



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Flavonoides de *Prosopis laevigata* (mezquite) inductores de genes *nod* de rizobios

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:

JUDITH SALAS OROPEZA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA-UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. RONALD FERRERA CERRATO
COLEGIO DE POSTGRUADOS
DR. ELIAS PIEDRA IBARRA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA-UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2013



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de junio de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) SALAS OROPEZA JUDITH con número de cuenta 99299561, con la tesis titulada "Flavonoides de *Prosopis laevigata* (mezquite) inductores de genes *nod* de rizobios.", realizada bajo la dirección del (la) DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTÍZ:

- Presidente: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
- Vocal: DR. ALEJANDRO ALARCÓN
- Secretario: DR. ELIAS PIEDRA IBARRA
- Suplente: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
- Suplente: DR. SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de agosto de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

- Al **Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.**
- Al **CONACyT** por la beca otorgada, con número 239888
- A los miembros del Comité Tutor:
 - ❖ **Dr. César Mateo Flores Ortiz**
 - ❖ **Dr. Ronald Ferrera Cerrato**
 - ❖ **Dr. Elías Piedra Ibarra**

A título personal quiero agradecer:

- A los miembros del jurado que revisaron este trabajo:
 - ❖ **Dra. María Margarita Canales Martínez**
 - ❖ **Dr. Alejandro Alarcón**
 - ❖ **Dr. Elías Piedra Ibarra**
 - ❖ **Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras**
 - ❖ **Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza**

Por todas sus observaciones y comentarios.

Agradezco además al **Dr. Víctor Olalde Portugal**, por el apoyo dado durante mi estancia en el laboratorio a su cargo en el CINVESTAV Irapuato.

Quiero agradecer de manera especial:

- A Dios, por todo.
- A mis padres (Octavio y Victoria) por todo su amor, confianza, consejos, ayuda y, sobre todo, por ser mi refugio incondicional. Los amo.
- A mi hermana Rut, por ser una de las mujeres más inspiradoras de mi vida.
- A mi hermano Octavio, por ser mi gran amigo y compañero, porque a tu corta edad me enseñas más que muchos.
- A Rodolfo, por ser mi compañero en esta aventura llamada vida, por todo tu apoyo y amor. Por ayudarme a ser optimista del porvenir y contemplarme en tus planes futuros. Te amo.
- A mis abuelas (Esperanza y Felipa), por ser las incansables mujeres que son.

- A mi tutor, Dr. César Flores, por toda la confianza dada para proponer y decidir sobre este proyecto.
- Al Dr. Ronal Ferrera Cerrato, por su ayuda y enseñanzas invaluable, sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Por toda su amabilidad y calidez.
- Al Dr. Elías Piedra Ibarra, por el apoyo en este trabajo, pero sobre todo por enseñarme la importancia de “dejarse guiar”. Lo quiero.
- A la Dra. Tzasna Hernández (maestra Nany), por toda su hospitalidad y calidez.
- Al equipo del laboratorio de Fisiología Vegetal UBIPRO-UNAM (Maestra Jose, profe Rafa, Luis, maestra Margarita) por ser mi segunda familia.
- A mis amigos:
 - ❖ Diana I. Sánchez, por acompañarme en tantos momentos importantes.
 - ❖ Martha Santiago, porque el orden alfabético y la fortuna juntaron nuestros caminos, tu amabilidad y apoyo me han unido a ti en amistad.
 - ❖ Erika Vicens, por ser mi gran amiga, por escuchar mis penas, compartir mis alegrías y regañarme cuando ha sido necesario.
 - ❖ Lucero Pérez, porque eres una de las personas más amables que conozco, por abrirme las puertas de tu casa mientras estudiaba en el Colegio de Postgraduados y, ante todo, por tu amistad.
 - ❖ Emilio Hernández, por ser el amigo más directo y despiadado del mundo, y al mismo tiempo, el más noble y leal.
 - ❖ Elvira Hernández, por recibirme en tu casa durante mi estancia en Irapuato.
 - ❖ Karla Suárez, por estar siempre pendiente de mí y contagiarme tu alegría de vivir.
 - ❖ A Jesús Casillas, por todo tu apoyo y comprensión.

En general, a todos los que de alguna manera me acompañaron y contribuyeron a lograr esta meta, y que por falta de memoria, que no por ingratitud, no he mencionado aquí.

Dedico este trabajo a mi familia y amigos

Índice

1. Resumen.....	1
1.1 Abstract	2
2. Introducción	3
2.1 Marco Teórico	5
2.1.1 Prosopis laevigata (Mezquite).....	5
2.1.3 Rizobios	9
2.1.3 Flavonoides y Genes nod.....	12
3. Antecedentes	15
4. Justificación	19
5. Hipótesis.....	19
6. Objetivos	19
Objetivo general:.....	19
Objetivos particulares:	19
7. Materiales y Métodos.....	20
7.1 Área de Estudio.....	20
7.2 Recolecta de semillas.....	22
7.3 Recolecta de suelo	22
7.4 Análisis químico del suelo	22
7.5 Aislamiento de cepas bacterianas	22
7.6 Purificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas.....	23
7.7 Determinación taxonómica molecular	23
7.8 Pruebas de nodulación.....	26
7.9 Parámetros fotosintéticos.....	26
7.10 Exudados de semillas	26
7.11 Identificación de Flavonoides.....	26
7.12 Prueba de inducción de genes	27
7.13 Aislamiento de ARNtotal	28

7.14 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	28
7.15 Análisis estadístico	28
8. Resultados	30
8.1 Análisis químico del suelo	30
.2 Aislamiento de cepa bacteriana	31
8.3 Purificación y caracterización bioquímica de cepa bacteriana	33
8.4 Determinación taxonómica molecular	34
8.5 Pruebas de nodulación	37
8.6 Parámetros fotosintéticos	39
8.7 Identificación de Flavonoides	46
8.8 Actividad biológica de compuestos fenólicos	47
9. Discusión	49
9.1 Análisis químico del suelo	49
9.2 Aislamiento de las cepas bacterianas	50
9.3 Purificación y caracterización bioquímica de las cepas bacterianas	51
9.4 Determinación taxonómica por biología molecular	52
9.5 Pruebas de nodulación	52
9.6 Parámetros fotosintéticos	53
9.7 Identificación de Flavonoides	54
9.8 Actividad biológica de compuestos fenólicos	55
10. Conclusiones	56
Fuentes Citadas	57
Anexo 1	65
Anexo 2	68
Anexo 3	76

Índice de cuadros y figuras

CUADRO 1. Información de las cepas utilizadas para la construcción del dendrograma comparativo de géneros de rizobios.....	25
CUADRO 2. Iniciadores diseñados para hacer las pruebas de actividad biológica de los compuestos fenólicos en los rizobios.	27
CUADRO 3. Composición química de suelo recolectado en Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México.	30
CUADRO 4. Caracterización bioquímica y morfológica de las cepas bacterianas aisladas de los nódulos de <i>Prosopis laevigata</i>	33
CUADRO 5. Compuestos fenólicos identificados en exudados de semillas de <i>Prosopis laevigata</i>	46
CUADRO 6. Secuencias del (NCBI) que produjeron significancia al comparar la secuencia de la cepa Andícola tratada con quercetina.	48
CUADRO 7 coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Mexicana contra las de la base de datos del NCBI	68
CUADRO 8 Coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Andícola contra las de la base de datos del NCBI	71
CUADRO 9 Coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Zapotitlana contra las de la base de datos del NCBI	74
FIGURA 1. <i>Prosopis laevigata</i> : centro: individuo adulto; izquierda superior: flor; izquierda inferior: fruto (vaina); derecha superior: hojas; derecha inferior: corteza.	8
FIGURA 2 Esquema resumido del proceso de nodulación.	11
FIGURA 3 Esquema del “diálogo” químico entre plantas leguminosas y rizobios.....	14
FIGURA 4. Ubicación geográfica de Zapotitlán de Las Salinas, Puebla, México.....	21
FIGURA 5 Esquema metodológico general del proyecto.....	29
FIGURA 6. Nódulos en raíces de plántula de mezquite, crecida a nivel de invernadero en suelo de Zapotitlán de las Salinas.....	31
FIGURA 7 A) Raíz nodulada de <i>Prosopis laevigata</i> ; B) Nódulos de <i>Prosopis laevigata</i> ; C) Nódulos de <i>Prosopis laevigata</i> observados al microscopio estereoscópico; D) Raíz nodulada de <i>prosopis laevigata</i> var. <i>Andicola</i> ; E) Nódulos de <i>Prosopis laevigata</i> var. <i>andicola</i> ; F) Nódulos de <i>Prosopis laevigata</i> var. <i>andicola</i> observados al microscopio estereoscópico.	32
FIGURA 8. Gel resultante de la electroforesis con productos de pcr, para determinar la temperatura óptima de alineamiento	34
FIGURA 9. Gel de electroforesis, donde se muestran las bandas correspondientes a los amplicones resultantes con iniciadores D1.	35
FIGURA 10 Dendrograma obtenido con secuencias resultantes con oligos d1 para el fragmento ribosomal 16S y secuencias del ncbi de los géneros <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> y <i>Mesorhizobium</i>	36
FIGURA 11 A) Nódulos en raíces de plántulas de <i>Prosopis laevigata</i> inoculados con cepa Andícola. B) Vista al microscopio óptico (40x) de pelos radicales de plántula de <i>Prosopis laevigata</i> inoculada con cepa Mexicana.	37

FIGURA 12 A) Nódulos de plántulas inoculadas con cepa Andícola. B) Nódulos en plántulas inoculadas con cepa Mexicana a los 140 días.	38
FIGURA 13. Fotografía comparativa de la longitud de vástago y raíz de plántulas de <i>Prosopis laevigata</i> en los diferentes tratamientos. izquierda: Andícola (AND); centro: Mexicana (MEX); derecha: Control (libre de cepa).	39
FIGURA 14 Diagrama de caja donde se muestran los valores registrados de número de nódulos, longitud de raíz y tallo, fotosíntesis, conductancia estomática, concentración de CO ₂ intracelular (CI) y transpiración.	40
FIGURA 15 Diagrama de caja donde se muestran los valores registrados de número de nódulos, longitud de raíz y tallo, fotosíntesis, conductancia estomática, concentración de CO ₂ intracelular (CI) y transpiración; con respecto al tiempo.	41
FIGURA 16 Fotografía de electroforesis con resultados de rtqcr. mpm: marcador de peso molecular, BLAN: Blanco, CON: Control, MET: Metanol; EXU: Exudados de semillas de <i>Prosopis laevigata</i>	47

1. Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si flavonoides de exudados producidos durante la imbibición de semillas de *Prosopis laevigata*, tienen capacidad de activar genes de nodulación de rizobios. Para ello, tres cepas de rizobios fueron aisladas, a partir de nódulos de plántulas de *Prosopis laevigata* (2 cepas) y *Prosopis laevigata* var. *Andicola* (1 cepa), nombradas según su origen: MEXICANA (aislada de nódulos de *Prosopis laevigata* crecido en suelo de Irapuato, Guanajuato, México), ANDÍCOLA (aislada de nódulos de *Prosopis laevigata* var. *Andicola*, crecido en suelo de Irapuato, Guanajuato, México) y ZAPOTITLANA (aislada a partir de nódulos de *Prosopis laevigata*, crecido en suelo de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México). Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas, encontrando en todos los casos colonias blancas de rápido crecimiento, ácido productoras y negativas para la prueba de Gram. Las cepas MEXICANA y ANDÍCOLA fueron sometidas a pruebas de nodulación con plántulas de *Prosopis laevigata*; encontrando que la cepa ANDÍCOLA tiene mayor capacidad infectiva. Mediante análisis de la secuencia del fragmento ribosomal 16s, las cepas fueron asignadas a géneros diferentes: *Mesorhizobium* (MEXICANA); *Rhizobium* (ANDÍCOLA), y *Sinorhizobium* (ZAPOTITLANA). A partir de los exudados de semillas, se identificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) cinco isoflavonas, una flavona y un flavonol. Una alícuota de la mezcla de flavonoides (disueltos en MEOH) fue agregada en cultivos de las bacterias para probar su capacidad inductora de genes *nod*, utilizando como controles cultivos libres de flavonoides, con MEOH y con quercetina pura (disuelta en MEOH). Los resultados indican que el control de quercetina induce la acumulación de transcritos de genes *nod*, en tanto que los exudados, no tienen efecto sobre la transcripción de estos genes, lo cual se discute en función de la concentración de flavonoides empleada.

1.1 Abstract

The aim of this study was to determine whether the flavonoids, from exudates produced during imbibition of seeds of *Prosopis laevigata*, have the ability to activate nodulation genes of rhizobia. Three strains of rhizobia were isolated from nodules of *Prosopis laevigata* (2 strains) and *Prosopis laevigata* var. *Andicola* (1 strain), named for their origin: MEXICANA (isolated from nodules of *Prosopis laevigata* grown in soil from Irapuato, Guanajuato, Mexico), ANDÍCOLA (isolated from nodules of *Prosopis laevigata* var. *Andicola* grown in soil from Irapuato, Guanajuato, Mexico) and ZAPOTITLANA (isolated from nodules of *Prosopis laevigata*, grown in soil Zapotitlán de las Salinas, Puebla, Mexico). The strains were characterized by biochemical tests; in all case white colonies, and fast growing, acid producing and Gram negative were found. The ANDÍCOLA and MEXICANA strains were tested for nodulation with seedlings of *Prosopis laevigata*, by which the strain ANDÍCOLA had higher infectivity. The analysis of sequence of 16S ribosomal fragment allowed assigning different genera to the bacterial strains: *Mesorhizobium* (MEXICANA); *Rhizobium* (ANDÍCOLA), and *Sinorhizobium* (ZAPOTITLANA). Furthermore, exudates from seeds were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), inwhich five isoflavones, one flavone and flavonol were identified. An aliquot of the mixture of flavonoids (dissolved in MEOH) was added into the bacterial medium to test inducing *nod* genes. Free flavonoids solution and quercetin (dissolved in MEOH) were used as controls. Results indicate that quercetin induced *nod* gene transcripts, whereas seed exudates had no effect on transcription of these genes, this results are discussed in terms of the used concentration of flavonoids.

2. Introducción

Aun cuando 79% de los gases atmosféricos están constituidos por nitrógeno (N_2), este elemento suele limitar el desarrollo de muchos organismos vivos; ya que, la mayoría no son capaces de aprovecharlo en su forma molecular. En vez de ello, los organismos utilizan el nitrógeno en su forma reducida para la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos nitrogenados necesarios para su metabolismo. La fijación biológica de nitrógeno es un proceso por medio del cual se lleva a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico y está mediado por microorganismos que transforman el N_2 inerte en NH_3 biológicamente útil (Hartwig, 1998). Las plantas se benefician de este proceso cuando los microorganismos mueren y liberan el nitrógeno al ambiente, o cuando la bacteria vive en asociación con ellas.

Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Methilobacterium* conocidos comúnmente como rizobios, son microorganismos de vida libre del suelo, capaces de formar asociaciones fijadoras de nitrógeno con plantas de la familia *Fabaceae* (leguminosas). Esta asociación, que conecta la capacidad fotosintética de la planta con la capacidad de las bacterias de reducir el nitrógeno atmosférico, es 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 vegetales como bacterianos. La simbiosis es altamente específica, su establecimiento comienza por un intercambio de señales químicas entre ambas partes, que permite el reconocimiento e invasión del rizobio a la leguminosa hospedadora apropiada (Downie, 1994). El Proceso de simbiosis continúa con la proliferación y diferenciación de una estructura altamente especializada denominada "nódulo". En su interior, las bacterias, transformadas en bacteroides, fijan nitrógeno, para lo cual reciben de la planta fuentes de carbono y energía (Redmond *et al.*, 1986; Guerreiro *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2000).

En las etapas tempranas de la simbiosis los rizobios son químicamente atraídos por flavonoides y otras moléculas liberadas en exudados de raíz (incluyendo azúcares), posteriormente, las bacterias son desplazadas hacia sitios localizados en la raíz de la leguminosa (Djordjevic *et al.*, 1987; Caetano-Anolles *et al.*, 1988) y una serie de genes de nodulación son rápidamente inducidos por estas señales de la planta (Guerreiro *et al.*, 1997; Djordjevic *et al.*, 1987; Redmond *et al.*, 1986.), a través de mecanismos que implican la transcripción de factores Nod (Guerreiro *et al.*, 1997; Cabrerizo *et al.*, 2001). Algunos flavonoides inductores de genes *nod*, aislados e identificados en exudados de raíz de frijol (*Phaseolus vulgaris*) son: eriodictiol, el 7-O-glicosido de genisteína, coumestrol, naringeína, licuiritigenina e isolicuiritigenina de genisteína (Hungria *et al.*, 1991; Bolaños, 1997).

La fijación simbiótica de nitrógeno puede ser aprovechada para mejorar la calidad de suelos con deficiencia de este elemento, lo cual es frecuente en suelos desnudos y sin abonar, característicos de las zonas áridas y semiáridas, que para el caso de México, cubren alrededor del 60% del territorio nacional (1,28 millones km²) y se localizan principalmente en el centro y norte del país, donde además, habita aproximadamente el 50% de la población nacional (Echavarría *et al.*, 2006; Herrera-Arreola *et al.*, 2007). Las plantas pertenecientes al género *Prosopis*, características de este tipo de ambientes, son capaces de establecer simbiosis con rizobios; los mezquites (como son llamados comúnmente) son además de importancia ecológica; ya que, frecuentemente constituyen el único estrato arbóreo, siendo, por tanto, un elemento central en el desarrollo de otras especies, al ofrecer refugio y alimento, funcionar como nodriza de otras plantas, formar islas de fertilidad bajo su dosel (Ruíz, *et al.*, 2008). A pesar de la importancia que tienen los mezquites, existe poca información sobre el proceso de nodulación en esta especie, particularmente de las etapas tempranas de dicho proceso; por estas razones, el objetivo de este trabajo, es determinar si los flavonoides producidos por semillas de *Prosopis laevigata* tienen la capacidad de activar genes de nodulación de rizobios.

2.1 Marco Teórico

2.1.1 *Prosopis laevigata* (Mezquite)

Las especies del género *Prosopis* son muy importantes en las cadenas tróficas de los ecosistemas, sirviendo de alimento y resguardo para la fauna silvestre, los mezquites se consideran estabilizadores del suelo y protectores de las cuencas hidrográficas (Olvera 2006). Los mezquites son plantas arbóreas o arbustivas frecuentes, y en algunos casos, dominantes en zonas áridas, semiáridas y subtropicales de diferentes regiones del planeta. En México, se encuentran en el centro-sur y sur del país, donde constituyen parte importante de la flora, alcanzando incluso carácter predominante en ciertas regiones. Las comunidades de mezquite (mezquiales) están firmemente establecidas en más de 3.5 millones de hectáreas del norte de México, incluyen las siguientes especies autóctonas: *P. glandulosa*; *P. juliflora* Var. *juliflora*, *P. velutina*; *P. pubescens*, *P. reptans*, *P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. palmeri* y *P. laevigata* var. *laevigata*, siendo esta la especie típica del centro de México, y dominante en San Luis Potosí, así como el centro y sur de Tamaulipas. El género se distribuye en las isoyetas de 300 a 900 mm y altitudes de hasta 2300 msnm, con formas de árboles con alturas de 6 a 7 m y arbustos de 2 a 3 m (Maldonado y de la Garza, 2000).

Los mezquites tienen troncos cuyo diámetro promedio es de 30 a 60 cm (puede alcanzar 1m); su corteza es de color café, gruesa y fisurada; su copa es más ancha que alta y sus ramas son glabras, con espinas estipulares con longitudes de 1 a 4 cm de largo; sus hojas son pecioladas con uno a tres pares de pinas, cada una con 10 a 20 pares de folíolos sésiles. Las flores son amarillas, dispuestas en espigas densas de 5 a 10 cm de largo, hermafroditas, actinomorfas y productoras de néctar, con un periodo de floración anual entre los meses de marzo y mayo. Los frutos, son vainas delgadas, con una longitud promedio de entre 10 a 15 cm que alojan de 5 a 10 semillas cada una; la fructificación inicia en mayo y continúa hasta agosto (Fig. 1). El periodo de desarrollo, desde la floración hasta la abscisión de los frutos maduros, dura 110 días en promedio (Calderón y Rzendowski, 2005).

Estrategias adaptativas:

Morfológicas: Reducción de la superficie foliar, ésta no es una característica fijada genéticamente, pues depende de las condiciones ambientales, especialmente de la disponibilidad de agua. Así mismo, presentan nectarios extraflorales en la parte superior del peciolo, sobre el raquis primario o secundario; la actividad de estos nectarios aumenta durante las horas del mediodía (entre las 11 y las 16 hrs.) en que la temperatura es máxima y la humedad ambiental mínima; estos nectarios sólo son funcionales en hojas jóvenes, por lo que se

piensa que funcionan como protección contra la desecación de estas, más que como agente antiherbivoría (Palacios, *et al.*, 2000).

Anatómicas: Células epidérmicas con paredes externas sumamente engrosadas; estomas hundidos y muy numerosos; mayor frecuencia de estomas en la superficie adaxial, que quedan protegidos en caso de estrés hídrico cuando los folíolos adoptan la “posición de sueño”; pubescencia y mesófilo en empalizada (Palacios, *et al.*, 2000).

Importancia Biológica:

Los mezquites han sido señalados como mejoradores del suelo, presenta defoliación y sus hojas forman un mantillo orgánico el cual es aprovechado por los vegetales que crecen bajo su docel; fija simbióticamente nitrógeno, sus raíces controlan el movimiento de dunas, sirve de hábitat para fauna silvestre, produce néctar para la elaboración de miel de abeja (Maldonado y de la Garza, 2000). Así mismo, actúa como nodriza y forma islas de fertilidad (Ruíz, *et al.*, 2008) favoreciendo el crecimiento de otras especies bajo su dosel, donde se crea un microclima que proporciona sombra, mayor retención de suelo y agua, mejores condiciones de pH, protección contra heladas, protección contra depredadores, y transferencia de nutrientes mediada por hongos micorrízicos (Reyes Quintanar *et al.*, 2000).

Usos del Mezquite:

En las regiones áridas de México el mezquite se utiliza debido a sus múltiples cualidades que permiten sea aprovechado de manera directa o transformada.

