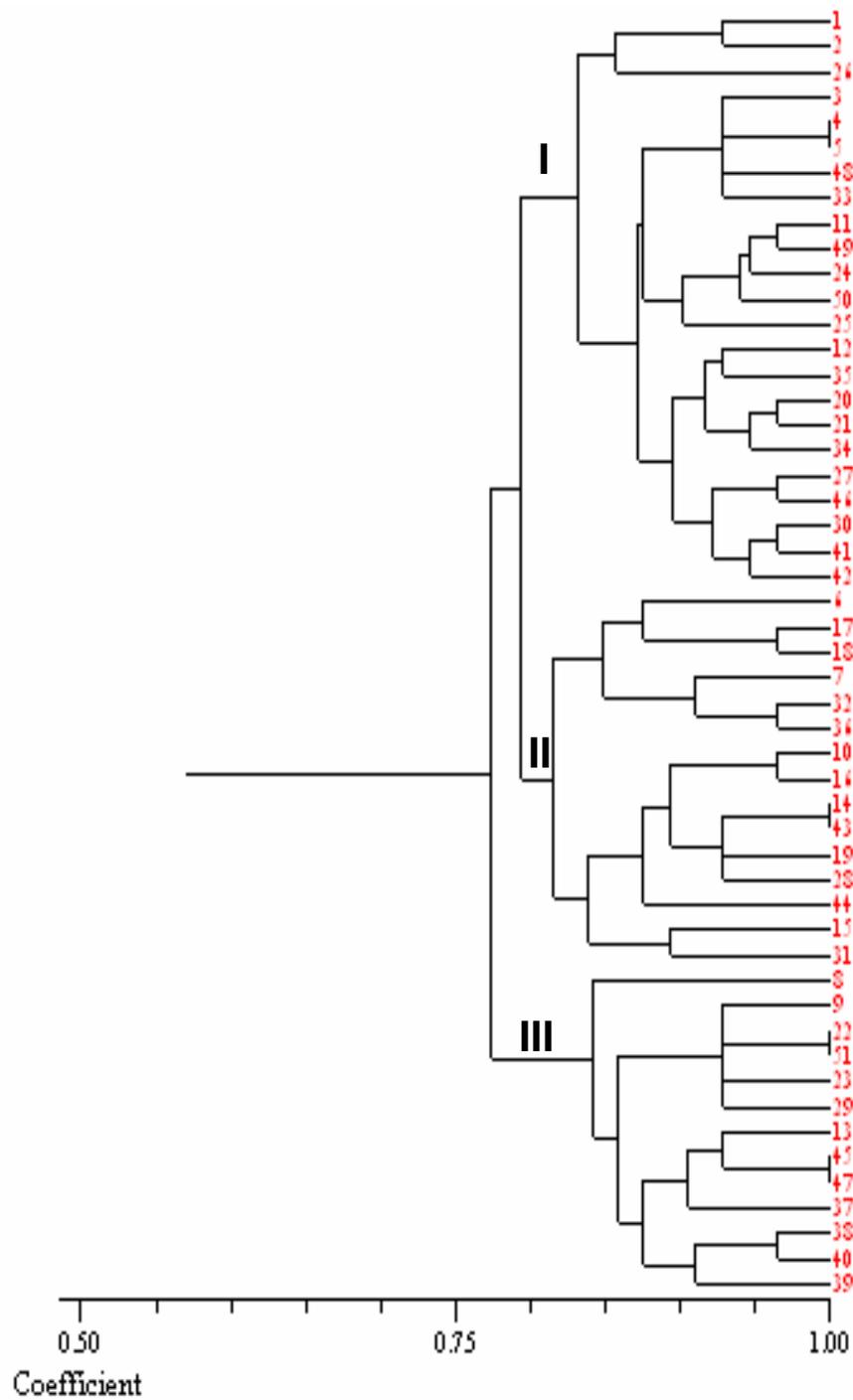


Fig. 6 Dendrograma indicando la diversidad fenotípica entre los aislados de nódulos de colorín. El dendrograma se construyó por método UPGMA con coeficiente de similitud simple.

De forma general las cepas se observa que las cepas crecen mejor a 28° C pero que muestran un rango de crecimiento de 10-37 ° C.

En cuanto a pH ninguna de las cepas creció a un pH menor de 5.0 y solo algunas crecieron a un pH superior a 9.0.

Con respecto a la concentración de NaCl se observa que la mayoría de las cepas toleran concentraciones de 1.5-2 % de dicha sal.

De acuerdo a las distintas fuentes de carbono y nitrógeno las bacterias presentan el mismo comportamiento, es decir que se agrupan en tres grupos como lo muestra el dendograma.



## IX. DISCUSIÓN.

En cuanto a los resultados del análisis del suelo se nota un pH más cerca de neutral en el estado de México en comparación con las otras dos muestras (con pH ácido) lo que se ve reflejado en la obtención de aislados ya que se ha encontrado que el pH en el cual crecen los rhizobios es más bien ácido .