- I. **Leña:** es la de mejor calidad que se puede obtener en la región árida y semiárida del país. Es pesada y densa, presentando un alto contenido calorífico. Su combustión es estable y constante, confiriendo además un sabor agradable a los alimentos (Maldonado y de la Garza, 2000; Arias, 2000).
- II. **Carbón:** Por ser de madera dura tiene temperatura de ignición de 300 a 450° C. Actualmente su uso en cocinas está aumentando en muchos hogares, áreas recreacionales, restaurantes y otros establecimientos especializados (Maldonado y de la Garza, 2000).
- III. **Alimento:** La abundante secreción del estigma floral permite utilizarle en apicultura; un árbol puede producir néctar suficiente para 1 kg de miel de buena calidad. Las vainas contienen grandes cantidades de azúcar y proteína, por lo que son consumidas como fruta fresca o procesadas,

hervidas en su miel. Cuando la vaina esta seca son molidas obteniendo un polvo harinoso dulce con el que se elabora pinole, galletas, pan, pasteles, atole, sustituto de café, dulces compactos (piloncillos) y al fermentarlas una bebida alcohólica (Galindo-Almanza *et al.*, 2000).

- IV. **Forraje:** Las vainas y el follaje son consumidas por el ganado, especialmente durante las sequias o escasez de otros forrajes. En México cada año miles de toneladas de vainas son recolectadas de poblaciones silvestres y vendidas como forraje o concentrado en raciones para el ganado. Se estima que la producción anual de vaina en el altiplano varía de 4 a 50 kg/árbol y de 200 a 2200 kg/ha, en densidades de 25 a 445 árboles/ha; sin embargo, se considera que sólo el 15% de los árboles producen cantidades apreciables de vaina, por lo que bajo ciertas técnicas (selección genética y plantación de individuos superiores, aclareo y manejo del rodal) se pudieran incrementar los rendimientos de vaina por hectárea (Maldonado y de la Garza, 2000).
- V. **Madera:** Su dureza, color, textura estabilidad y estética de su acabado, son de importancia primaria para su uso en muebles y artesanías, fabricación de pisos, entre otras. La madera de *Prosopis spp.* es algo más dura que especies como encino (*Quercus*) y nogal (*Juglans*), ya que tienen una densidad superior a 0.7 kg/m³, su mejor cualidad es que su cambio volumétrico máximo es de 3 a 4% el cual se encuentra entre los más bajos de cualquier especie en el mundo, esto significa que prácticamente no se expande o contrae con los cambios de humedad ambiental, característica con la que supera a otras especies de maderas finas. Sin embargo, en México no existen medidas comerciales de esta madera, ya que su dureza, irregularidad de forma, etc., la hacen difícil de estandarizar y de trabajar; a pesar de que esas mismas características hacen que los artículos fabricados con ella sean muy apreciados. Por sus cualidades, el precio de esta madera debería ser 5 a 10 veces mayor que el que se paga actualmente en los Estados Unidos por la leña (Maldonado y de la Garza, 2000).
- VI. **Medicina Tradicional:** Se ha registrado su uso como antiséptico, antidisentérico, antidiarreico, emoliente y antigástrico (Maldonado y de la Garza, 2000). La corteza se usa para aliviar las molestias por picadura de abeja, el dolor de muelas y para tratar infecciones en los ojos; las raíces jóvenes son diuréticas y se usan para tratar bronquitis, reumatismo y fiebre (Arias, 2000). La resina se utiliza para matar piojos y embellecer el cabello (Orozco *et al.*, 2000).
- VII. **Fitoquímica:** La goma exudada por estos árboles es muy similar a la producida por los árboles de *Acacia Senegal* (goma arábica), la cual es utilizada extensamente como emulsificante y agente micro

Flavonoides de *Prosopis laevigata* (mezquite) inductores de genes *nod* de rizobios.

encapsulador en la industria alimentaria, así como en industrias textil, cosmética y fotográfica (Beristain y Vernon-Carter, 1995).



Figura 1. *Prosopis laevigata*: centro: individuo adulto; izquierda superior: flor; izquierda inferior: fruto (vaina); derecha superior: hojas; derecha inferior: corteza. (Fotografías de Salas-Oropeza)

2.1.3 Rizobios

La diazotrofia o capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (molecular) es exclusiva de los procariontes (Raymond *et al.*, 2004), esta capacidad está dada por el complejo enzimático nitrogenasa; el cual además de reducir nitrógeno molecular (en amonio), reduce otros sustratos como acetileno, azidas y cianuros. Esta enzima se inactiva en presencia de oxígeno (Zehr *et al.*, 2003). Los procariontes diazótrofos están ampliamente distribuidos en grupos parafiléticos con diferentes estilos de vida y metabolismos que incluyen: aerobios, anaerobios, autótrofos, heterótrofos, metanótrofos, como células individuales o en filamentos, en vida libre y en simbiosis (Raymond *et al.*, 2004).

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) en arqueas ocurre solamente dentro del reino Euryarchaeota, en las divisiones Methanosarcinales, Methanobacteriales, Halobacteriales, y Methanococcales, y en Bacteria ocurre en 6 de los más de 50 phyla bacterianos descritos hasta el momento. Esos seis phyla incluyen organismos cultivables en los que la fijación de nitrógeno ha sido demostrada bioquímicamente, por la presencia del operón *nifHDK* (que codifica para el complejo nitrogenasa), por su amplificación o su identificación por homología con genomas secuenciados. Este recuento corresponde a diazótrofos que han sido cultivados, sin embargo, existen otros phyla que podrían estar representados en la gran cantidad de secuencias del gen *nifH* de diazótrofos no cultivables reportadas. Los 6 phyla de diazótrofos bacterianos son: las bacterias verdes del azufre, cianobacterias, Gram positivas de bajo y alto contenido de G+C, Spirochaetes, Firmicutes y Proteobacteria. Esta última es la división bacteriana más abundante y a la que se afilian todos los rizobios (Lloret *et al.*, 2005).

Las asociaciones que permiten la FBN simbiótica incluye tres tipos de interacciones: 1) **heterocistos** de las cianobacterias que ocupan tejidos de hepáticas, helechos, cícadasy dicotiledóneas; 2) **actinomicetos** representados por *Frankia*, que forma nódulos con muchas plantas no leguminosas de varias familias, incluyendo los géneros *Alnus*, y *Prusia*; 3) **rizobios** que forman nódulos en muchas leguminosas y excepcionalmente con una no leguminosa, *Parasponia*, miembro de la familia Ulmaceae (Lloret *et al.*, 2005).

La fijación simbiótica de nitrógeno se lleva a cabo dentro de estructuras especializadas llamadas nódulos, estas se localizan principalmente en el cortex radicular y excepcionalmente en tallo. Hay dos tipos de nódulos: 1) indeterminados, que conservan el meristemo, cuya actividad continua causa que las células del nódulo formen un gradiente de desarrollo, que va del meristemo distal hacia el sitio de unión de la raíz proximal; por lo que, normalmente, tienen formas ramificadas; y 2) determinados, que no conservan el meristemo, normalmente tienen forma semiesférica (Gualtieri y Bisseling 2000).

En el caso de la interacción, donde participan leguminosas y bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Methilobacterium*, colectivamente llamados rizobios (Ba *et al.*, 2002), la formación de los nódulos está regulada por un intercambio mutuo de señales químicas (Redmond *et al.*, 1986, Guerreiro *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2000; Maj *et al.*, 2008), que ha sido denominado “diálogo molecular” (Dénarié *et al.*, 1993).

La primera señal en este diálogo es enviada por las plantas, secretando compuestos específicos, que atraen a los rizobios. Algunos de los compuestos más importantes son los flavonoides (Rossen *et al.*, 1985; Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986; Djordjevic *et al.*, 1987; Caetano-Anolles *et al.*, 1988), betainas, ácido aldónico, xantonas, compuestos fenólicos simples y jasmonatos, los cuales activan una serie de genes de nodulación en las bacterias (Cooper, 2007). El proceso comienza con el enroscamiento de un pelo radical, al mismo tiempo que la pared celular es localmente hidrolizada, y la membrana plasmática sufre invaginación. Materiales nuevos de pared celular son depositados en el sitio de infección formando una estructura similar a un tubo, llamada “hilo de infección”, por la cual las bacterias penetran. El hilo de infección puede atravesar varias capas de células corticales cuando el primordio de nódulo se ha formado en las capas interiores de la raíz. Mediante un mecanismo similar a la endocitosis las bacterias son liberadas desde el hilo de infección al citoplasma de las células vegetales, en estas condiciones, las bacterias se dividen de forma continua y sincronizada; cuando se detienen, las bacterias quedan convertidas en bacteroides, rodeados por una membrana peribacteroidal (originada por la planta), formando los simbiosomas (Gualtieri y Bisseling 2000). Los bacteroides pueden llegar a ser hasta 40 veces más grandes que los bacilos a partir de los que se desarrollan, y se encuentran varios miles en una célula vegetal. La fijación de nitrógeno se inicia cuando se han formado los bacteroides.

En general, el proceso puede resumirse de la siguiente manera (Fig. 2):

1. En el suelo existen rizobios de vida libre.
2. La planta hospedera exuda sustancias químicas atrayentes de rizobios.
3. Los rizobios son dirigidos hacia un pelo radical hasta alcanzar una concentración adecuada (quórum), donde inicia el proceso de infección.
4. El pelo radical sufre un enroscamiento.
5. Se forma el hilo de infección.
6. Las bacterias penetran por el hilo de infección hacia el córtex radical.
7. Inicio de divisiones continuas de las bacterias en el citoplasma vegetal.
8. Formación de los simbiosomas.

9. Las bacterias pasan a bacteroides e inicia la fijación del nitrógeno.

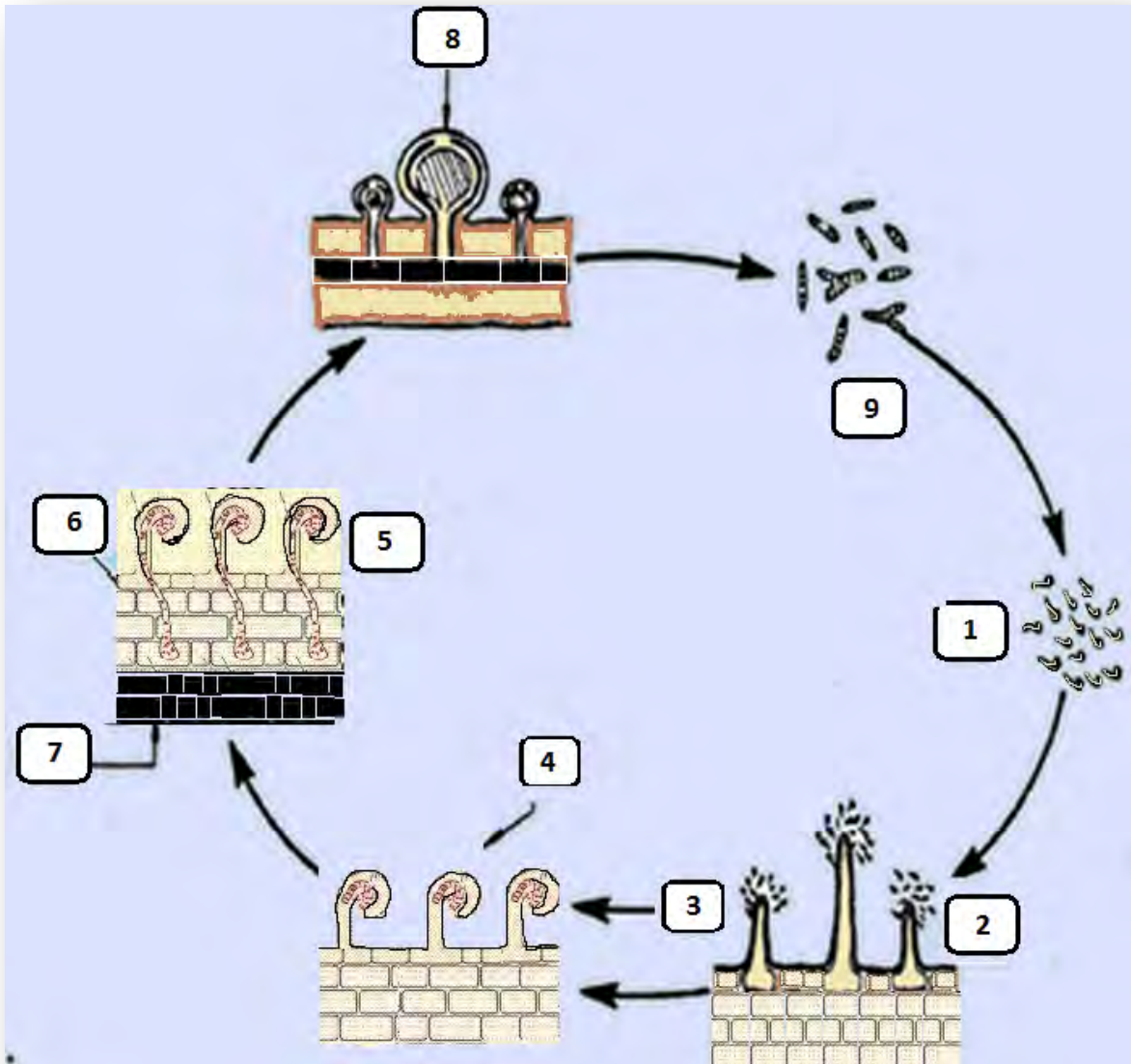


Figura 2 Esquema resumido del proceso de nodulación. 1. Rizobios de vida libre. 2. Las bacterias son atraídas por la planta. 3. Inicio del proceso de infección en un pelo radical. 4. Enroscamiento de pelo radical. 5. Formación del hilo de infección. 6. Las bacterias penetran hasta el cortex radical. 7. Las bacterias se dividen en citoplasma vegetal. 8. Se forman simbiosomas. 9. Las bacterias se convierten en bacteroides.

2.1.3 Flavonoides y Genes *nod*

El término “genes *nod*” se aplica en forma genérica a todos los genes involucrados en la nodulación, conforme han sido identificados, se les han asignado letras del alfabeto. Las letras del alfabeto no fueron suficientes para nombrarlos, por lo que fue necesario nuevas rondas y otra designación de código de tres letras. Los genes *nod* corresponden a la primera ronda, los genes *noI* a la segunda, los genes *noE* a la tercera.

Los genes de nodulación (leguminosa-rizobio) han sido clasificados en tres categorías: I) genes de nodulación comunes *nodABC*, esenciales para la nodulación, II) genes hospedero-específicos (*nodFE*, *nodH*, *nodG*, *nodPQ*, y otros), determinan el alcance de hospederos del micro simbiote e influye en el índice y frecuencia de formación de nódulos; y III) una familia de regulación, los genes *nodD* (Maj *et al.*, 2008).

Como ya se mencionó, la primera señal entre la planta hospedera y el simbiote se compone de flavonoides producidos por la planta, estos son necesarios para la inducción de los genes *nod* (Rossen, *et al.*, 1985); ya que influyen sobre el ADN productor de factores NodD, proteínas pertenecientes a la familia LysR de regulación transcripcional. NodD junto con un flavonoide específico se unen a una secuencia conservada arriba del operón *nod*, llamada caja *nod*, actuando como activador transcripcional de varios promotores de genes *nod*. Los genes *nod* controlan la biosíntesis de lipopolisacáridos llamados factores Nod, que son secretados por las bacterias y provocan múltiples respuestas para la nodulación; tales como la formación del hilo de infección, y las primeras etapas de formación del nódulo (Jones *et al.*, 2007). La división de las células primordiales del nódulo, es precedida por la inhibición del transporte de auxinas, causado por un flavonoide endógeno de raíz, lo cual indica que estos compuestos juegan un rol crucial en la formación del primordio de nódulo (Mathesius *et al.*, 1998; Wasson *et al.*, 2006; Subramanian *et al.*, 2006). Se ha descubierto que los flavonoides pueden provocar uno de dos cambios más; el primero inducir la biosíntesis de proteínas (Nops) secretadas por un sistema tipo III, y el segundo causa cambios en los polisacáridos de superficie de los rizobios. (Le Queré *et al.*, 2006; López-Baena *et al.*, 2008).

Se asume que la interacción entre NodD y los flavonoides es específica; sin embargo, los genes *nod* de diferentes rizobios pueden responder a diferentes juegos de flavonoides. Pero también se ha observado que algunos flavonoides de extractos de raíces o semillas pueden ser inefectivos e, incluso, inhibir la nodulación. Así la mezcla de flavonoides y otros compuestos, exudados por las raíces, son considerados las señales que influyen en la capacidad de los rizobios para colonizar la raíz, sobrevivir en la rizosfera, la competitividad de rizobios y las interacciones simbióticas con leguminosas (Cooper, 2007). Por otra parte, existen evidencias de

que la introducción de inductores exógenos incrementa la nodulación en algunas especies de leguminosas (Kapulnik *et al.*, 1987; Hungría y Phillips; 1993; Zhang y Smith; 1995, 1996; Begum *et al.*, 2001).

Los factores de Nod son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina N-acilados, cuya estructura fue descrita en *Rhizobium meliloti* (clasificado actualmente como *Sinorhizobium meliloti*) y, posteriormente, han sido descritas en otros rizobios. Se componen de una estructura básica y modificaciones o decoraciones en los extremos reductor y no reductor. La estructura básica es sintetizada por el producto de los genes *nodABC* que están presentes en todos los rizobios, y sus decoraciones incluyen: metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones, que pueden variar en cada especie y biovariedad de rizobio. A las decoraciones de los factores Nod y al gen *nodD* se les atribuye la especificidad o promiscuidad de la interacción con su hospedero (Spaink *et al.*, 1987; van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Broughton, *et al.*, 2000).

La coevolución de rizobios y leguminosas ha llevado a la especialización de los factores Nod, con una amplia gama de decoraciones para adecuarse a un hospedero, como el caso de *Azorhizobium caulinodans*, que sólo nodula a *Sesbania rostrata*, o el extremo opuesto *Sinorhizobium* sp. NGR234, la cepa con la mayor promiscuidad, que abarca un amplio rango de hospederos, nodula a 232 (51%) de 452 leguminosas probadas (Lloret *et al.*, 2005). Probablemente la forma ancestral de los factores Nod fue promiscua, y conforme el rizobio fue coevolucionando con su hospedero, el juego de señales de la pareja se fue especializando para producir las relaciones de promiscuidad o especificidad (Broughton y Perret, 2000). Los rizobios hospederos específicos (sin importar su posición filogenética), presentan como requisito que las plantas posean ácidos grasos poli insaturados para la acilación de los factores Nod; sin embargo, sus hospederos, pertenecen a tribus relacionadas filogenéticamente dentro de la subfamilia Papilionoideae, por lo que la poli insaturación del grupo acilo de los factores Nod puede ser considerado como una especialización en algunos representantes herbáceos de esta subfamilia, mientras que la promiscuidad podría ser considerada como un carácter ancestral. Aunque la planta hospedera sea promiscua, existen preferencias por un determinado tipo de decoración en el factor Nod del rizobio (Lloret *et al.*, 2005).

Las investigaciones sobre flavonoides, a partir del descubrimiento de sus funciones inductoras de genes *nod*, han servido para resaltar la importancia de su contribución al “diálogo” planta-rizobio. Hoy se sabe que además de inducir la expresión de genes *nod* y la síntesis de factores Nod, también activan la producción de proteínas y otros compuestos, tales como los polisacáridos superficiales de rizobios, necesarios para una endosimbiosis exitosa; también pueden ser modificados durante o después de su síntesis. Además, flavonoides de raíz endógenos actúan como señales de desarrollo, inhibiendo el transporte de auxinas hacia el sitio de organogénesis nodular. En la figura 3 se muestra el resumen esquemático de las primeras etapas de la nodulación.

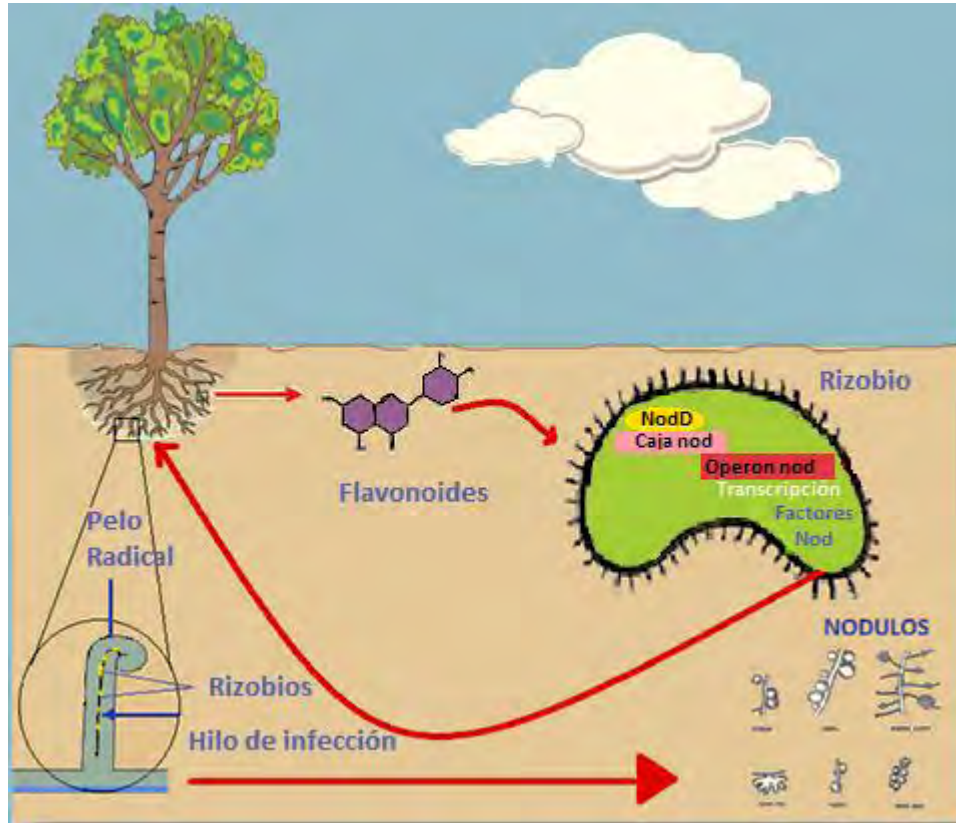


Figura 3 Esquema del “diálogo” químico entre plantas leguminosas y rizobios. 1. La planta exuda compuestos entre los que hay flavonoides. 2. El o los flavonoides atrae a los rizobios. 3. Nod D junto con un flavonoide específico unen una secuencia conservada arriba del operon *nod*. 4. La bacteria produce factores *Nod* y son secretados hacia la planta. 5. Como respuesta a los factores *Nod*, un pelo radical sufre un enroscamiento y posteriormente forma el hilo de infección, por donde las bacterias penetran hasta el cortex, iniciando la organogénesis nodular.

3. Antecedentes

En 1989, Waldon y colaboradores obtuvieron y caracterizaron, mediante 61 pruebas nutricionales y bioquímicas, una colección de 74 rizobios aislados de nódulos de 3 leguminosas leñosas del desierto: *Prosopis glandulosa*, *Psoralea argyrea*, y *Acacia constricta*. Encontrando que las características de respuesta de las bacterias a condiciones nutrimentales, de pH, temperatura y nutrimental, fueron distintas en los aislados de cada planta, sin importar que fueran procedentes de nódulos de la misma profundidad. Por lo cual, concluyeron que estos microorganismos presentan adaptaciones particulares dependientes del hospedero en que se desarrollan.

En 1991, Hungría y sus colaboradores, encontraron tres flavonoides inductores de genes *nod* en exudados de raíces jóvenes de *Phaseolus vulgaris*. Los flavonoides identificados fueron: eridictiol, 7-O-glicosido de genisteína y naringenina.

Con el fin de comparar la eficiencia de asimilación de nitrógeno fijado simbióticamente contra del uso de fertilizantes convencionales. Aiazzi, Argiello y Abril, en 1996, compararon el carbono y nitrógeno en plantas de la especie *Prosopis chilensis*, noduladas, no noduladas y con aplicación de fertilizantes. Al evaluar la acumulación de materia seca, encontraron que tanto las plantas noduladas como las que fueron fertilizadas acumularon nitrógeno con valores semejantes, por lo cual, concluyeron que la fijación biológica de nitrógeno es eficiente en estas especies y, por tanto, podría ser usada en sistemas de suelos empobrecidos.

Bragg y colaboradores, en 1978, analizaron el perfil de flavonoides de varias especies del género *Prosopis* (*P. juliflora*, *P. glandulosa* var. *glandulosa* y *Prosopis laevigata* var. *torreyana*, *Prosopis laevigata* y *P. velutina*, *P. articulata*) encontrando un total de 21 flavonoides, de los cuales 12 fueron identificados (.6 flavonas: apigenina, luteolina, apigenina 6,8-di-C-glicosidos, chrisoeriol 7-O-glicosido, luteolina 7-O-glicoside y 6 flavonoles: kaempferol 3-O-methyl éter, quercetina 3-O-metil éter, isoramnetina 3-O-glicosido, isoramnetina 3-O-rutinosido, quercetina 3-O-rutinoside, and quercetina 3-O-diglicosido (glucosa, arabinosa). No encontraron correlación entre el patrón de compuestos y el ecotipo del que procedían las plantas.

El efecto de la inoculación con *Rhizobium tropici*, *R. etli* y *R. leguminosarium* sobre la concentración de seis flavonoides (daidzeína, cumestrol, naringenina, genisteína, licuiritigenina e isolicurritigenina), inductores de genes *nod* de *Phaseolus vulgaris*, fue evaluada en 1997 por Bolaños y Warner, encontraron que los

compuestos dominantes en exudados de raíz de *Phaseolus vulgaris* son: daidzeina, cumestrol y naringenina; la concentración de daidzeina y naringenina aumenta después de la inoculación.

En el 2000, Reyes y un grupo de colaboradores, analizaron la riqueza de especies microbianas presentes en la asociación *Neobuxbaumia tetetzo* y leguminosas arbóreas, en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Al comparar la rizosfera de plantas agrupadas (mezquites y tetechos) contra plantas aisladas, encontraron que, en el primer caso, la riqueza de microorganismos de la interrzosfera fue mayor que en plantas aisladas; mientras que el porcentaje de micorrización fue mayor en las plantas en suelo erosionado. Por lo que sugieren que las poblaciones microbianas (tanto de bacterias como de micorrizas) presentan diferencias debido a los productos químicos de las raíces vegetales.

En el 2006, Antunes y colaboradores, reportaron el primer estudio en el que se evaluó la coinoculación de *Bradyrhizobium japonicum*, hongos micorrízicos arbusculares y plantas de soya. En este trabajo se identificaron tres flavonoides (daidzeina, genisteina y cumestrol) como posibles señales reguladoras del establecimiento de la simbiosis tripartita; aunque no quedó claro si la acumulación de flavonoides fue debida a las modificaciones en el suelo o una respuesta a la inoculación microbiana.

Herrera-Arreola y su equipo de trabajo, en 2007, investigaron en qué grado la hojarasca de mezquite (*Prosopis juliflora*), huizache (*Acacia farnesiana*) y uña de gato (*Mimosa biuncifera*), tres leguminosas fijadoras de nitrógeno, contribuyen a la dinámica de carbono (C) y nitrógeno (N) en el suelo. Analizaron muestras de suelo dentro y fuera del dosel. De esta manera, se determinó que el contenido de hemi celulosa y N de las hojas de uña de gato fue menor, mientras que la lignina y polifenoles fue mayor; concluyeron que el mezquite aporta el mayor porcentaje de carbono.

Haase y colaboradores realizaron un trabajo en el 2007, donde sometieron plántulas de *Phaseolus vulgaris* a altas concentraciones de CO₂ atmosférico y baja disponibilidad de nitrógeno en suelo. Evaluaron la composición y concentración de exudados de raíces. Así, demostraron que al aumentar la concentración de CO₂, se estimula la exudación de azúcares y otros compuestos atrayentes de rizobios. Así mismo, observaron que en tales condiciones, las plántulas acumulan malato, considerado una buena fuente de carbono para el micro simbiote y desarrollo de los nódulos. La producción de flavonoides inductores de genes *nod* (genisteina, daidzeina, cumestrol), también se vio estimulada al aumentar el CO₂, pero fue independiente del suministro de nitrógeno.

En 2007, Reyes-Reyes y colaboradores, compararon la Biomasa Microbiana de suelos que conservan vegetación nativa, con suelos que han sido limpiados para cultivo de maíz en tierras altas de México, Analizaron suelo bajo el dosel de dos especies fijadores de nitrógeno, mezquite (*Prosopis laevigata*) y huizache (*Acacia tortuosa*), y de suelo de campos cultivados con maíz y una zona libre de vegetación. La biomasa microbiana (medida en carbono) en el suelo agrícola fue de 122 mg de C por kg de muestra, y de 373 mg en las muestras de mezquite. En el análisis de N, se encontraron 11 mg por kg de muestra en suelo agrícola, y 116 mg para suelo muestreado bajo mezquite. Además, encontraron que el coeficiente metabólico decayó en el siguiente orden: suelo sin vegetación > mezquite > huizache > suelo agrícola; y la relación biomasa microbiana: C orgánico en suelo decae en el siguiente orden: mezquite > huizache > suelo sin vegetación > suelo agrícola. Con los resultados encontrados, los autores concluyen que el cambio de suelo a uso agrícola no solo puede ser perjudicial para su calidad, sino que también insostenible.

La diversidad de microorganismos cultivables instalados en islas de fertilidad de *Prosopis laevigata* y *Pachycereus hollianus*, fue evaluada en 2008, por Ruíz *et al.*, en suelos degradados de Zapotitlán Salinas, Puebla. Encontrando bacterias de los géneros: *Rhizobium* y *Streptomyces*. Concluyen que las islas de fertilidad de *Prosopis laevigata* son la fuente de nutrientes responsable de buena parte de la actividad microbiana en estos suelos.

La distribución vertical de las comunidades microbianas que se desarrollan bajo el dosel de *Prosopis laevigata* y *Parkinsonia praecox*, fue evaluada en los suelos de Tehuacán, Puebla, México por Rodríguez-Zaragoza y colaboradores, en el 2008. Al comparar la diferencia en abundancia entre suelo desnudo y bajo el dosel, se demostró que el total de bacterias, hongos y diazótrofos heterótrofos es mayor bajo los árboles. Al mismo tiempo, determinaron que la actividad diazotrofa heterotrófica fue mayor bajo *P. praecox* que bajo *P. laevigata*. Por lo que concluyeron que las diferencias fenológicas de estas plantas no afectan el número de microorganismos, y que la elevada actividad de nitrogenasa bajo el dosel de *P. praecox* puede influir en la distribución de nitrógeno en estos ambientes.

En un estudio de Maj y colaboradores, del 2008, se valoraron las respuestas a flavonoides expresadas por rizobios en sus capacidades competitivas y actividad simbiótica general. Para ello, emplearon estándares comerciales de flavonoides y promotores exudados por semillas de trébol, chícharo, frijol y arvejas. Observaron que los exudados de semillas de trébol y arveja, así como los estándares de naringenina y hesperina funcionaron mejor en la inducción del promotor *nodA*.

Para demostrar la importancia de los parches de vegetación en zonas áridas y semiáridas, en 2009, Vásquez-Méndez y colaboradores utilizaron parcelas de USLE-type, modificadas para muestrear parches de vegetación con individuos predominantes de las especies: Huizache (*Acacia sp.*), Mezquite (*Prosopis sp.*), Nopal (*Opuntia sp.*) y Cardón (*Opuntia imbricata*). Además compararon la erosión, escorrentía y algunas propiedades físicas del suelo con cubierta vegetal y suelo desnudo, en una zona semiárida del centro de México (Querétaro). Sus resultados mostraron que la erosión del suelo difiere con las condiciones de la vegetación, disminuye cuando el dosel y la cobertura aumentan. Así mismo, encontraron que la escorrentía se redujo en 87%, 87% y 98% y la pérdida de suelo 97%, 93% y 99% para *Acacia farnesiana*, *Prosopis laevigata* y *Opuntia sp.*, respectivamente. Concluyeron que los parches de vegetación tienen un efecto positivo en los procesos hidrológicos superficiales.

En 2009, Salas realizó un trabajo, en el cual se sometieron plántulas de *Prosopis laevigata* a suministros limitantes de nitrógeno, para evaluar si la deficiencia de este elemento afectaba la acumulación de compuestos fenólicos en la planta. Al analizar extractos metanólicos de tejidos de raíz, tallo y hojas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se determinó la presencia de 12 flavonoides en tejidos: 2 derivados de apigenina, 3 de genisteína, 6 de quercetina y 1 flavona.

Pérez-Montaña y colaboradores, publicaron en 2011 un trabajo en el que demostraron que tres cepas de rizobios (*Sinorhizobium fredii* SMH12, *Rhizobium etli* ISP42 y *Rhizobium sllae* IS123), con diferentes rangos de nodulación, producen un patrón similar de moléculas AHL, compartiendo la producción de N-octanoilo homoserina lactona y 3-oxo y/o 3-hidroxi derivados. Adicionalmente, encontraron que la producción de AHLs fue promovida cuando los rizobios fueron crecidos en presencia de sus respectivos flavonoides inductores de genes *nod*; mientras que *S. fredii*, produjo una molécula diferente (C14-HSL) al ser tratada con genisteína. Además, la expresión de los genes *tral* de síntesis de AHL de *S. fredii* SMH12, *cinI* y *rail* de *R. etli* ISP42 aumentó cuando se induce con los flavonoides.

4. Justificación

Prosopis laevigata es una leguminosa importante debido a sus usos y como componente arbóreo de zonas áridas y semiáridas, en las cuales es común que los suelos contengan niveles pobres en nitrógeno, por lo que la fijación biológica de nitrógeno juega un papel primordial en el desarrollo vegetal. Tomando en cuenta lo anterior, se justifica la realización de trabajos de investigación que contribuyan al conocimiento de este proceso.

5. Hipótesis

Prosopis laevigata es una leguminosa que nodula con rizobios, la interacción inicia con un diálogo químico entre la planta y las bacterias, se ha señalado a los flavonoides como sustancias importantes en este diálogo ya algunos inducen genes *nod* de los rizobios; por ello, se espera que al adicionar al medio de cultivo de rizobios, flavonoides extraídos de exudados de semillas de *Prosopis laevigata*, se transcriban dichos genes.

6. Objetivos

Objetivo general:

- Evaluar la capacidad inductora de genes de nodulación de flavonoides producidos por *Prosopis laevigata*.

Objetivos particulares:

- Verificar la capacidad nodulante de *Prosopis laevigata* y una cepa de *Rhizobium* silvestre.
- Purificar y caracterizar cepas aisladas de nódulos de mezquite (*Prosopis laevigata* y *Prosopis* sp.).
- Determinar los compuestos de exudados de semillas de *Prosopis laevigata*.

7. Materiales y Métodos

7.1 Área de Estudio

La provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es considerada parte de la región xerófila mexicana (Rzedowski, 1978). Está localizada en la porción sur del estado de Puebla y norte del estado de Oaxaca. Limita al este con las Sierras de Atzingo y Miahuatpec, al norte con los cerros Chacateca y Pajarito, al Oeste con los cerros Gordo y Otate, y al sur con los cerros Yistepec y Acatepec (Osorio-Betancourt, 1996, citado por López-Galindo *et al.*, 2003). Tiene una superficie aproximada de 270 km², se ubica entre los 18° 12' y 18° 24' de latitud norte, y entre los 97° 24' y 97° 36' de longitud oeste, con un rango altitudinal de 1, 460 a 2, 600 msnm. Es considerada una región semiárida; el clima, de acuerdo con la clasificación de Köpen, modificada por García (1973) es seco semicálido, con lluvias en verano (BS o hw), con poca oscilación térmica que va entre 5 y 7 °C, y la temperatura media fluctúa entre 17.6 y 23.7 °C. El mes más cálido se presenta antes del solsticio de verano, con régimen de lluvias de verano, presencia de una canícula a mitad del periodo de lluvias, y con una precipitación media anual de 412.4 mm (López-Galindo *et al.*, 2003), con una temperatura media anual de 21° C y una sequía interestival a la mitad del período de lluvias; la precipitación media anual es de 420 mm. Las condiciones áridas del Valle son, principalmente, resultado del efecto de sombra orográfica producido por la Sierra Madre Oriental (ver fig. 4).

El valle pertenece a la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur, sub provincias Sierras centrales de Oaxaca, dentro de la región de la Alta Mixteca y la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Desde el punto de vista edáfico, los suelos son someros y pedregosos en la mayor parte del área. Las principales unidades de suelo reportadas son: litosoles, cambisoles cálcicos, y xerosoles cálcicos. La comunidad vegetal dominante en la zona es el matorral xerófilo, en el que dominan las tetecheras por la presencia de *Neobuxbaumia tetetzo* (tetecho), complementado con otros elementos florísticos importantes, tales como: *Prosopis laevigata* (mezquite), *Fouquieria formosa* (ocotillo), *Cercidium praecox* (palo verde) y *Beucarnea gracilis* (sotolín) (Valiente-Banuet, *et al.* 2000).

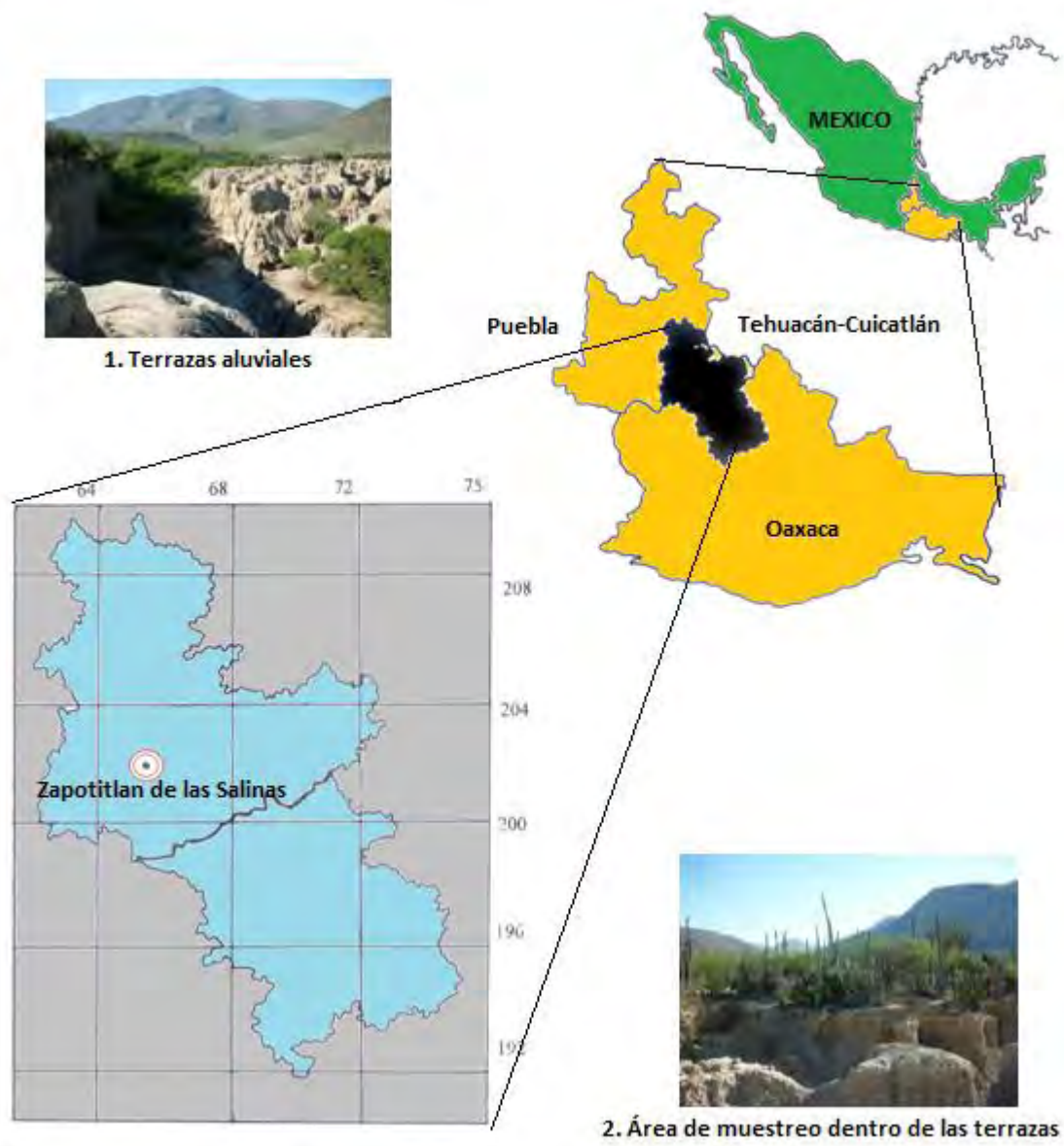


Figura 4. Ubicación geográfica de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México.

7.2 Recolecta de semillas

La selección de las plantas para obtención de semillas consideró el fenotipo, así como el estado físico general del árbol. La recolecta del germoplasma se realizó manualmente, cortando las vainas de las ramas o recogiénolas del suelo. Posteriormente, la vaina se fragmentó en pequeños segmentos, se retiró el pericarpio y mesocarpio. Para retirar el endocarpio se utilizaron pinzas, para obtener la semilla sin daño.

7.3 Recolecta de suelo

El suelo se recolectó de la zona de raíces (bajo el dosel) de individuos jóvenes de *Prosopis laevigata* (10 muestras), tomándolo de una profundidad aproximada de 0 a 20 cm. El suelo se colocó en bolsas con cierre, se etiquetó y se trasladado al laboratorio.

7.4 Análisis químico del suelo

Para la cuantificación de fósforo se utilizó el método modificado de Tausky y Shorr; mientras que para nitrógeno se empleó la técnica de Micro-Kjeldahl (modificada por Bremner, 1965, tomado de Muñoz *et al.*, 2000), el resto de los elementos C, K, Ca, O, Fe, Mg, Al, Si, K y Ca se analizaron mediante microscopio electrónico de barrido (SEM), complementado por un micro analizador por dispersión de energía (EDX), el cuál hace un análisis de rayos x, usando espectrómetro de energía dispersiva (SDS) modelo INCAx-sisht de Oxford Instrument, acoplado a un microscopio JOEL modelo JSM-6380LV; centrado sobre muestras de suelo que ha sido compactado con una prensa hidráulica a 40 kg/cm² para formar una pastilla. Finalmente, se midió el pH del suelo, suspendiéndolo en agua destilada y utilizando potenciómetro. Para cada análisis se hicieron 5 repeticiones y los resultados se promediaron.

7.5 Aislamiento de cepas bacterianas

Una de las cepas silvestres fue aislada a partir de nódulos de plántulas cultivadas en suelo recolectado en el área estudio. El suelo fue mezclado con arena estéril en la siguiente proporción, por cada 100 g de mezcla: 13.60 g. de suelo y 86.40 g. de arena; de esta manera, el porcentaje de nitrógeno inicial fue 0.032% (extremadamente pobre, según parámetros de S. A. R. H., 1970). Las macetas fueron regadas con solución nutritiva Hoagland modificada libre de nitrógeno (ver anexo 1). Así mismo, algunas plántulas de *Prosopis laevigata* fueron sembradas junto con plántulas de *Phaseolus vulgaris* para verificar la presencia de *Rhizobium etli*. Las plántulas fueron inspeccionadas a los 40, 60, 70, 80 y 120 días para verificar la formación de nódulos.

Por otro lado, con apoyo del Dr. Víctor Olalde Portugal, responsable del laboratorio de Bioquímica Ecológica del CINVESTAV Irapuato, Guanajuato, México, se muestrearon plántulas de *Prosopis laevigata* y *Prosopis laevigata* var *andicola*. A partir de los nódulos de ambas se aislaron cepas de rizobios, utilizando la técnica de siembra en estría y punto, en medio extracto de levadura-manitol-agar-rojo Congo (ELMARC). (Ver Anexo 1).

7.6 Purificación y caracterización bioquímica de cepas bacterianas

Las bacterias se sembraron en estría en medio ELMARC, con doble finalidad: la primera, obtener colonias aisladas y caracterizar la morfología colonial (macroscópica) de las bacterias; y la segunda, verificar la incorporación del colorante (rojo Congo) en las colonias. Se verificó la velocidad de crecimiento, revisándolas cada 24 horas.

Para confirmar el tipo de crecimiento (rápido o lento), se probó la producción de ácido o álcali, sembrándolas en forma de "S", en medio extracto de levadura-manitol-agar-azul de bromotimol (ELMABT). Después de 4 días se observó el viraje del color del medio.

La pureza de las cepas, se probó en leche tornasolada y en medio glucosa-peptona-agar-púrpura de bromocresol (GPA).

La Morfología microscópica se determinó mediante la tinción de Gram y, posteriormente, se observó al microscopio óptico.