Se sabe que en la rizosfera se encuentra una gran cantidad de microorganismos de forma nativa pero son pocos los que tienen la capacidad de nodular con las plantas, entre las especies más importantes encontramos a los *rhizobios*, *bradyrhizobios* y *mesorhizobios* los cuales poseen características fenotípicas muy parecidas entre si, la diferencia entre unos y otros radica principalmente en el tiempo de crecimiento de ahí que los *rhizobios* presenten un tiempo de crecimiento entre 4 a 6 días, los *Bradyrhizobios* un tiempo de crecimiento mas largo de entre 8 y 11 días y los *Mesorhizobios* un tiempo intermedio entre ambas especies, es por eso que se considera un factor importante el tiempo de crecimiento para la identificación presuntiva de dichas especies; en cuanto a la concentración salina y pH se utilizaron estos rangos debido a que son los rangos manejados (Chen et al., 1991; 1995) en investigaciones anteriores donde la leguminosa estudiada fue distinta pero las especies encontradas fueron de la familia de los *Rhizobiaceae* como presuntamente se encontró en el estudio.

Se lograron obtener 51 aislados puros de los cuales 29 son se aislaron de suelo de Morelos, 15 del distrito y 7 del estado de México. En cada muestra, se encontraron ambos aislados de crecimiento rápido y lento. En total, 17 aislados fueron bacterias que crecieron rápido y 35 fueron bacterias que crecieron lento, indicando que *Bradyrhizobium* fue principal género en los nódulos de colorín. En general se observó que 6 tipos de rhizobio se encontraron en Cuernavaca (por la combinación de grupos y velocidad de crecimiento). Y solo 4 y 5 tipos de rhizobio se encontraron en México D. F. y en estado de México.

Considerando que Morelos es el centro de diversificación de colorín y el Metropolitano (México D. F. y estado de México) es la zona donde colorín se cultiva como planta introducida, los resultados concuerdan, es decir que los suelos de los sitios donde los árboles fueron introducidos no contienen las mismas condiciones del sitio de diversificación por lo en la obtención de aislados en el estado de Morelos era más diversa.

Por los resultados de caracterización fenotípica, parece que los aislados fueron más resistentes a pH ácido que alcalino. El rango pH para crecer fue 5-9, cual fue corresponde al pH de suelo. Este rango fue un poco más restringido que los reportados para unas especies de rhizobio (pH 4 a 11) (Jordan, 1984).

Con respecto a la concentración de NaCl se observa que la mayoría de las cepas toleran concentraciones de 1.5-2 % de dicha sal. Este rango esta dentro el rango para otras especies de rhizobia (Jordan, 1984).

En los trabajos anteriores, 80% de similitud se usaron como el valor para definir las especies bacterianas (Chen et al., 1991; 1995). En esta trabajo, la agrupación de los aislados fue diferente a los trabajos reportados, porque los aislados con diferentes velocidad de crecimiento se juntaron en los mismo grupos. Normalmente, estos dos tipos de rhizobio se separaron en diferentes grupos. Esta diferencia se podría relacionar a que las características fueron muy pocas en el presente trabajo y los grupos no son muy confiables.

## X. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

1. El árbol colorín nodula con rhizobios que crecen lento y rápido, pero principalmente con *Bradyrhizobium*;

Al inicio del trabajo se esperaba encontrar especies de la familia Rhizobiacea ya que en otras leguminosas son las especies que más predominan lo que se desconoce para ésta planta en particular es que género es el principal simbionte, lo que se observó con el estudio es que presuntamente se encuentra en su mayoría bacterias del género *Bradyrhizobio* esto lo determinó el tiempo de crecimiento, obviamente se requiere de más pruebas fenotípicas que permita agrupar de manera más confiable las bacterias simbiotes

2. Las poblaciones de rhizobios asociados a colorín fueron diferentes en su centro de diversificación y en otras zonas.

Esto debido a que las bacterias presentes en el suelo de las distintas zonas varía esto dependiendo de sus características físicas y químicas de la muestra, lo que se puede observar es que si hay una diferencia entre el simbionte con respecto al lugar de muestreo del suelo

3. Se menciona nuevamente que los resultados obtenidos son presuntivos para confirmar el género se requiere un análisis no solo fenotípico también genotípico que permita conocer la especie de el principal simbionte para el árbol de colorín.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alexander, M, 1994, Introducción a la Microbiología del suelo, AGT editores, 2ª edición, México, 241-352.
2. Allen O. N. & Allen Ethel K, 1981 The leguminosae, a source book of characteristics, uses, an nodulation, University of Wisconsin-Madison, USA, 812.
3. Barbour, W. M., D. R. Hatterman, and G. Stace y. 1991. Chemotaxis of Bradyrhizobium japonicum to soybean exudates. Appl. Environ. Microbiol. 57:2635–2639.
4. Becker, R. & R. M. Saunders. 1983. Stress tolerant crops from nitrogen fixing trees. Nitrogen Fixing Tree Research reports 1: 32-34.
5. Bohlool, B. B., and E. L. Schmidt. 1974. Lectins: a possible basis for specificity in the Rhizobium-legume root nodule symbiosis. Science 185:269–271.
6. Caetano-Anolle's, G., E. Wrobel-Boerner, and W. D. Bauer. 1992. Growth and movement of spot inoculated Rhizobium meliloti on the root surface of alfalfa. Plant Physiol. 98:1181–1189.
7. Bellato, C., H. B. Krishnan, T. Cubo, F. Temprano and S. G. Pueppke. The soybean cultivar specificity gene nolX is present, expressed in a nodD-dependent manner, and of symbiotic significance in cultivar-nonspecific strains of Rhizobium (Sinorhizobium) fredii. Microbiology (1997), 143, 1381–1388 Printed in Great Britain
8. Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 1119-1129.
9. Chen W. X., G. S. Li, Y. L. Qi, E. T. Wang, H. L. Yuan & J. L. Li. (1991). *Rhizobium huakuii*, sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. Int J Syst Bacteriol 41: 275-280.

10. Chen, W. X., E. T. Wang, S. Y. Wang, Y. B. Li & Y. Li. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid-saline environment in Xinjiang, P. R. China. *Int J Syst Bacteriol* 45: 153-159.
11. Cren, M., A. Kondorosi, and E. Kondorosi. 1993. An insertional pointmutation inactivates NodR repressor in *Rhizobium meliloti* 1021. *J. Bacteriol.* 176:518–519.
12. De Faria, S. M., G. P. Lewis, J. I. Sprent, and J. M. Sutherland. 1989. Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.* 111:607–619.
13. De Lucena Costa, N. & V. T. Paulino. 1990. Brewbaker, J. L., K. B. Willers & B. Macklin. 1990. Nitrogen fixing trees: validation and prioritization. *Nitrogen Fixing Tree Research Report* 8: 8-16.
14. Dowling, D. N., and W. J. Broughton. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:131–157.
15. Geurts, R. and T. Bisseling. 2002. *Rhizobium* Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell, Supplement* 2002. S239–S249,
16. Gaworzewska, E. T., and M. J. Carlile. 1982. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* 128:789–798.
17. Gulash, M., P. Ames, R. C. LaRosiliere, and K. Bergman. 1984. Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:149–152.
18. Gutteridge, R. C. & R. Akkasaeng. 1985. Evaluation of nitrogen fixing trees in northeast Thailand. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports* 3: 46-56.
19. Halenda, C. J. & S. P. Ting. 1993. Performance of three legume tree species on degraded acidic soils. *Nitrogen Fixing Tree Research Reports* 11: 29.
20. Hamblin, J., and S. P. Kent. 1973. Possible role of phytohemagglutinin in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature (London) New Biol.* 254:28–30.

21. Krishnan, H. B. & Pueppke, S. G. (1994b). Host range, RFLP, and antigenic relationships between *Rhizobium fredii* strains and *Rhizobium* sp. NGR234. *Plant Soil* 161, 21±29.
22. Lozoya, X; Lozoya, M, 1982, Flora medicinal de México: plantas indígenas, Vol 1, IMSS, México, 177-192.
23. Niembro, R.A, 1990, Árboles y arbustos útiles de México naturales e introducidos, Limusa, México, 174-180.
24. Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, 321AL, p. 234–254. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
25. Martínez-Viera, R. (1986): *Ciclo biológico del nitrógeno en el suelo*. Editorial Científico-Técnica. La Habana. 167 p.
26. Parker MA. Case of localized recombination in 23S rRNA genes from divergent bradyrhizobium lineages associated with neotropical legumes. *Appl Environ Microbiol.* 2001 May;67(5):2076-82.
27. Smit, G., S. Swart, B. J. J. Lugtenberg, and J. Kijne. 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.* 6:2897–2903.
28. Trinick, M. J., and J. Galbraith. 1976. Structure of root nodules formed by *Rhizobium* on the non-legume *Trema cannabina* var *scabra*. *Arch. Microbiol.* 108:159–166.
29. Young, J. P. W., H. L. Downer, and B. D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain Btail by polymerase chain reaction-based sequencing of the 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173:2271–2277.
30. Young, J. P. W., and A. W. B. Johnston. 1989. The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* 4:331–349.
31. Wang, E.T; Berkum, P; Beyene, D; Sui, X.H; Dorado, o; Chen, W. X; Martínez-Romero, E. 1998, *Rhizobium huatutlense* sp. Nov; a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*, *International Journal of Systems*