7.7 Determinación taxonómica molecular

La determinación taxonómica de las cepas se realizó mediante el análisis de rRNA 16 S, utilizando los cebadores: rD1 (cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC) y fD1 (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) (Young *et al.*, 1991), se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) con programas térmicos, que incluían desnaturalización inicial por 5 minutos a 95° C, seguido de 30 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 94° por 45 segundos; alineamiento 56° por 45 segundos y elongación a 72 °C por 2 minutos, Las reacciones terminaron con un ciclo a 72° por 5 minutos. La mezcla para las reacciones fue: Agua (bidestilada y estéril) 20 µl; 10x buffer con Mg²⁺ 2.5 µl (en dilución 15 mM de MgCl²), dNTP (en mezcla 10 mM) 2 µl; cebador directo 1 µl (en dilución a 10 mM); cebador reverso 1 µl (en dilución a 10 mM), Taq DNA polimerasa (KapaTaq) 0.5 µl (5 unidades/µl) y una asada de la colonia

bacteriana. Las reacciones se realizaron en un termociclador (Corbet Palm Cycler USA). Una alícuota de los productos de las reacciones se utilizó para verificar la presencia, la calidad y la cantidad de los amplificadores mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El resto fue secuenciado utilizando el sistema BigDye terminator, versión 3.1 sequencing kit Part. No. 4346917, y el equipo 3100 genetic analyzer de Applied Biosystems, en un soporte de polímero DT3100 pop6 con 50 cm de longitud¹, en el laboratorio de Secuenciación de ADN de la UBIPRO FES Iztacala. Los electroferogramas fueron visualizados y editados con el programa Chromas Versión Pro 1.5. Las secuencias fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la herramienta "BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente se recuperaron las cinco secuencias con mayor índice de similitud (mayor a 95% ver cuadro 1), con las cuales se realizó una serie de alineamientos múltiples, utilizando el software Clustal W (Thompson, *et al.*, 1997), mismos que posteriormente fueron editados con el paquete SEAWIEW (Gouy *et al.*, 2010), para que las secuencias fueran del mismo tamaño. Los alineamientos fueron evaluados por el método de suma de pares con el programa GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997). El alineamiento con el puntaje mayor fue utilizado para construir dendrogramas por distancia genética, utilizando el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.* 2011) y el método Test Neighbor Joining. Se compararon los dendrogramas generados por diversos modelos de distancia (No of differences, Jukes-Cantor model, Kimura 2-parameter model, Tajima-Nei model, Tamura 3-parámetros model, Tamura-Nei model, Maximum Composite likelihood, logDet [tamura-Kumar]); con robustez (bootstrap) 10 000 iteraciones en cada caso.

¹ M. en C. Alejandro C. Monsalvo-Reyes

Cuadro 1. Información de las cepas utilizadas para la construcción del dendrograma comparativo de géneros de rizobios.

CLAVE DE ACCESO	NOMBRE DE LA CEPA Y FRAGMENTO SECUENCIADO	TAMAÑO DE FRAGMENTO Y FUENTE DE LA CEPA
JF970343	<i>Rhizobium</i> sp. AC93c 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,351 bp genomic DNA. country: Ethiopia. isolation_source: root nodule.
JF970332.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC89e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,356 bp genomic DNA. country: Ethiopia. isolation_source: root nodule
JF970341.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC93a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,352 bp genomic DNA. country: Ethiopia. isolation_source: root nodule.
JF970345.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC93e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,353 bp genomic DNA. country: Ethiopia. isolation_source: root nodule.
JF970342.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC93b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,352 bp genomic DNA. country: Ethiopia. isolation_source: root nodule
JF330110.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,405 bp genomic DNA. isolation_source: root nodules
JF330109.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU226 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,399 bp genomic DNA. isolation_source: root nodules
JN009835.1	<i>Sinorhizobium americanum</i> strain ENCBTM 31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,426 bp genomic DNA. lab_host: <i>Acacia farnesiana</i> . country: Mexico: Morelos, Ticuman. isolation_source: nodule of acacia. collection_date: 21-Apr-2008. collected_by: E. Amora. identified_by: E. Gomez.
JN009837.1	<i>Sinorhizobium americanum</i> strain ENCBTM 43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,430 bp genomic DNA. lab_host: <i>Acacia farnesiana</i> . country: Mexico: Morelos, Ticuman. isolation_source: nodule of acacia. collection_date: 21-Apr-2008. collected_by: E. Amora. identified_by: E. Gomez.
JN009834.1	<i>Sinorhizobium americanum</i> strain ENCBTM 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,428 bp genomic DNA. lab_host: <i>Acacia farnesiana</i> . country: Mexico: Morelos, Ticuman. isolation_source: nodule of acacia. collection_date: 21-Apr-2008. collected_by: E. Amora. identified_by: E. Gomez.
AJ007857.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. HB5A4 16S rRNA gene	1,418 bp genomic DNA
D84639.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S24538 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1,445 bp genomic DNA.
D84623.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S23423 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1,445 bp genomic DNA.
D84631.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S23442 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1,445 bp genomic DNA
JN180119.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. BKBLUK2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1,349 bp genomic DNA

7.8 Pruebas de nodulación

Se preparó un inóculo con bacterias crecidas por 72 horas en medio caldo extracto de levadura y manitol CELM (en concentración de 10^9 cel/ml). Para cada cepa se inocularon 10 plántulas, recién germinadas, con 1 mililitro de cultivo bacteriano; y 10 plántulas más formaron el grupo control (sin inóculo). Las plántulas fueron crecidas en recipientes con agrolita y regadas, a 80% de capacidad de campo, con solución Hoagland modificada libre de nitrógeno. Las plántulas fueron monitoreadas en busca de nódulos a los 48 y 140 días.

7.9 Parámetros fotosintéticos

El estado fisiológico de las plantas inoculadas fue monitoreado midiendo parámetros fotosintéticos: tasa fotosintética, concentración celular de CO_2 , apertura estomática y transpiración; utilizando un analizador infrarrojo de CO_2 (IRGA por sus siglas en inglés), marca Li-COR modelo Li-6400. La radiación fotosintéticamente activa (PAR por sus siglas en inglés) fue de $1000 \mu\text{Mol/m}^2 \text{s}^{-1}$; la temperatura en la cámara se fijó en 20°C .

7.10 Exudados de semillas

Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en etanol al 96% por 1 minuto, transcurrido este tiempo, fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Una vez lavadas, se procedió a la escarificación con ácido sulfúrico concentrado por 15 minutos; el ácido fue neutralizado con bicarbonato de sodio y enjuagadas con agua destilada estéril. Una vez escarificadas y limpias, las semillas se mantuvieron en agua estéril (el doble del volumen de las semillas), en agitación constante (150 rpm) y en obscuridad por 24 horas, a temperatura ambiente (25 a 28°C), transcurrido este tiempo, las semillas se retiraron cuidadosamente. Del sobrenadante se obtuvo un extracto con acetato de etilo (1:1 vol / vol), el cual se mantuvo en agitación por un periodo mínimo de 12 horas. Posteriormente, el acetato de etilo se evaporó y el residuo se resuspendió en metanol (Janczarek *et al.*, 1997). Estas muestras se almacenaron a 4°C para su posterior análisis por cromatografía líquida de alta resolución HPLC (por sus siglas en inglés).

7.11 Identificación de Flavonoides

Los extractos obtenidos de exudados de semilla fueron analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), empleando un sistema de fase reversa en modo isocrático. La fase móvil consistió en agua: metanol: ácido acético (60:35:5 v/v/v), la fase estacionaria fue una columna Allsphere ODS-1 de 25cm x 4.6 mm, 5 micrón. Las muestras separadas se analizaron con un detector de arreglo de diodos, ajustado a

280 nm y con un rango de barrido de 220 a 400 nm. La asignación de la estructura de los flavonoides se realizó mediante la inspección del espectro de absorción en el rango de ultravioleta, comparando los máximos de absorción con los obtenidos de estándares puros reportados en la literatura (Lin *et al.*, 2007; Greenham *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008). Para la cuantificación de los flavonoides se utilizó el índice de extinción promedio 12000 mM⁻¹ (López *et al.*, 2001; Franke *et al.*, 2004, Satoshi y Ragai, 1995).

7.12 Prueba de inducción de genes

Para verificar la capacidad inductora (de genes *nod*) de los exudados de semillas; se diseñaron iniciadores para genes *nodD*, para ello, se realizaron alineamientos con secuencias reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), tanto para el género *Rhizobium* como para el género *Mesorhizobium* (cuadro 2).

Cuadro 2. Iniciadores diseñados para hacer las pruebas de actividad biológica de los compuestos fenólicos en los rizobios.

Tipo de Oligo	Nombre	Secuencia	(Tm) teórica
Directo para <i>nodD</i> de <i>Rhizobium</i>	fRnD	CTTGTAGCGCTCGACGCTCTAATG	74
Reverso para <i>nodD</i> de <i>Rhizobium</i>	rRnD	CCTCTTGGATCATAATCTCGCG	66
Directo para <i>nodD</i> de <i>Mesorhizobium</i>	fMnD	GCATCAACCTAAGTCAGCCG	62
Reverso para <i>nodD</i> de <i>Mesorhizobium</i>	rMnD	GAAATGGCAGCGGAAGGTCG	64

Así mismo, se determinó de manera experimental la temperatura de alineamiento óptima, tomando como base la temperatura media de fusión calculada o “teórica” de los iniciadores, para ello se realizaron reacciones en cadena de polimerasa (PCR) en gradiente con los diferentes cebadores y las diferentes cepas.

El experimento se diseñó con cuatro tratamientos, el primero fue un control con bacterias (*Andicola*) crecidas en matraz Erlenmeyer de 250 ml, con 25 ml de caldo de cultivo (CELM ver anexo 1) libre de flavonoides (control negativo); en el segundo, se disolvió en el medio de cultivo el flavonoide quercetina (100 nM), reportada como inductora de nodulación de *Rhizobium etli* y *Rhizobium tropici* quercetina (Hungria and Phillips, 1993), disuelta en metanol, de tal forma que quedara en una concentración 10 nM (control positivo); en el tercer tratamiento se agregó, al medio de cultivo, el extracto de exudados de semillas de *Prosopis laevigata* disuelta en metanol, quedando en las siguientes concentraciones: isoflavona 1 4.5 ng; isoflavona 2 3.9 nM; isoflavona 3 3.9 nM, flavona 4.8 nM; isoflavona 4 3.2 nM; isoflavona 5 3.1 nM; flavonol 2.7 nM. El cuarto tratamiento consistió en agregar metanol (0.000025 ml) al medio, para verificar que los efectos de los anteriores tratamientos no fueran debidos al solvente (control solvente).

7.13 Aislamiento de ARNtotal

El ARN total se obtuvo utilizando el sistema de extracción de TRIzol (CAT No. 15596-018 de Invitrogen CAT No. 15596-018 de Invitrogen CA, USA), siguiendo el método recomendado por el proveedor y resuspendiendo el ARN en 30 μ l de agua bidestilada libre de ARNsas. Una alícuota (5 μ l) del ARN obtenido se utilizó para verificar su presencia, calidad y concentración aproximada, mediante electroforesis en gel desnaturante de agarosa al 1.5%, y el resto fue almacenado a -70° C para su uso posterior. Para descartar contaminación por ADN, el ARN fue tratado con una ADNasa I (SIGMA).

7.14 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADNc fue sintetizado por transcripción reversa, usando los oligos Nod y la transcriptasa reversa *Super Script III* (Invitrogen, California USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto de esta reacción fue amplificado por PCR punto final. La mezcla de reacción para la síntesis de ADNc consistió de: 1.5 μ l de cada cebador (directo y reverso), 6 μ l de 5x buffer First strand, 3 μ l dNTPs, 3 μ l de DTTT y 1.5 μ l de transcriptasa reversa. El producto de la reacción se almacenó a -20 °C para su uso posterior. La marcha metodológica puede verse en la figura 5.

7.15 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de nodulación y los parámetros fotosintéticos se analizaron estadísticamente utilizando el programa **Minitab V16**. Se realizaron diagramas de caja comparando por cepa y cepa contra tiempo. Así como análisis de varianza para cada variable considerando factor cepa y tiempo.

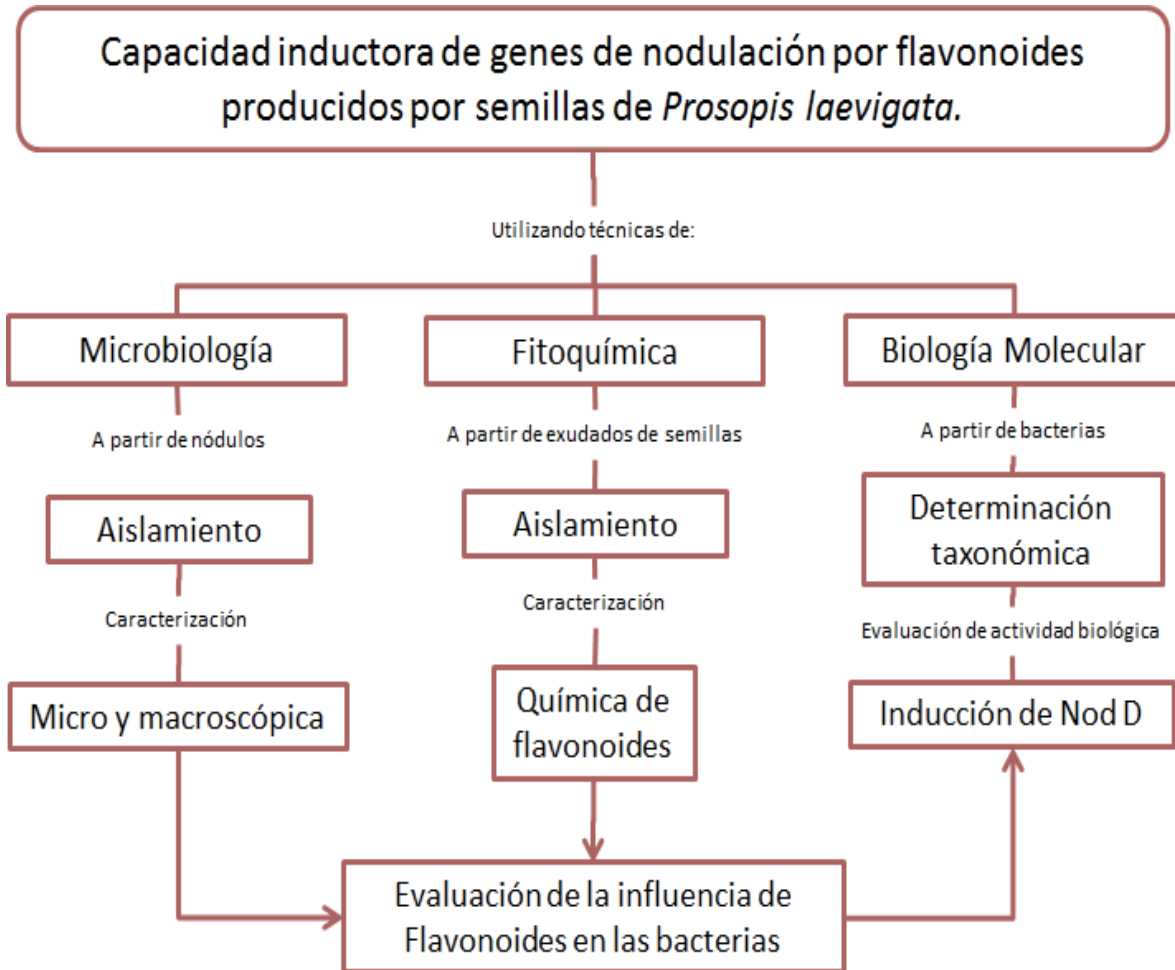


Figura 5 Esquema metodológico general del proyecto.

8. Resultados

8.1 Análisis químico del suelo

Los análisis químicos del suelo con microscopio electrónico de barrido (SEM), complementado por un microanalizador por dispersión de energía (EDX), arrojaron los resultados que se muestran en el cuadro 3. El carbono (C) es el elemento más abundante (12%), mientras que el potasio (K) es el menos abundante (1.26%). En tanto que en la forma oxidada de los elementos se observa que el más abundante es CO_2 con 38.05%; mientras que el P_2O_5 con 0.21% es el menos abundante.

Cuadro 3. Composición química de suelo recolectado en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México.

Elemento	% en peso del elemento	Elemento en su forma oxidada	% del compuesto
C	12.64	CO_2	38.05
Si	15.80	Al_2O_3	10.13
Fe	9.49	CaO	10.06
O	39.25	FeO	3.82
Ca	7.02	K_2O	2.17
Al	4.69	MgO	2.05
Mg	1.64	Na_2O	0.30
K	1.26	P_2O_5	0.21

Por su parte, la técnica modificada de Taussky y Shorr indicó que la cantidad de hortofosfatos en el suelo es en promedio (5 repeticiones de 1 muestra compuesta) de 1.21 mg/Kg de suelo; mientras que la técnica de Kjeldahl indicó que, en promedio, hay un 0.126% (5 repeticiones de 1 muestra compuesta) de nitrógeno. Finalmente, se encontró que el pH es de 7.85.

.2 Aislamiento de cepa bacteriana.

En el último muestreo de plántulas sembradas en suelo de Zapotitlán se encontró en una plántula un par de nódulos pequeños, de los que fue aislada la cepa denominada Zapotitlana (Figura 6). Por su parte, las plántulas de frijol, no presentaron nódulos en ninguno de los muestreos.

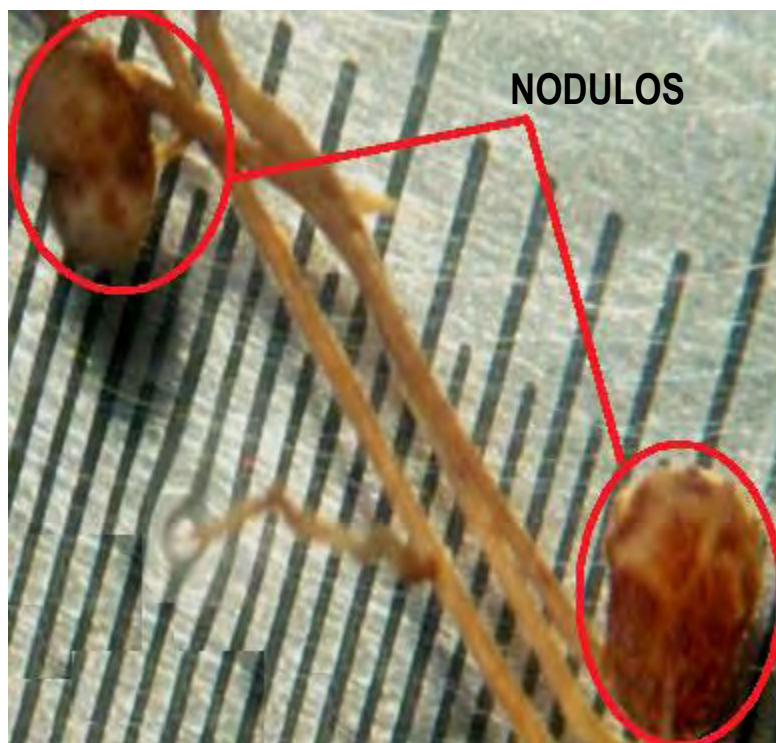


Figura 6. Dentro de círculos rojos: Nódulos en raíces de plántula de mezquite crecida a nivel de invernadero en suelo de Zapotitlán de las Salinas.

Por otro lado, en las plántulas crecidas en suelo de Irapuato, se encontró que las plántulas de *Prosopis laevigata* presentaron pocos nódulos, de tamaño pequeño y de forma redonda (Figura 7 A, B y C), de estos nódulos se obtuvo la cepa denominada “Mexicana”. Mientras que en las plántulas de *Prosopis laevigata* var. *andicola* se encontraron numerosos nódulos, de mayor tamaño y con formas ramificadas y lobulados (Imagen 7 D, E y F), de los cuales se obtuvo la cepa bacteriana denominada “Andícola”.

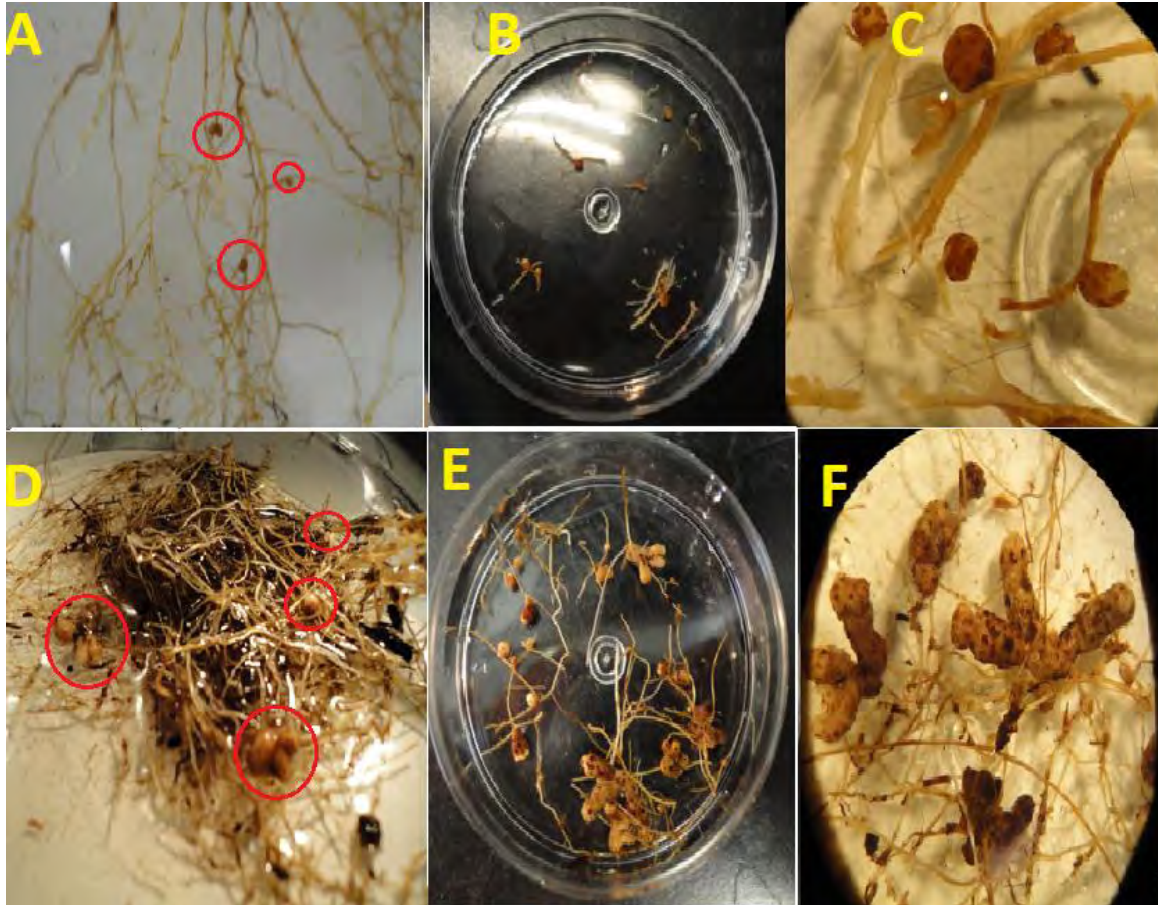


Figura 7 A) Raíz nodulada de *Prosopis laevigata*; B) Nódulos de *Prosopis laevigata*; C) Nódulos de *Prosopis laevigata* observados al microscopio estereoscópico; D) Raíz nodulada de *Prosopis laevigata* var. *andicola*; E) Nódulos de *Prosopis laevigata* var. *andicola*; F) Nódulos de *Prosopis laevigata* var. *andicola* observados al microscopio estereoscópico.

8.3 Purificación y caracterización bioquímica de cepa bacteriana

La purificación de las cepas bacterianas fue realizada en extracto de levadura-manitol-agar-rojo Congo (ELMARC), se consideraron libres de microorganismos contaminantes las colonias que no incorporaron el color rojo; en este medio se observó crecimiento franco de todas las cepas después de cuatro días. Al cultivar las cepas purificadas (Mexicana, Andícola y Zapotitlana) en medio de extracto de levadura-manitol-agar-azul de bromotimol (ELMABT), se encontró que las tres cepas presentaron un viraje al color amarillo. Por otra parte, después de cuatro días de incubación en leche tornasolada, las bacterias produjeron una cantidad moderada de suero tornasolado en la superficie del medio. En medio glucosa-peptona-agar-púrpura de bromocresol (GPA) no se presentó crecimiento después de 4 semanas. La morfología microscópica de las cepas, con tinción de Gram dio bacterias Gram negativas, con forma de bastones (bacilos cortos). Cabe mencionar que existe una ligera heterogeneidad de formas, encontrando algunos cocos (Ver cuadro 4).

Cuadro 4. Caracterización bioquímica y morfológica de las cepas bacterianas aisladas de los nódulos de *Prosopis laevigata*. ^s/crecimiento: sin crecimiento.

	ELMARC	ELMABT	Leche Tornasolada	GPA	Tinción de Gram	Morfología colonial	Tamaño de la colonia
Mexicana	Blanco	Amarillo	^s /crecimiento	^s /crecimiento	-	Convexa	2-4 mm
Andícola	Blanco	Amarillo	^s /crecimiento	^s /crecimiento	-	Convexa	2-4 mm
Zapotitlana	Blanco	Amarillo	^s /crecimiento	^s /crecimiento	-	Convexa	1-2 mm

8.4 Determinación taxonómica molecular

La temperatura óptima de alineamiento de las PCR para analizar rRNA 16 S, utilizando los oligos: rD1y fD1, se determinó mediante una serie de reacciones con gradiente de temperatura. En la figura 8 se muestra que a 55 y 57° C se obtuvo la mejor respuesta, ya que sólo en estas temperaturas se obtuvo el producto del tamaño esperado (de 1500 pb).

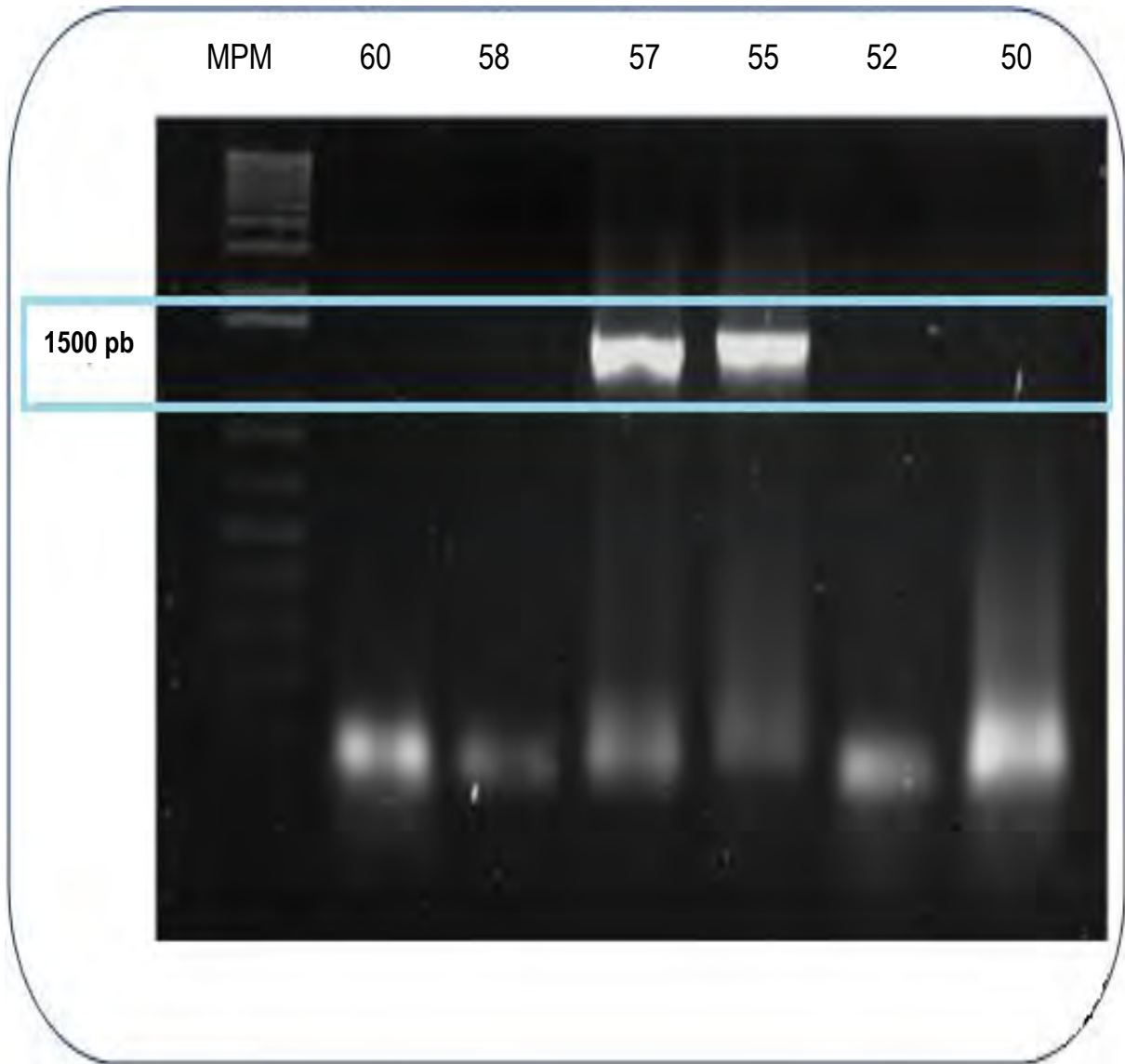


Figura 8. Gel resultante de la electroforesis con productos de PCR, para determinar la temperatura óptima de alineamiento. MPM: marcador de peso molecular; 60, 58, 57, 55, 52, 50: temperaturas de alineamiento en °C

En la figura 9 se muestra el gel obtenido de la electroforesis con los productos de PCR, utilizando los cebadores D1. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos del NCBI. Con lo que se determinó que la cepa Mexicana pertenece al género *Mesorhizobium* (ver anexo 2, fig. 17), Andícola al género *Rhizobium* (ver anexo 2, fig. 18) y Zapotitlana al género *Sinorhizobium* (ver anexo 2, fig. 19). Cabe mencionar que cada reacción se realizó por duplicado y, por tanto, se obtuvieron dos secuencias de cada cepa para descartar errores de secuenciación.

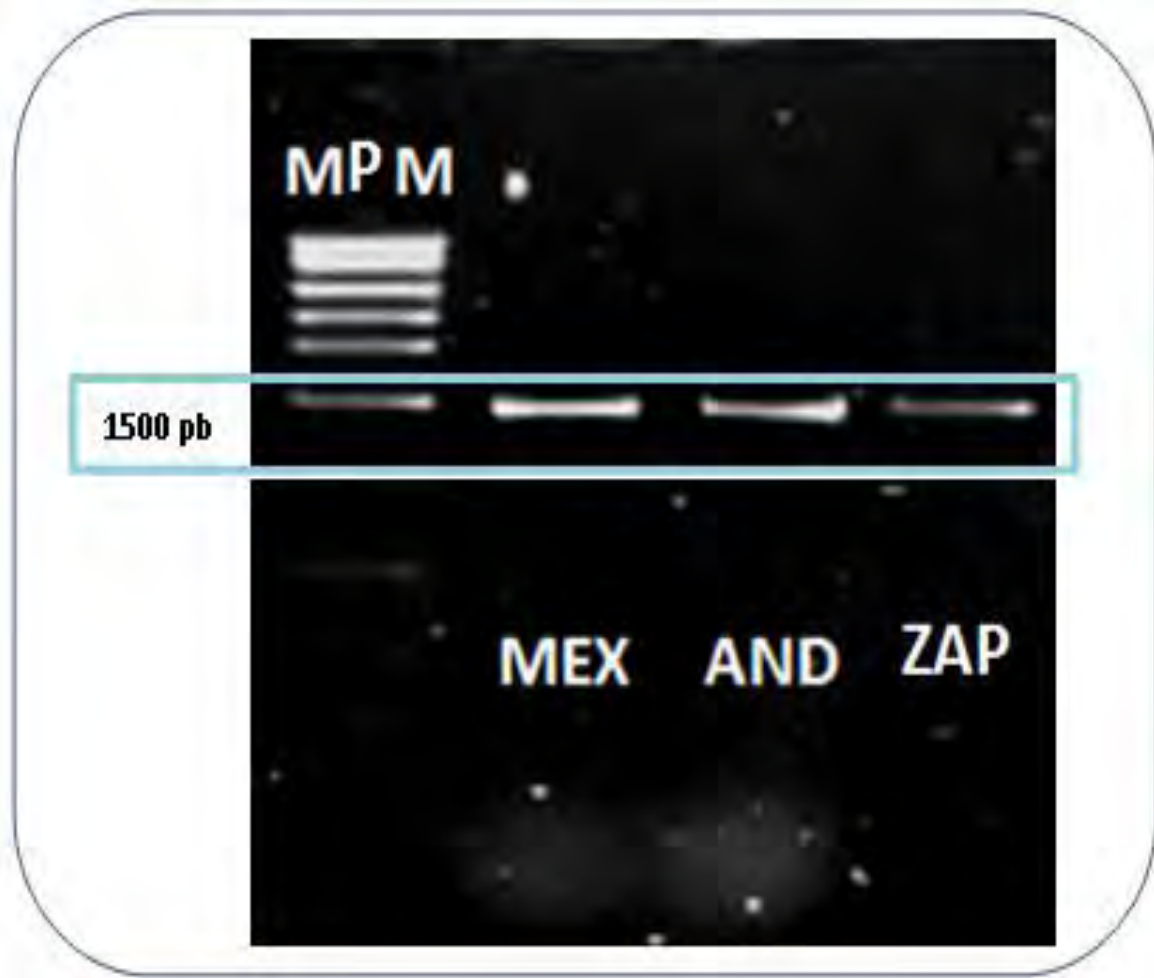


Figura 9. Gel de electroforesis, donde se muestran las bandas correspondientes a los amplicones resultantes con iniciadores D1. MPM: marcador de peso molecular; MEX: cepa Mexicana; AND: cepa Andícola; ZAP: cepa Zapotitlana.

En la figura 10 se muestra el dendrograma obtenido con el modelo de distancia genica (Kimura 2-parameter), con prueba de robustez bootstrap 10 000 iteraciones. El dendrograma ordena las secuencias obtenidas mediante PCR (con iniciadores D1) de las cepas Mexicana, Andícola y Zapotitlana, en tres grupos.

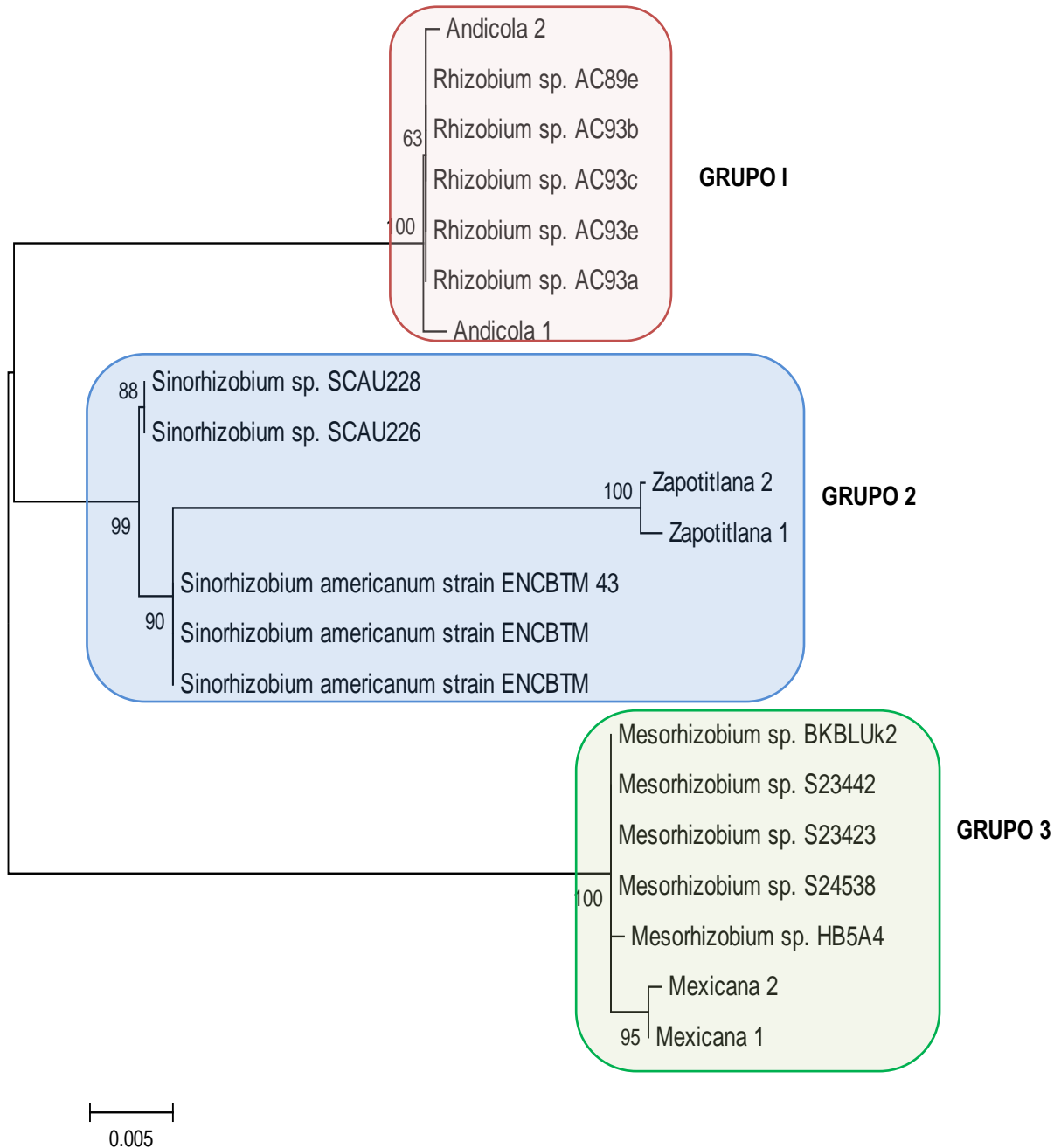


Figura 10 Dendrograma obtenido con secuencias resultantes con oligos D1 para el fragmento 16S ribosomal y secuencias del NCBI de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*.

8.5 Pruebas de nodulación

Después de 48 días, se encontraron nódulos en las plántulas inoculadas con cepa Andícolá (10 plántulas) con una mediana igual a 11 nódulos (Fig. 11A); mientras que en las inoculadas con cepa Mexicana (10 plántulas) solo se observaron ligeras modificaciones en los pelos radicales (mediana igual a 0, ver Fig. 11B y 15), Posteriormente (a los 140 días), se encontraron nódulos en algunas plántulas inoculadas con Mexicana (mediana igual a 0; ver fig. 12B y 15) y los nódulos de la cepa Andícolá aumentaron su tamaño y adquirieron formas alargadas (Fig. 12^a, 15). La cantidad de nódulos no mostró diferencia significativa al comparar entre muestreos (tiempo), ni en la interacción entre tiempo y tipo de cepa; sin embargo, en la comparación por tipo de cepa se encontró diferencia significativa, en todos los casos el valor de alfa fue de 0.05 (ver figuras 14, 15 y anexo 3).

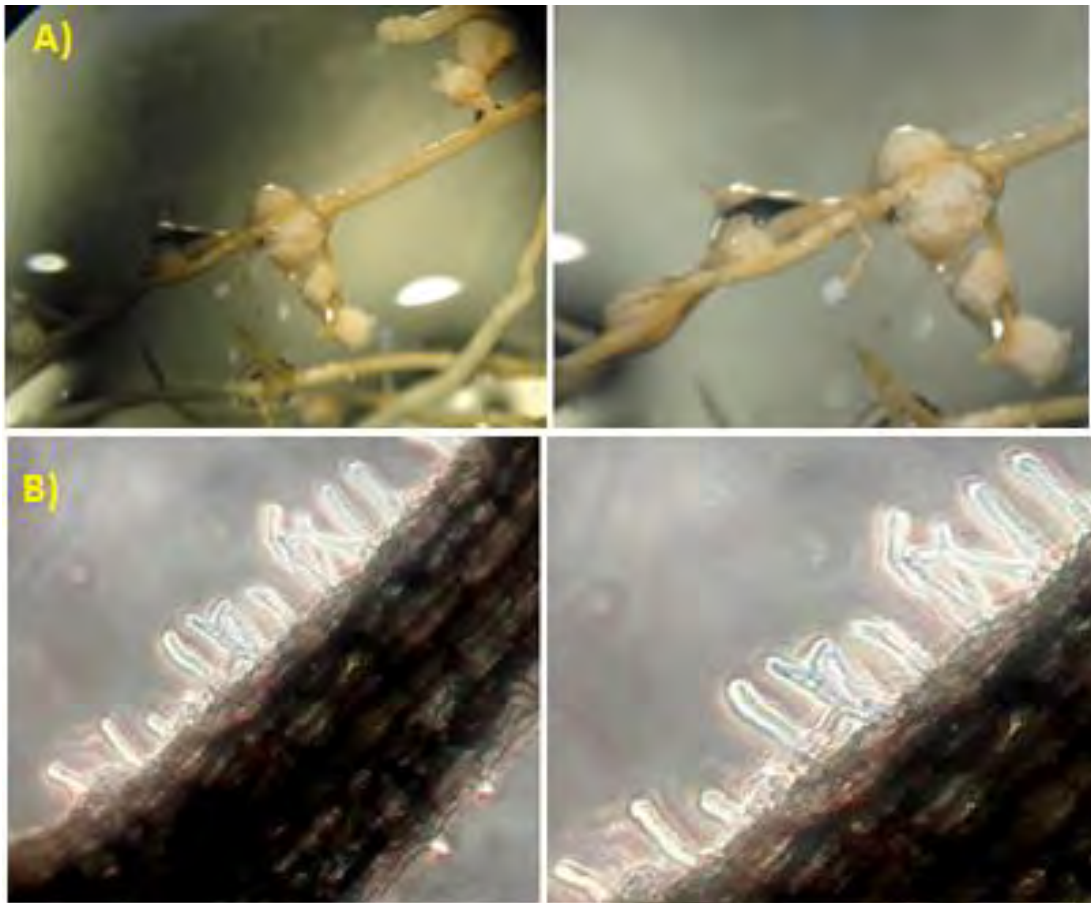


Figura 11 A) Nódulos en raíces de plántulas de *Prosopis laevigata* inoculados con cepa Andícolá. B) Vista al microscopio óptico (40x) de pelos radicales de plántula de *Prosopis laevigata* inoculada con cepa Mexicana.

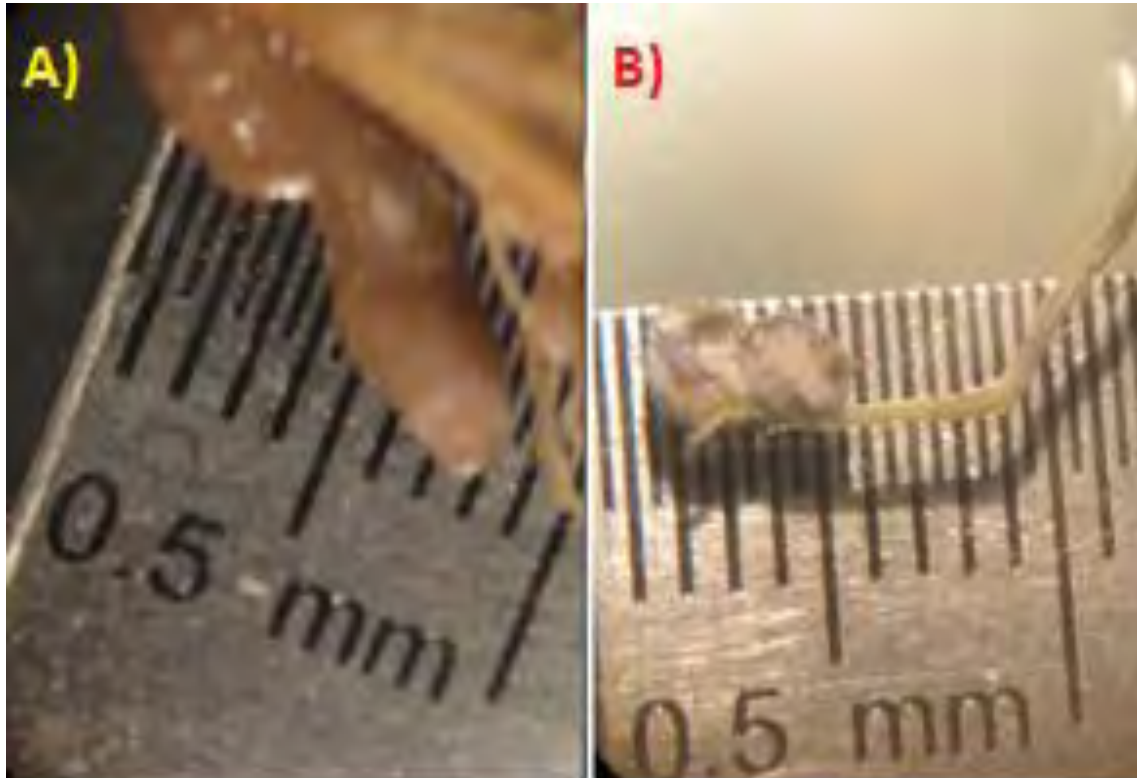


Figura 12 A) Nódulos de plántulas inoculadas con cepa Andícola. B) Nódulos en plántulas inoculadas con cepa Mexicana a los 140 días.

Por otra parte, 48 días después de la inoculación se observó en la longitud de raíces la siguiente tendencia: Andícola (mediana = 12.5 cm) < Control (mediana = 15.9 cm) < Mexicana (mediana = 15.35 cm). Mientras que los tallos mostraron una tendencia contraria: Andícola (mediana = 3.08 cm) > Mexicana (mediana = 2.5 cm) > Control (mediana = 2 cm) (Fig. 13, 14 y 15). A los 140 días, se observó que las plántulas noduladas con la cepa Andícola presentaron mayor crecimiento de raíz y de tallo, mientras que el grupo control mostró las raíces y los tallos más cortos. Por su parte, las plántulas inoculadas con cepa Mexicana tuvieron valores medios intermedios entre Andícola y Control: Andícola (mediana raíz = 32.9 cm; mediana tallo = 14 cm) > Mexicana (mediana raíz = 17.5 cm; mediana tallo = 3.6 cm) > Control (mediana raíz 16.3 cm; mediana tallo 2.5 cm) ver Figuras 14 y 15; en todos los casos, el análisis de varianza (alfa de 0.05) comparando entre cepas e interacción cepa-tiempo se encontraron diferencias significativas (ver anexo 3).



Figura 13. Fotografía comparativa de la longitud de vástago y raíz de plántulas de *Prosopis laevigata* en los diferentes tratamientos. Izquierda: Andícola (AND); centro: Mexicana (MEX); derecha: Control (libre de cepa).

8.6 Parámetros fotosintéticos

En lo que se refiere a fotosíntesis, en plántulas inoculadas con la cepa Mexicana, a los 48 días alcanzaron un valor medio de $0.273 \mu\text{Mol m}^2\text{s}^{-1}$ y $0.093 \mu\text{Mol m}^2\text{s}^{-1}$ a los 140 días mientras que las plántulas inoculadas con la cepa Andícola tuvieron un valor medio de $1.96 \mu\text{Mol m}^2\text{s}^{-1}$ a los 48 días y $1.156 \mu\text{Mol m}^2\text{s}^{-1}$ a los 140 días en las plántulas control la mediana fue de cero en ambos tiempos (Fig. 14 y 15). Para fotosíntesis se observaron diferencias significativas (alfa de 0.05) al comparar entre cepas, mientras que en tiempo e interacción cepa-tiempo no hubo diferencias significativas.

En conductancia estomática, la media para Andícola fue de $0.014 \text{ Mol H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$ a los 48 días y $0.0089 \text{ Mol H}_2\text{O m}^2 \text{ s}^{-1}$ a los 140 días, para Mexicana y Control la mediana fue cero en ambos tiempos (Fig. 14 y 15), en este caso se encontró diferencia significativa (alfa 0.05) al comparar entre cepas (ver anexo 3).

Con respecto a la concentración intracelular de CO₂, se observa que los valores más altos los presentaron las plántulas con la cepa Mexicana, con un valor medio de 200 μMol CO₂ mol⁻¹ de aire; mientras que Andina presentó valor medio muy bajo; y control presentó mediana de cero, en este caso se encontraron diferencias significativas (alfa 0.05) al comparar tipo de cepa, tiempo e interacción tiempo-cepa (Fig. 14 y 15 y anexo 3).

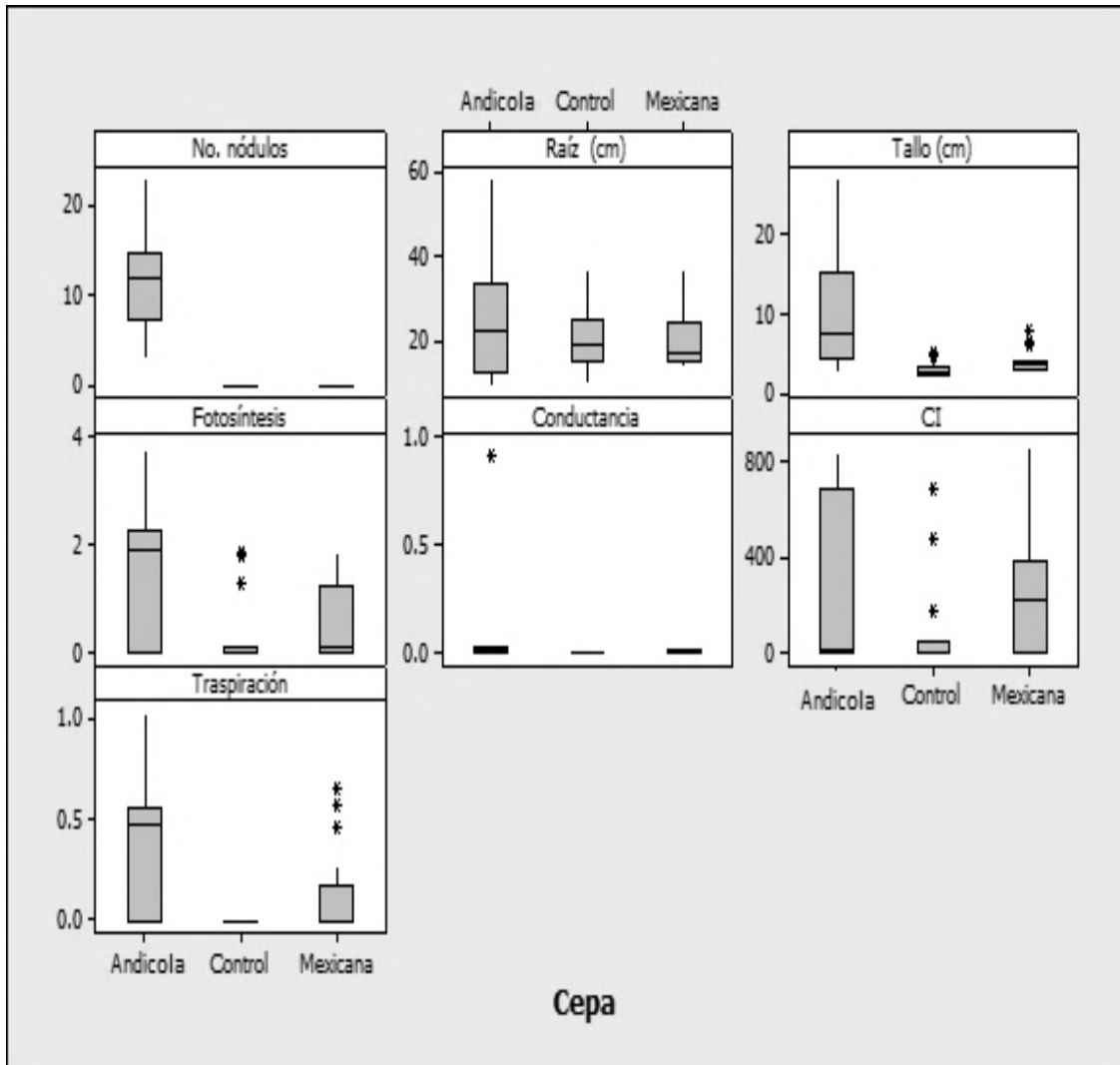


Figura 14 Diagrama de caja donde se muestran los valores registrados de número de nódulos, longitud de raíz y tallo, fotosíntesis, conductancia estomática, concentración de CO₂ intracelular (CI) y transpiración. La única variable que no tuvo diferencia significativa fue la Concentración de CO₂ intracelular (ver anexo 3).*Outliers

Por último, en transpiración, las plántulas de los tres tratamientos dieron medianas igual a cero mostrando diferencia significativa (alfa 0.05) en la interacción cepa-tiempo. (Figura 15 y anexo 3).

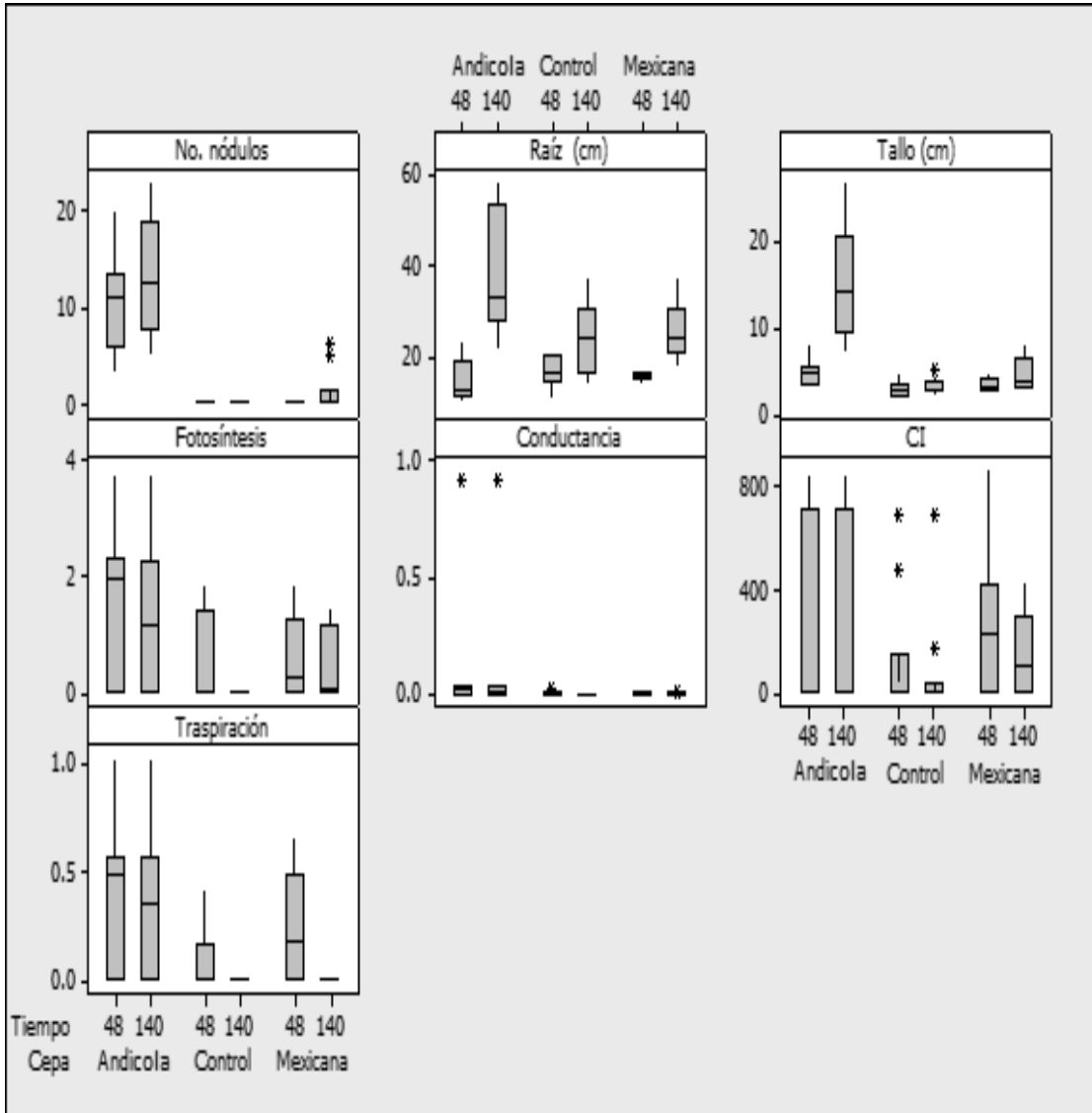
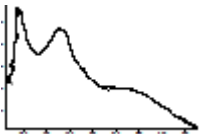

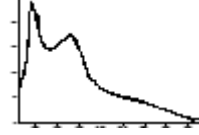
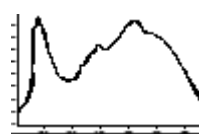
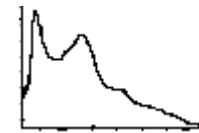
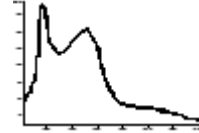
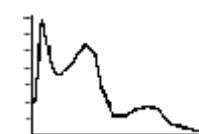


Figura 15 Diagrama de caja donde se muestran los valores registrados de número de nódulos, longitud de raíz y tallo, fotosíntesis, conductancia estomática, concentración de CO₂ intracelular (CI) y transpiración; con respecto al tiempo. * Outliers

8.7 Identificación de Flavonoides

Los compuestos identificados en exudados de semillas de *Prosopis laevigata*, mediante la inspección de los espectros de UV, mostraron siete, cuya forma y máximos de absorbancia corresponden a flavonoides. Al comparar con los reportados en literatura se asignó la identidad presentada en el cuadro 6.

Cuadro 5. Compuestos fenólicos identificados en exudados de semillas de *Prosopis laevigata* Rijke et al.,2006.

ESPECTRO	TIEMPO DE RETENCIÓN	MÁXIMO	CONCENTRACIÓN M	COMPUESTO
	5.40 min	236, 272, 324	0.000004575	Isoflavona 1
	6.11 min	236, 272, 322	3.9583×10^{-6}	Isoflavona 2
	6.14 min	236, 272 sh, 278, 302, 318 sh	3.9333×10^{-6}	Isoflavona 3
	7.51 min	236, 272 sh, 278 sh, 302, 318 sh	4.8000×10^{-6}	Flavona
	7.88 min	236, 272, 300 S	3.2500×10^{-6}	Isoflavona 4
	8.36 min	236, 270, 320	3.1500×10^{-6}	Isoflavona 5
	11.72	236, 272, 322	2.7917×10^{-6}	Flavonol

8.8 Actividad biológica de compuestos fenólicos

La figura 14 corresponde al gel de electroforesis, donde en el carril 4 se observa la banda que corresponde al amplicon obtenido mediante RT PCR, partiendo de extracciones de RNA sometido a digestión con DNasa, previa a la síntesis de cDNA. La banda, según el marcador de peso molecular, tiene un tamaño de 700 pb y proviene de bacterias tratadas con el control positivo quercetina. Los carriles 2, 3 y 5, no presentaron banda.

La secuencia resultante del producto de RT-PCR (que produjo la banda en el carril 4 Fig. 14), de bacterias tratadas con quercetina, tiene un porcentaje de máxima identidad, arriba de 80 %, con genes de nodulación de diferentes rizobios, esto se muestra en el cuadro 7.

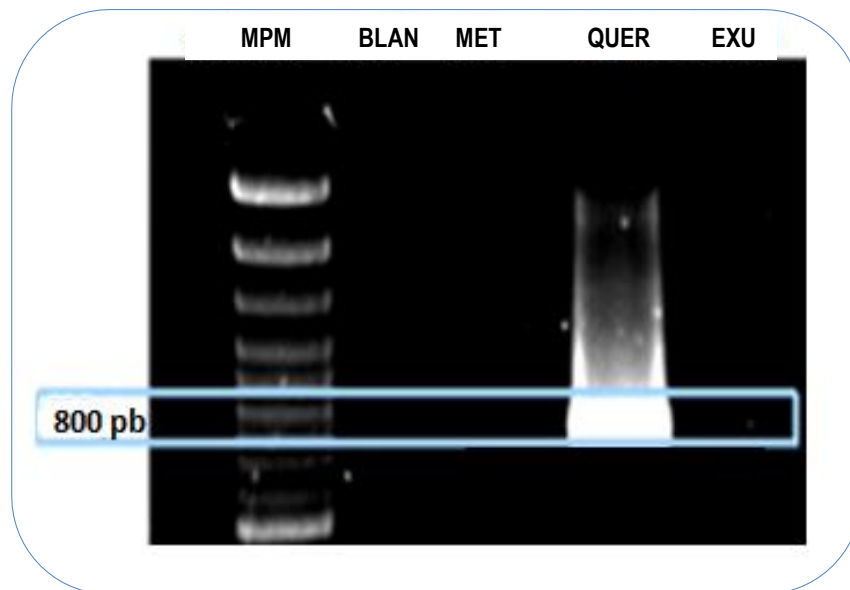


Figura 16 Fotografía de electroforesis con resultados de rPCR. MPM: marcador de peso molecular, BLAN: blanco, CON: control, MET: metanol; EXU: exudados de semillas de *Prosopis laevigata*.

Cuadro 6. Secuencias del (NCBI) que produjeron significancia al comparar la secuencia de la cepa Andícola tratada con quercetina.

Clave de acceso	Descripcion	E value	% Máxima identidad
AJ518946.2	<i>Sinorhizobium</i> sp. BR816 nodulation gene cluster nodD1, nodE, nodF, nodA, nodB, nodC, nodS, nodU, nodI, nodJ, orf350, nodH, nodP2, nodQ2 genes and orf116, orf113 and orf352, strain BR816	5.00E-161	82%
GQ167256.1	<i>Mesorhizobium chacoense</i> strain LMG 19008 NodD (nodD) gene, partial cds	2.00E-125	79%
GQ167274.1	<i>Mesorhizobium amorphae</i> strain ACCC 19665 NodD (nodD) gene, partial cds	1.00E-121	79%
CP004017.1	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 plasmid pRtrCIAT899b, complete sequence	9.00E-119	80%
JQ889863.1	<i>Rhizobium tropici</i> strain WUR1 LysR family transcriptional regulator (nodD), NodA (nodA), NodB (nodB), NodC (nodC), NodS (nodS), NodU (nodU), NodI (nodI), NodJ (nodJ), putative aldo-keto reductase, NodH (nodH), NodP (nodP), and NodQ (nodQ) genes, complete cds	9.00E-119	80%
L01273.1	<i>Rhizobium tropici</i> nodulation protein D (nodD1) gene, complete cds	9.00E-119	80%
L04660.1	<i>Rhizobium tropici</i> nodD gene, complete cds	9.00E-119	80%
AY945949.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain 163C NodD gene, partial cds	6.00E-71	86%
AY776290.1	<i>Ochrobactrum cytisi</i> strain ESC1 NodD (nodD) gene, partial cds	9.00E-69	85%
AY945953.1	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> strain ATCC 11325 NodD gene, partial cds	2.00E-60	84%

9. Discusión

9.1 Análisis químico del suelo

En los análisis de suelo se observó que el carbono fue el elemento más abundante, lo cual puede deberse a la descomposición de la materia orgánica proveniente de los mezquites y microorganismos, ya que uno de los productos de descomposición de ésta es el CO₂, el cual interviene en el intemperismo de las rocas y minerales, mejorando algunas propiedades físicas del suelo, como la estructura (granular) y la aireación, ya que actúa como agente cementante, aumenta la cantidad de agregados que mejoran la capilaridad y permeabilidad del suelo (Muñoz *et al.*, 2000).

El valor de pH (7.85), indica que se trata de suelo ligeramente alcalino (Singer y Munns, 1992), lo cual concuerda con lo indicado por López-Galindo y colaboradores en 2003, quienes encontraron que en las terrazas aluviales de Zapotitlán, el rango de pH varía 7 a 8.6. Este valor de pH puede relacionarse con la cantidad de sales encontradas en las muestras analizadas (CaO 10.06%; K₂O 2.17%; MgO 2.05% y Na₂O 0.30%), ya que Muñoz y colaboradores (2009), señalan que los valores menos alcalinos se presentan en los sitios protegidos por vegetación, ya que éstos tienen menor evaporación y mayor entrada de agua, lo cual provoca un lavado más eficiente de las sales, esto, aunado al efecto acidificante de la materia orgánica, se ve relacionado con el porcentaje de nitrógeno encontrado (0.126%), que corresponde a un valor medio (entre medianamente pobre y medianamente rico, según los criterios de S. A. R. H., 1970). Esta cantidad relativamente alta de N, que se presenta en los suelos con cobertura vegetal, es debida precisamente al aporte de materia orgánica; en particular, en el caso de suelo acumulado bajo el dosel de *Prosopis laevigata*, que ha sido señalado como isla de fertilidad, con alta actividad microbiana, debido a que es una fuente importante de nutrientes (Ruiz *et al.*, 2008).

Por otro lado, la cantidad de fósforo (1.21 mg/Kg) ubica a este suelo como pobre en este elemento (S.A.R.H., 1970). Se sabe que el fósforo no se encuentra en estado libre en la naturaleza, porque su elevada facilidad de oxidación no lo permite; sin embargo, son muy comunes los compuestos de fósforo que se encuentran en numerosos minerales. En términos generales, el P del suelo se clasifica en orgánico e inorgánico, dependiendo de la naturaleza de los compuestos que forme. La forma orgánica se encuentra en el humus y materia orgánica, y sus niveles en el suelo pueden variar desde 0 hasta más de 0.2%. La fracción inorgánica está constituida por compuestos de hierro, aluminio, calcio, etc., y, normalmente, son más abundantes que los compuestos orgánicos (Muñoz *et al.*, 2000).

9.2 Aislamiento de las cepas bacterianas.

El hecho de haber encontrado dos nódulos pequeños, sólo en una de las plántulas de mezquite sembradas en suelo de Zapotitlán, hace suponer que la cantidad de bacterias, con capacidad nodulante, es pequeña en la zona. Esta idea se refuerza con los resultados obtenidos en las plantas del CINVESTAV Irapuato, ya que todas las plántulas inspeccionadas estaban noduladas; las condiciones y edad de ambos grupos de plantas fueron parecidas, salvo el origen del suelo. Todo ello permite sugerir que la diferencia en presencia de nódulos es debida a la abundancia de rizobios con capacidad nodulante en el suelo de cada zona. En el caso particular de las terrazas aluviales en Zapotitlán, la escases de rizobios puede ser atribuido a las características ambientales del lugar, en particular, a las características del suelo (ver sección 8.1); ya que para otras leguminosas, se ha considerado que el fracaso en el proceso de nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno se debe a factores abióticos, especialmente edáficos; tales como, altas concentraciones de nitrógeno, baja disponibilidad de fósforo, salinidad y deficiencias en micronutrientes (Elbanna *et al.*, 2009)

Por otro lado, al comparar las plántulas de *Prosopis laevigata* con plántulas de *Prosopis laevigata* var. *andicola*, se observó una clara diferencia en cuanto a cantidad y dimensión de los nódulos (aunque se trataba de plántulas de la misma edad y crecidas en las mismas condiciones). Lo anterior indica que la especie de mezquite Andina tiene mayor capacidad para formar relación simbiótica con rizobios y, en consecuencia, una mayor y más rápida formación de nódulos. Así mismo, se observa que la cepa bacteriana Andícola es promiscua en su relación con los hospederos (ya que se aisló de la especie *Prosopis laevigata* var. *andicola*, y posteriormente noduló a *Prosopis laevigata*), la promiscuidad ha sido atribuida a los grupos sustituyentes de los factores Nod (metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones) (Broughton *et al.*, 2000). Adicionalmente, al comparar las formas nodulares presentadas por cada cepa y a reserva de realizar otras pruebas para descartar que la nodulación de Mexicana sea tardía (p. e. observación de meristemas nodulares en microscopio electrónico); se puede pensar que se trata de tipos diferentes de nódulos, la cepa Mexicana presenta nódulos redondos centrados con apariencia de ser determinados; mientras que, la cepa Andícola presenta nódulos alargados y ramificados, lo cual es común en los nódulos indeterminados.

El hecho de haber obtenido tres cepas diferentes, provenientes de suelos de regiones diferentes del país, permite inferir que *Prosopis laevigata* ha mantenido cierta promiscuidad en su relación con los rizobios, como mecanismo de respuesta a las condiciones limitantes características de las regiones de México donde se distribuye. Algunos autores sugieren que la promiscuidad es una característica ancestral, que depende de la coevolución de rizobios y hospederos (Broughton y Perret, 2000).

9.3 Purificación y caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

Las tres cepas crecidas en rojo Congo fueron de color blanco y se consideró que éstas eran cepas puras (libres de otros microorganismos) (Ferrera *et al.*, 1993; McInroy *et al.*, 1999) porque, en términos generales, los rizobios son incapaces de metabolizar este pigmento, por lo cual, sus colonias varían en color, desde blanco opaco hasta translucido acuoso, excepto por el caso de *Rhizobium de lotinis* que da lugar a colonias rosas o rojas y *R. stylosantes*, que presenta colonias amarillas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

Por otra parte, dado que todas las cepas mostraron crecimiento franco a los cuatro días, se les consideró de crecimiento rápido, ya que según Ferrera-Cerrato *et al.*, (1993), las cepas cuyas colonias tardan de siete días en adelante son de crecimiento lento.

En cuanto a la clasificación como ácido o álcali productoras, con el medio de extracto de levadura-manitol-agar-azul de bromotimol (ELMABT), se determinó que son bacterias productoras de ácido, ya que presentaron color amarillo. El azul de bromotimol es indicador de pH que vira a color amarillo en caso de acidez; no varía su color cuando el pH es neutro, y cambia a verde en caso de alcalinidad. Este resultado es similar al encontrado en 2001, por Frioni y colaboradores, quienes al caracterizar 61 rizobios provenientes de ocho leguminosas arboreas, entre ellas una del género *Prosopis* (*P. nigra*), encontraron que la mayoría de las cepas fueron productoras de ácido. El resultado en tiempo de crecimiento corrobora que se trata de cepas de crecimiento rápido, ya que, en términos generales, los rizobios considerados de crecimiento rápido también son productores de ácido.

Los resultados obtenidos al crecer las cepas en el medio de leche tornasolada, indican que las cepas fueron puras, ya que solo hubo una producción moderada de suero en la superficie del medio. Esto se debe a que los rizobios, en general, no crecen en este medio, o presentan un crecimiento extremadamente pobre; cuando la leche tornasolada muestra un viraje a color pardo, cambios en el pH (regularmente ácido), se forman coágulos o hay una disolución del medio, indica que el microorganismo no es un rizobio (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993). Los resultados de la prueba en medio de glucosa-peptona-agar (GPA) también indican que se trata de cepas puras, ya que los rizobios no se desarrollan, o lo hacen muy mal en este medio, por lo que el crecimiento bacteriano y el cambio de color en el medio, después de 24 horas de incubación, indican la presencia de contaminantes (Rodríguez y Ferrera-Cerrato, 1984).

En cuanto a la heterogeneidad de formas observada en las bacterias, después de hacer la tinción de Gram, resulta normal en bacterias que han sido aisladas de nódulos recientemente, y es debida a que las bacterias recién se han restituido como tales, recordemos que en los nódulos los micro simbioses se transforman en bacteroides.

9.4 Determinación taxonómica por biología molecular

El dendograma (Fig. 6) ordena las secuencias en tres grupos; en el primero encontramos las secuencias pertenecientes al género *Rhizobium* (*R. sp.* AC89e, *R. sp.* AC93b, *R. sp.* AC93c, *R. sp.* AC93e y *R. sp.* AC93a) y las secuencias de la cepa denominada Andícola (1 y 2). En el segundo grupo encontramos las secuencias del género *Sinorhizobium* (*S. sp.* SCAU228, *S. sp.* SCAU226, *S. americanum* ENCBTM 43, *S. americanum* ENCBTM y *S. americanum* ENCBTM) y las secuencias de la cepa Zapotitlana (1 y 2). En el tercer grupo se reúnen las secuencias del género *Mesorhizobium* (*M. sp.* BKBLUK2, *M. sp.* S23442, *M. sp.* S23423, *M. sp.* S24538, y *M. sp.* HB5A4) y las secuencias pertenecientes a la cepa denominada Mexicana (1 y 2).

La cepa bacteriana denominada Andícola corresponde a un *Rhizobium*, este género antes había sido aislado de nódulos de árboles pertenecientes al género *Prosopis*: *Prosopis alba* (Abril y González, 1994); *Prosopis chilensis* (Haukk *et al.*, 1996); *Prosopis glandulosa* Torr (Jenkins, 2003); *Prosopis juliflora* (Benata *et al.*, 2008).

En cuanto a la cepa denominada Zapotitlana, corresponde a una bacteria perteneciente al género *Sinorhizobium*, este género ha sido aislado también de: *Prosopis chilensis* (Haukk *et al.*, 1996; McInroy *et al.*, 1999; Nowak *et al.*, 2004) y *Prosopis juliflora* (Benata *et al.*, 2008).

Por otro lado, la cepa Mexicana pertenece al género *Mesorhizobium*, que se ha aislado de nódulos de: *Prosopis alba* (Velazquez *et al.*, 2001).

La promiscuidad que muestra *Prosopis laevigata*, puede deberse a que se trate de una bacteria cuya selección, por factor Nod, no sea tan estricta, es probable que este carácter promiscuo se encuentre fijado como una estrategia adaptativa a las condiciones restrictivas que se dan en las áreas de distribución del género *Prosopis* (zonas áridas y semiáridas principalmente); y esto puede suponerse al observar los siguientes casos: *Prosopis juliflora* nodula con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Benata *et al.*, 2008); *Prosopis chilensis* se ha identificado que nodula con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Benata *et al.*, 2008), *Prosopis alba* nodula con los géneros *Rhizobium* (Abril y González, 1994) y *Mesorhizobium* (Velazquez *et al.*, 2001); *Prosopis glandulosa* Torr nodula con los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Jenkins, 2003).

9.5 Pruebas de nodulación

Los resultados de nodulación muestran que las plantas inoculadas con la cepa Andícola (*Rhizobium*) presentaron buena nodulación, ya que tuvieron poco más de 10 nódulos por individuo, esto según la clasificación

hecha por Bala y colaboradores en 1990; mientras que, en las plántulas inoculadas con cepa Mexicana (*Mesorhizobium*), la nodulación fue considerada como mala por tener, en promedio, menos de 5 nódulos.

Sumado a lo anterior, al analizar las tendencias de crecimiento de raíz y tallo en la primera revisión (48 días), se encontró que en las plantas noduladas con cepa Andícola, las raíces fueron más cortas que los tallos, mientras que en las plántulas del tratamiento control y las inoculadas con cepa Mexicana se observó una tendencia contraria (raíces más largas que los tallos), indicando que éstas últimas, al estresarse por la deficiencia de nitrógeno, estarían desviando recursos de la zona aérea hacia las raíces como estrategia adaptativa, a fin de explorar nuevas zonas del suelo en busca del recurso nutritivo. Tendencias similares ya habían sido observadas en plántulas de *Prosopis laevigata* sometidas a regímenes nutrimentales deficientes en nitrógeno (Salas, 2009) y en otras especies del mismo género (Imo y Timer 1992 a y b; Aiazzi *et al.*, 1996; Vilela *et al.*, 2003).

Mientras que los resultados a los 140 días, indican un marcado estrés en las plantas control y las inoculadas con cepa Mexicana, reflejado en el limitado crecimiento presentado, en tanto que las plántulas noduladas con cepa Andícola, al contar con el nitrógeno fijado en sus nódulos, presentó mejores valores de crecimiento. Por lo tanto, se considera, en principio, que la cepa Andícola perteneciente al género *Rhizobium* tiene una mayor capacidad infectiva y efectiva.

9.6 Parámetros fotosintéticos

Los valores de los parámetros fotosintéticos se presentaron esencialmente bajos para las plántulas usadas en la prueba de nodulación, y en particular, en las plántulas control, donde no hubo valores detectables; lo cual significa que los valores fueron tan bajos que el equipo no logró registrarlos. Esto es resultado de un marcado estrés nutrimental por la carencia de nitrógeno, el cual afecta la respuesta fisiológica, ya que, en promedio, las plantas invierten 75% del nitrógeno que obtienen en diversos puntos del proceso fotosintético, en particular se sugiere que la enzima limitante, en caso de estrés nutrimental de nitrógeno, es la RUBISCO (ribulosa-2,5-bifosfato carboxilasa-oxigenasa), algunos autores han considerado que este efecto puede ser incluso mayor que el causado sobre la producción de clorofila (Boussadia *et al.*, 2010).

La capacidad fotosintética, en principio, aumenta linealmente con el aumento de concentraciones del N, mientras no haya otros factores limitantes (Azcón-Bieto, 2008). En este sentido, los resultados de este trabajo coinciden con otros trabajos, donde se ha observado que al someter plantas de sorgo a deficiencia de nitrógeno, éstas disminuyeron su área foliar, clorofila y tasa fotosintética, asociando esto, entre otras cosas, a la disminución de

la apertura estomática y la concentración de CO₂ intracelular (Zhao *et al.* 2005). En un experimento realizado por Imo y Timer en 1992, se observó que al inducir estrés hídrico a plántulas de *P. chilensis* después de mantenerlas bajo un régimen nutricional deficiente, las plántulas no disminuyeron su apertura estomática ni su tasa de transpiración; es decir que un estrés nutricional prolongado afecta las respuestas fisiológicas de estas plantas. Estos efectos también han sido observados en olivos, donde se observó que la escases de nitrógeno provocó una marcada reducción de la tasa fotosintética, encontrando que la relación entre el contenido de nitrógeno y la tasa máxima de asimilación de éste, en hojas, es de entre 1.7 y 2% de la materia seca (Boussadia *et al.*, 2010).

Es importante hacer notar que, con los resultados obtenidos en este trabajo, que, a pesar de los efectos negativos sobre el estado fisiológico de las plántulas, causados por la deficiencia de nitrógeno, y no obstante que éstas debían sostener a sus simbiosis, las plántulas sobrevivieron.

9.7 Identificación de Flavonoides

Los compuestos detectados en los tiempos de retención 5.40, 6.11, 6.14, 7.88 y 8.36 corresponden a espectros de isoflavonas, las cuales probablemente sean la misma; ya que los espectros, con sus respectivos máximos de absorbancia, indican que el cromóforo es el mismo, aunque probablemente presentan un grupo conjugado diferente, el cual modifica su polaridad y, por lo tanto, su tiempo de retención, los compuestos asociados más comunes son azúcares, tales como hexosas, deoxihexosas o pentosas y, en algunos casos, ácido glucorónico, con la posible adición de *O*- o *C*-glicosilación (Stobiecki, 2000). Ejemplos de isoflavonas con capacidad inductora de genes *nod* son la genisteína, la daidzeína y isolicuiritigenina, las cuales han sido obtenidas a partir de plántulas de *Glicine max*, y que inducen la transcripción de genes *nod* de bacterias del género *Bradyrhizobium* (Hungria y Satacey, 1997) y de los géneros *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Ba, 2002).

Por otro lado, en el minuto 7.51 se detectó un compuesto, cuyos máximos de absorbancia indican que se trata de una flavona; se han identificado alrededor de 3000 diferentes tipos de flavona (Klejdus *et al.*, 2001) y algunos ejemplos de estos compuestos con capacidad inductora de genes de nodulación en rizobios son apigenina, luteonina en *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Ba, 2002).

En el minuto 11.72 se registró un compuesto, cuyo espectro y máximos de absorbancia indican que se trata de un flavonol. En este sentido, el Kaempferol es uno de estos compuestos que ha mostrado tener efecto inductor de genes *nod* en cepas de *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Ba, 2002), así como en *Rhizobium leguminosarium* bv. *Phaseoli* y *Rhizobium etli* (Hungria y Satacey, 1997).

9.8 Actividad biológica de compuestos fenólicos

Los resultados muestran que solo el tratamiento con quercetina tuvo efecto inductor de genes, ya que se trata del control positivo, tal como indujo expresión en genes *nod* de *Rhizobium leguminosarium*. (Hungria *et al.* 1991). También puede descartarse el efecto del solvente, ya que no se mostró ningún tipo de actividad en la expresión de genes *nod* con este tratamiento.

Los resultados obtenidos no permiten descartar la posible actividad de los exudados sobre la cepa probada; ya que pudiera ser que en diferentes concentraciones la respuesta sea distinta, pues prácticamente todos los ejemplos de interacción simbiótica, estudiados hasta la fecha, es iniciada por concentraciones micromolares o nanomolares de flavonoides o isoflavonoides. Por otro lado, también es importante considerar que los flavonoides exudados de raíces y de semillas, han mostrado otras funciones importantes durante el proceso simbiótico; tales como la atracción química de los microorganismos favoreciendo la colonización de la rizosfera, y, en algunos pocos casos, favorecer el crecimiento de rizobios. Una conclusión similar fue la de Ba y colaboradores en el 2002, quienes encontraron una inducción muy pobre para un par de cepas rizobios (*Sinorhizobium* ORS1236 y *Mesorhizobium* ORS1265) al probarlas con diferentes inductores, por lo que sugieren que lo ocurrido fue una mala interacción entre las proteínas NodD de las cepas y el promotor *nod*; y por ello, no descartan la posibilidad de no haber encontrado el inductor adecuado.

10. Conclusiones

Con base en el análisis y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo, se tienen las siguientes conclusiones:

- Se aislaron y se identificaron tres cepas puras de rizobios: Mexicana (*Mesorhizobium*), Andícola (*Rhizobium*) y Zapotitlana (*Sinorhizobium*).
- Las cepas son de rápido crecimiento, de color blanco, forma convexa y productoras de ácido.
- *Prosopis laevigata* es capaz de nodular con, al menos, tres géneros de rizobios diferentes, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*.
- La cepa Andícola, perteneciente al género *Rhizobium*, presentó mejores características infectivas y efectivas.
- No se encontró capacidad inductora con la concentración usada de la mezcla de flavonoides obtenidos a partir de exudados de semillas de *Prosopis laevigata*.

Fuentes Citadas

1. Abril A. y González C. 1994. The *Rhizobium-Prosopis* symbiosis in the Argentinian Chaco Arido. Rev. Argent. Microbiol. 26: 1–8.
2. Aiazzi M.T., Argiello J.A., Abril A. 1996. Nodulated and non-nodulated *Prosopis chilensis* (Mel) St. seedlings: economy of carbon and nitrogen. Forest Ecology and Management. 89: 25-29
3. Alarcon A. y Ferrera-Cerrato R. (Eds). 2000. Ecología, Fisiología y Biotecnología de la Micorriza Arbuscular. Mundi Prensa. México. 260 pp.
4. Antunes P.M., Rajcan I. y Goss M.J. 2006. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). Soil Biol Biochem. 38: 533–543.
5. Arias T. A. A. 2000. Las plantas de Zapotitlán Salinas, Puebla. Un folleto de divulgación sobre botánica y conservación. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. México, D. F. 72 p.
6. Azcón-Bieto J. y Talón M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw-Hill Interamericana. Ediciones Universitarias de Barcelona. Barcelona, España.
7. Ba S., Willems A., De Lajudie P., Roche P., Jeder H., Quatrini P. Neyra M., Ferro M., Promé J. C., Gillis M., Boivin-Masson C. and Lorquin J. 2002. Symbiotic and Taxonomic Diversity of Rhizobia Isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. System. Microbiol. 25: 130–145.
8. Bala N., Sharma P.K. and Lakshminarayana K. 1990. Nodulation and nitrogen fixation by salinity tolerant rhizobia in symbiosis with tree legumes. Agriculture, Ecosystems and Environment. 33: 33-46
9. Begum, A.A., Leibovitch, S., Migner, P. and Zhang, F. 2001. Specific flavonoids induced *nod* gene expression and preactivated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. Experimental Botany. 52: 1537–1543.
10. Benata H., Mohammeda O., Noureddine B., Abdelbasset B., Abdelmoumenm H., Muresu R., Squartini A., El Idrissi M. 2008. Diversity of bacteria that nodulate *Prosopis juliflora* in the eastern area of Morocco. Systematic and Applied Microbiology. 31: 378–386
11. Beristain C. I. and Vernon-Carter E. J. 1995. Studies of the interaction of Arabic (*Acacia Senegal*) and mesquite *Prosopis juliflora* gum as emulsion stabilizing agents for spray-dried encapsulate orange peel-oil. Drying Technol. 13 (1, 2):455-461.
12. Bolaños-Vázquez M. C. and Werner D. 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. Etli*, and *R. Leguminosarum* bv. *Phaseoli* on *nod* Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*. Molecular Plant-Microbe Interaction. 10 (3): 889-897.

13. Boussadia O., Steppe K., Zgallai H., Ben El Hadj S., Braham M., Lemeur R. y Van Labeke M.C. 2010. Effects of nitrogen deficiency on leaf photosynthesis, carbohydrate status and biomass production in two olive cultivars 'Meski' and 'Koroneiki'. *Scientia Horticulturae* 123: 336–34.
14. Bragg L., Bacon J. D., Mcmillan C. And Mabry T. J. 1978. Flavonoid Patterns in the *Prosopis juliflora* Complex. *Biochemical Systematics and Ecology*. 6: 113-116.
15. Broughton, W.J., Jabboury S. and Perret X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *Bacteriol.* 182: 5641-5652.
16. Cabrerizo, P.M., González, E.M., Aparicio-Trejo, P.M., Aresse-Igor, C. 2001. Continuous CO₂ enrichment leads to increased nodule biomass, carbon availability to nodule and activity of carbon-metabolising enzymes but does not enhance specific nitrogen fixation in pea. *Physiologia plantarum*. 113:33-40.
17. Caetano-Anolles G., Crist-Estes D.K. and Baur W.D. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Bacteriology*. 170: 3164–3169.
18. Calderon de R. G. y Rzedowski J. 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. ed., 1a reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
19. Cooper, J.E. 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*. 41: 1–62.
20. Cooper J.E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Applied Microbiology*. 103: 1355–1365.
21. Dénarié, J. and J. Cullimore. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell*. 74: 951-954.
22. Downie J.A. 1994. Signalling strategies for nodulation of legumes by rhizobia. *Trends Microbiol.* 2 (9): 318-24.
23. Downie J. A. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes, p. 387-402. En: H. P. Spaink, A. Kondrosi, and P. J. J. Hooykaas (eds), *The Rhizobiaceae: Molecular & Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
24. Djordjevic M. A., Redmond, Redmond J. W. Batley M. and Rolfe, B. G. 1987. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress in *Rhizobium trifolii*. *EMBO*. 6: 1173-1179.
25. Echavarría, Ch. F. G., Gutiérrez, L. R., Ledesma, R.R., Bañuelos, V.R., Aguilar, S.J., Serna, P.A., 2006. Influence of small ruminant grazing systems in a semiarid range in the state of Zacatecas, México. I Native vegetation. *Tec. Pecu. Mex.* 44 (2): 203–217.
26. Elbanna K., Elbadry M. y Gamal-Eldin H. 2009. Genotypic and phenotypic characterization of rhizobia that nodulate snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Egyptian soils. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 522–530.

27. Ferrera-Cerrato R., González-Chávez A. M. C, Rodríguez-Mendoza M. N. 1993 Manual de Agromicrobiología. Trillas. México. 142 pp.
28. Franke A. A., Laurie J., Christi J., Arakaki P., Suzanne P., Murphy P. 2004. Vitamin C and flavonoid levels of fruits and vegetables consumed in Hawaii. *Food Composition and Analysis*. 17: 1-35.
29. Frioni A. L. and Rodríguez M. M. 2001. Differentiation of rhizobia isolated from native legume trees in Uruguay. *Applied Soil Ecology* 16 275–282
30. Galindo-Almanza S., García-Moya E. y Wendt T. L. 2000. Formas de Aprovechamiento, Hibridación Natural y Sistema Reproductivo en las Especies de Mezquite (*Prosopis l.*, *Leguminosae*) de la Altiplanicie de San Luis Potosí, México. En: Frías Hernández J. T., Olalde-Portugal V. y Vernon-Carter E. J (Eds.). El Mezquite árbol de usos múltiples estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. 51-64.
31. Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. 2010. SeaView versión 4: A multiplataform graphical user interface for secuencia alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*. 27 (2): 221-224.
32. Greeham J. R., Grayer R. J., Harbone J. B., Reynolds V. 2007. Intra and interspecific variations in vacuolar flavonoids among *Ficus* species from the Budongo Forest, Uganda. *Biochemical Systematics and Ecologi*. 35: 81-90.
33. Gualtieri and Bisseling T. 2000. The Evolution of Nodulation. *Plant Molecular Biology*. 42:181–194.
34. Guerreiro N., Redmond J. W., Rolfe B. G., Djordjevic M. A. 1997. New *Rhizobium leguminosarum* Flavonoid-Induced Proteins Revealed by Proteome Analysis of Differentially Displayed Proteins. *The American Phytopathological Society*. 10(4): 506-516.
35. Haase S., Neumann G., Kania A., Kuzyakov Y., Römheld V., Kandeler E., 2007. Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biology & Biochemistry*. 39:2208-2221
36. Hartwig U. A. 1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Gustav Fischer Verlag*. 1(1): 92–120.
37. Haukka, K.E., Lindström, K. and Young, J.P.W. 1996. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. *Syst. Applied Microbiology*. 19: 352-359.
38. Herrera-Arreola G., Herrera Y., Reyes-Reyes B. G. y Dendooven L. 2007. Mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.), huisache (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.) and catclaw (*Mimosa biuncifera* Benth.) and their effect on dynamics of carbon and nitrogen in soils of the semi-arid highlands of Durango Mexico. *Arid Environments*. 69: 583–598
39. Hungria M., Joseph C. M. Phillips D. A. 1991. *Rhizobium* and Gene Inducers Exuded Naturali from Roots of Common Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Plant Physiology*. 97: 759-764.

40. Hungria, M. and Phillips, D.A. 1993. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6, 418–422.
41. Hungria, M. and Stacey, G. 2007. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 819–830.
42. Imo M. and Timmer V.R. 1992a. Growth, nutrient allocation and water relations of mesquite (*Prosopis chilensis*) seedlings at differing fertilization schedules. *Forest Ecology and Management*. 55: 279-294.
43. Imo y Timer V. R. 1992b. Nitrogen Uptake of Seedlings at Conventional and Exponential Fertilization schedules. *Soil Science Society of America*. 56:927-934.
44. Janczarek M, Urbanik-Sypniewska T, Skorupska A. 1997. Effect of authentic flavonoids and the exudate of clover roots on growth rate and inducing ability of nod genes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiological Research*. 152: 93–8.
45. Jenkins M. B. 2003. Rhizobial and bradyrhizobial symbionts of mesquite from the Sonoran Desert: salt tolerance, facultative halophily and nitrate respiration. *Soil Biology and Biochemistry*. 35: 1675–1682
46. Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga, M. E., Walker G. C. 2007. How symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature*. 5: 619–33.
47. Kapulnik Y., Joseph C. M. and Phillips D. A. 1987. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Physiology*. 84: 1193-1196.
48. Klejdus, B., Vitamvsová-Sterbová, D., Kubán, V. 2001. Identification of isoflavone conjugates in red clover (*Trifolium pratense*) by liquid chromatography–mass spectrometry after two-dimensional solidphase extraction. *Analytica Chimica Acta*. 450: 81–97.
49. Le Queré A.J., Deakin W.J., Schmeisser C., Carlson R.W., Streit W.R., Broughton W.J., Forsberg L.S. 2006. Structural characterization of a K antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234: deletion of the rkpMNO locus prevents synthesis of 5, 7-diacetamido-3, 5, 7, 9-tetra-deoxy-non-2-ulosonic acid. *Biological Chemistry*. 281: 28981-28992.
50. Lloret L., Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de Rhizobium. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47 (1-2): 43–60.
51. •Lin L. Z. and Harnli J. M. 2007. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and other Phenolic Compounds Using a Standar Analytical Approac for All Plant Materials. *Agricultural and Food Chemistry*. 55: 1084-1096
52. •Lin L. Z., Harnli J. M., Pastor-Corrales M. S., Luthia D. L. 2008. The polyphenolic profiles of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*. 107: 399-410.
53. López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montano, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogin, R.A., Espuny, M.R., Ollero, F.J. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology*. 154: 1825-1836.

54. López M., Martínez F., Del Valle C., Ortega O., Miró M. 2001. Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *Chromatography*. 922: 359-363.
55. Liu J. B. C. H. and Yao S. 2007. Simultaneous analysis and identification of main bioactive constituents in extract of *Zizyphus jujube* var. *spinosa* (*Ziziphi spinosi semen*) by high-spectrometry. *Talanta*. 71: 668-675.
56. López-Galindo F., Muñoz-Iniestra D., Hernández-Moreno M., Soler-Aburto A., Castillo-López M.C., Hernández-Arzate I. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 56: 19–41.
57. McInroy S. G., Campbell C. D., Haukka K. E. 1; Odee D. W., Sprent J. I. t, Wang W. J., Young J. P. W., Sutherland J. M. 1999. Characterisation of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using Biolog1 and partial 16s rRNA sequencing. *Microbiology Letters*. 170: 111-117
58. Maj D., Wielbo J., Marek-Kozaczuk M. y Skorupska A. 2008. Response to flavonoids as a factor influencing competitiveness and symbiotic activity of *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiological Research*. 165(1):50-60
59. Maldonado-Aguirre L. J. y de la Garza de la P. F. E. 2000. El Mezquite en México: Rasgos de Importancia Productiva y Necesidades de Desarrollo. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds.). *El Mezquite árbol de usos múltiples estado actual del conocimiento en México*. Universidad de Guanajuato, México. 37-50.
60. Mathesius U., Schlaman H. R. M., Spaink H. P., Sautter C., Rolfe B.G., Djordjevic M. A. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant*. 14: 23–34.
61. Muñoz I. D., Mendoza C. A., López G. F., Soler A. A., Hernández M. M. M. 2000. *Edafología, Manual de Métodos de Análisis de Suelo*. UNAM-FESI. México. 82p.
62. Muñoz-Iniestra, D. J., López G. F., Hernández M. M, Soler A. A. y López G. J. 2009. Impacto de la Pérdida de la Vegetación Sobre las Propiedades de un Suelo Aluvial. *Tierra Latinoamericana*: 27 (23): 237-246.
63. Nicholas K. B. and Nicholas H. B. Jr. 1997 GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author.
64. Nowak P., Soupas L., Thomas-Oates J. and Kristina Lindström. 2004. *Acacia senegal* and *Prosopis chilensis*-nodulating rhizobia *Sinorhizobium arboris* HAMBI 2361 and *S. kostiense* HAMBI 2362 produce tetra- and pentameric LCOs that are N-methylated, O-6-carbamoylated and partially sulfated. *Carbohydrate Research*. 339: 1061–1067.

65. Olvera H. M. T. 2006 Evaluación de los reguladores auxínicos AIA, AIB y p-Nitrofenil-indol-Acetato en la Rizogénesis de *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox* y *Mimosa luisana* de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Méx. 75 p.
66. Orozco V. J., Meráz V. S., Lechuga C. J. A., Cruz S. F. y Vernon-Carter J. 2000. Estudio preliminar sobre micro propagación de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Wild) M. C. Johnst. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds.). El Mezquite árbol de usos múltiples Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. 133-142.
67. Palacios .A. R., Hoc S. P., Burghardt D. A., Vilela E. A. 2000. *Prosopis l.*: Biodiversidad y clasificación, Estrategias adaptativas, reproductivas e importancia económica. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds.). El Mezquite árbol de usos múltiples Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. 13-36.
68. Pérez-Montaño F., Guasch-Vidal B., González-Barroso S., López-Baen F. J., Cubo T., Ollero F. J., Gil-Serrano M. G., Rodríguez-Carvajal M. A., Bellogina A. R., Espuny M. R. 2011. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Research in Microbiology*. 162: 715-723.
69. Peters N.K., Frost J.W. and Long S.R. (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*. 233: 977–980.
70. Raymond J., Siefert J. L., Staples C. R, Blankenship R. E. 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*. 21: 541–554.
71. Redmond J. W., Batley M., Djordjevic M. A., Innes R. W., Kuempel P. L., Rolfe B. G. 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature*. 323:632-635.
72. Reyes-Quintanar C. K., Ferrera-Cerrato R., Alarcón, A., Rodríguez, Z. S. 2000. En: Alarcón, A., Ferrera-Cerrato R., (Eds), Ecología, fisiología y biotecnología de la Micorriza arbuscular. Mundi Prensa. México. 56-68.
73. Reyes-Reyes B. G., Alcántara-Hernández R., Rodríguez V., Olalde-Portugal V. and Dendooven L. 2007. Microbial biomass in a semi arid soil of the central highlands of Mexico cultivated with maize or under natural vegetation. *European Journal of Soil Biology*. 43: 180-188.
74. Rincón J. J., Clavero T., Razz R., Pietrosevoli S., Mendez-Castro F., Noguera N. 2000. Efecto de la inoculación con cepas nativas e introducidas de *Rhizobium* sobre la fijación de nitrógeno en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit). *Revista de la Facultad de Agronomía (Luz)*. 17: 342-357.
75. Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C. and Brinkman U. A. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Chromatography*. 1112: 31-63.

76. Rodríguez-Mendoza M.N. y Ferrera-Cerrato R. 1984. Estudio y caracterización de la relación simbiótica de *Rhizobium phaseoli* en frijol (*Phaseolus vulgaris*) de distintos hábitos de crecimiento. Memorias XII Reunión Latinoamericana sobre *Rhizobium*, Campinas, Sao Paulo, Brazil.
77. Rodriguez-Zaragoza S., González-Ruiz T. González-Lozano E. Lozada-Rojas A., Mayzlish-Gati E., Steinberg Y. 2008. Vertical Distribution of Microbiol Communities Under the canopy of two legume bushes in the Tehuacán Desert, Mexico. *European Journal of Soil Biology*. 44: 377-380.
78. Rossen, L., Shearman, C.A., Johnston, A.W.B. and Downie, J.A. 1985. *EMBOL*. 4: 3369-3373
79. Ruíz T. G.; Zaragoza R. S. y Ferrera-Cerrato. R. 2008. Fertility island around *Prosopis laevigata* and *Pachycereus hollianus* in the drylands of Zapotitlán Salinas, México. *Arid Environments*. 72: 1202-1212.
80. Rzedowski, J., 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, México D.F. 432 pp.
81. Salas-Oropeza. J. 2009. Aislamiento e Identificación de Polifenoles Presentes en Exudados de Raíz de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnston (mezquite), Bajo Condiciones de Deficiencia en el Suministro de Nitrógeno. Tesis de Licenciatura. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. Mex. 63 p.
82. Satoshi T. and Ragai K. I. 1995. Prenilate Isoflavonoids an Update. *Phytochemistry*. 38 (5): 1073-1094.
83. (S. A. R. H) Secretaria De Agricultura Y Recursos Hidráulicos. 1970. Instructivos para la determinación e interpretación de los análisis físicos de los suelos agrícolas. Subsecretaria de Desarrollo y Fomento Agropecuario y Forestal. México.
84. Sessitsch, A., J.G. Howieson, X. Perret, H. Antoun & E. Martínez-Romero. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Crit. Rev. Plant Science*. 21:323-378.
85. Singer M. J. and Munns. 1992. *Soils. An Introduction*. Second edition. Ed. Macmillan. Singapore.
86. Spaink H.P., Okker R.J.H., Wijffelman C.A., Pees E., Lugtenberg, B.J.J. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRLIJ1. *Plant Molecular Biology*. 9: 27-39.
87. Stobiecki M. 2000. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*. 54: 237-256.
88. Subramanian S., Stacey G., Yu, O. 2006. Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant* . 48: 261–273.
89. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
90. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25, 4876–4882.

91. Valiente-Banuet A., Casas A., Alcantara A., Davila P., Flores-Hernández, N., Arizmendi M.C., Ortega Ramírez J., Soriano J.A., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlan. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67: 24–74.
92. van Rhijn, P. & J. Vanderleyden. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiology Reviews. 59:124-142.
93. Vásquez-Méndez R., Ventura-Ramos E., Oleschko K. Hernández-Sandoval L., Parrot J. F., Nearing M. A. 2009. Soil erosion and runoff in different vegetation patches from semiarid Central Mexico. Catena. 80: 162–169.
94. Velázquez E., Igual J. M., Willems A., Fernandez M. P., Muñoz E., Mateos P. F. Abril A., Toro N., Normand P., Cervantes E., Gillis M. y Martínez-Molina E. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). Systematic and Evolutionary Microbiology (2001), 51, 1011–1021.
95. Vilela A.E., Rennellab M.J. y Ravetta D. A. 2003. Responses of tree-type and shrub-type *Prosopis* (*Mimosaceae*) taxa to water and nitrogen availabilities. Forest Ecology and Management. 186: 327–33.
96. Wasson A.P., Pellerone F.I. and Mathesius U. 2006. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. Plant Cell. 18: 1617–1629.
97. Waldon H.B., Jenkins M.B., Virginia R.A., Harding E.E., 1989. Characteristics of woodland rhizobial populations from surface- and deep-soil environments of the Sonoran Desert. Applied and Environmental Microbiology. 55: 3058–3064.
98. Young J.P.W., Downer H.L., Eardly B.D. 1991. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. Bacteriology. 173: 2271–2277.
99. Zhao D., Raja K. R., Vijaya G. K. and Reddy V.R. 2005. Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. European Journal of Agronomy. 22: 391–403
100. Zhang F. and Smith D.L., 1995. Preincubation of *Bradyrhizobium japonicum* with genistein accelerates nodule development of soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) at suboptimal root zone temperatures. Plant Physiology. 108: 961–968
101. Zehr J.P., Wyman M. V., Miller L, Duguay D.G., Capone. 1993. Modification of the Fe protein of nitrogenase in natural populations of *Trichodesmium thiebautii*. Applied and Environmental Microbiology. 59: 669-676.
102. Zulueta R. R., Lara C. L. y Trejo A. D. Manual de prácticas generales del Laboratorio de Organismos Benéficos. 2009. México. Universidad Veracruzana. 148 pag

Anexo 1

Soluciones Nutritivas y Medios de Cultivo.

SOLUCIÓN NUTRITIVA SIN NITRÓGENO (MODIFICADA DE LA FÓRMULA ORIGINAL DE HOAGLAND AL CONTENER Fe EN FORMA DE QUELATO [Fernández y Johnson, 1986 en Zulueta-Rodríguez, *et al.*, 2009])

Compuesto*	Concentración	Cantidad de solución madre en ml, p/1 L de solución nutritiva	Cantidad en ml de soluciones madre, p/20 L de solución nutritiva
MgSO ₄ 7H ₂ O	1 M (246.50 g L ⁻¹)	2	40
KH ₄ PO ₄	1 M (136 g L ⁻¹)	1	20
Quelato de Fe**	5000 ppm de Fe	1	20
Micronutrientes***	-----	1	20
CaCl	1 M (110.99 g L ⁻¹)	5	100
KCl	1 Molar (74.55 g L ⁻¹)	5	100

*Los compuestos a emplear deben de ser puros, para análisis.

** Solución que contiene 25 g de FeSO₄·7H₂O, 26 g de etilendiaminetetracetato de sodio (Na₂ EDTA); 14 g NaOH, en 1 Litro de agua destilada.

*** Solución de microelementos (Mn, B, Zn, Cu, Mo) con la composición siguiente: MnCl₂: 1.81 g; H₃BO₃: 2.86 g; ZnSO₄·7H₂O: 0.22 g; CuSO₄·5H₂O: 0.88 g; H₂MoO₄: 0.09 g; 1 litro de agua destilada

Nota: Todos los medios de cultivo deben ser esterilizados en autoclave a 150 °C, por 18 minutos.

MEDIO DE CULTIVO EXTRACTO DE LEVADURA-MANITOL (ELM)

(Ferrera *et al.*, 1993)

COMPUESTO	Caldo extracto de levadura manitol (CELM)	Extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT)	Extracto de levadura manitol agar rojo congo (ELMARC)
K ₂ HPO ₄	1 g	1 g	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.18 g	0.18 g	2 g
NaCl	0.2 g	0.2 g	0.18
Manitol	9 g	9 g	9 g
Extracto de levadura	1.5 g	1.5 g	1.5 g
Agua destilada	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Agar	-----	15 g	15 g
Solución de azul de bromotimol*	-----	5 ml	-----
Rojo Congo**	-----	-----	10 ml
pH	7	7	7

*Azul de bromotimol: 0.5 g; Etanol: 50 ml; agua destilada: 50 ml.

** Rojo Congo: 1 g, agua destilada: 400 ml. Disolver el colorante en el agua, filtrar si es necesario antes de usarlo.

GLUCOSA PEPTONA AGAR

(Ferrera *et alt.*, 1993)

Compuesto	Concentración
Glucosa	10 g
Peptona	5 g
Púrpura de bromocresol	0.1% 10 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

LECHE TORNASOLADA

Compuesto	Concentración
Leche tornasolada Difco	100 g
Agua destilada	100 ml (aforar a 100 ml)

COLORACIÓN DE GRAM

Solución A (cristal violeta)		Solución B (Iugol)	
Cristal violeta	10 g	Yodo	1g
Oxalato de amonio	4 g	Yoduro de potasio	2 g
Alcohol absoluto	100 ml	Alcohol absoluto	25 ml
Agua destilada	400 ml	Agua destilada	10 ml
Solución C (alcohol yodado)		Solución D (Safranina)	
Solución de yodo	5 ml	Safranina	2.6 g
Alcohol absoluto	95 ml	Etanol	10 ml
		Agua destilada	90 ml

Anexo 2

Comparación de secuencias (Blast)

Blast de la secuencia de la cepa Mexicana

Cuadro 7 Coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Mexicana contra las de la base de datos del NCBI

Accession	Description	E value	Max ident
D84623.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S23423 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
D84639.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S24538 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
D84631.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. S23442 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
FJ269079.1	Iron-reducing bacterium enrichment culture clone HN125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ125549.1	Uncultured bacterium clone AKAU3525 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AJ007857.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. HB5A4 16S rRNA gene	0.0	96%
AM116720.1	Uncultured alpha proteobacterium partial 16S rRNA gene, clone JG35+U2B-AG53	0.0	96%
AJ007856.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. HN14A16 16S rRNA gene	0.0	96%
AB531422.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. IV-10 gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
AB495349.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. S24554a gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
EU748915.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. BD56 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF410895.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Lo5-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
Z94817.1	<i>Mesorhizobium</i> genosp. S 16S rRNA gene	0.0	96%
U50164.1	<i>Rhizobium loti</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FN546876.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ORCI 7a partial 16S rRNA gene, strain ORCI 7a	0.0	96%
FN546875.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ORAI 19a partial 16S rRNA gene, strain ORAI 19a	0.0	96%
FN546865.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Chc7R8b partial 16S rRNA gene, strain Chc7R8b	0.0	96%
JF175489.1	Uncultured bacterium clone ncd2027c05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU703137.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. REG325 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225386.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. 75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
X67229.2	<i>Mesorhizobium loti</i> partial 16S rRNA gene, strain LMG 6125 >gb JF342250.1 <i>Mesorhizobium</i> sp. R1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence >gb JF342251.1 <i>Mesorhizobium</i> sp. C3(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF282929.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. USDA 4003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AJ315351.1	<i>Mesorhizobium loti</i> 16S rRNA gene, strain LMG 17826t1	0.0	96%
EU074173.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 01461 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342259.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. K1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342258.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. T5(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342257.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. T2(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342256.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. N6(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342252.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. H68(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FN546873.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ORAI 2a partial 16S rRNA gene, strain ORAI 2a	0.0	96%
AB289612.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Ch881 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
FN563434.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. LCA1 partial 16S rRNA gene, strain LCA1	0.0	96%
GU120564.1	Uncultured alpha proteobacterium clone OP1_17_1_B08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FJ719056.1	Uncultured bacterium clone p03_F09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%

GU300182.1	Uncultured <i>Mesorhizobium</i> sp. clone PSB011.C21_E02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AB531425.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. IV-48 gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
EU074175.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 01465 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
X67230.1	<i>Mesorhizobium loti</i> partial 16S rRNA gene, strain LMG 4284	0.0	96%
AY922072.1	Uncultured alpha proteobacterium clone AKYG882 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF410896.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Lo9-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
U50168.1	<i>Rhizobium</i> sp. CJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
U50165.1	<i>Rhizobium loti</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342262.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. MC16(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342261.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. MC1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342260.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. MC2(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342255.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. C4(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342254.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. C1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342253.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. R3(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF214573.1	Uncultured bacterium clone ncd2484d12c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF214524.1	Uncultured bacterium clone ncd2484a03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
CP002447.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> biovar biserrulae WSM1271, complete genome	0.0	96%
GU300435.1	Uncultured <i>Mesorhizobium</i> sp. clone PSB011.C21_G10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU652116.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-8-Sintra 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU652106.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. PII-3-Porto 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF535812.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> strain GA-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ444456.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> strain UPM-Ca7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256446.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85075 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256444.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85072 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256439.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85064 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256438.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85063 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF611374.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. N39(2007) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY490105.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. rops-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY491066.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ICMP 12637 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY491065.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ICMP 11719 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY491064.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ICMP 12649 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY491063.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. ICMP 11736 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY601513.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> subsp. biserrulae strain WSM1271 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225398.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. EE-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225397.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. EE-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225389.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. CV-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225383.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. 27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY225382.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. 7a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF178962.1	<i>Biserrula</i> isolate strain WSM1284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY206686.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> strain C-2/2 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
AF282925.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. N20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY147203.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. CCBAU25126 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AJ417090.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Rch-10B partial 16S rRNA gene, isolate Rch-10B	0.0	96%
AJ417089.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Rch-2B partial 16S rRNA gene, isolate Rch-2B	0.0	96%
AJ417083.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Rch-19B partial 16S rRNA gene, isolate Rch-19B	0.0	96%
AJ417082.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. Rch-981 partial 16S rRNA gene, isolate Rch-981	0.0	96%
AJ271900.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. partial 16S rRNA gene, strain rob23	0.0	96%
AJ271899.1	<i>Mesorhizobium amorphae</i> partial 16S rRNA gene, strain rob8	0.0	96%
AJ271898.1	<i>Mesorhizobium amorphae</i> partial 16S rRNA gene, strain rob6	0.0	96%

AF041445.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. HL56 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0.0	96%
AM748942.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. TmGib6 partial 16S rRNA gene, isolate TmGib6	0.0	96%
AF526933.1	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone 84-5 16S ribosomal RNA (rrn) gene, partial sequence	0.0	96%
HM186191.1	Uncultured bacterium clone HDB_SION923 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU074176.1	<i>Mesorhizobium ciceri</i> strain CCBAU 01466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY490127.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. amfr-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FN600565.2	<i>Mesorhizobium</i> sp. GSM-484 partial 16S rRNA gene, isolate GSM-484	0.0	96%
EU703136.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. REG321 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU514524.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. SCAU27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256443.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85071 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256441.1	<i>Mesorhizobium loti</i> strain CCBAU 85068 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF611375.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. N46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY490130.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. wifl-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY490125.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. rops-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY601514.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. WSM2074 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342244.1	<i>Mesorhizobium</i> sp. T1(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF342242.1	Mesorhizobium		

Blast de la secuencia de la cepa Andícola

Cuadro 8 Coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Andícola contra las de la base de datos del NCBI

Accession	Description	E value	% Max Ident
NR_028663.1	<i>Rhizobium yanglingense</i> strain SH22623 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF003375.2 <i>Rhizobium yanglingense</i> strain SH22623 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
NR_028819.1	<i>Rhizobium loessense</i> strain CCBAU 7190B 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb AF364069.2 <i>Rhizobium loessense</i> strain CCBAU 7190B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
NR_036785.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain R602sp 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb U86343.1 RGU86343 <i>Rhizobium gallicum</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
NR_026066.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain USDA 1844 16S ribosomal RNA, partial sequence >gb U89817.1 RMU89817 <i>Rhizobium mongolense</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
NR_029330.1	<i>Rhizobium sullae</i> strain IS 123 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	96%
NR_042687.1	<i>Rhizobium alarii</i> strain :GBV016 16S ribosomal RNA, partial sequence emb AM931436.1 <i>Rhizobium alarii</i> partial 16S rRNA gene, type strain GBV016T	0.0	96%
HQ735084.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain PhD12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
HQ231424.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 45499 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF273845.1	<i>Rhizobium yanglingense</i> strain CCNWSX658 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FJ430075.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCNWSX426 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF535811.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain J-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU522115.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCNWNX0041 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU522114.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCNWSX0061 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU399696.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 01546 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU399690.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 01145 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU399689.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 01083 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256431.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256430.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256429.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85033 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256427.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256426.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256412.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85029 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256411.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85024 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256409.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85017 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%

EU256408.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU133607.1	Uncultured bacterium clone FFCH12734 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107506.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7364 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107505.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7363 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107504.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7365 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107503.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7361 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107502.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7360 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF107501.1	<i>Rhizobium</i> sp. UMR7359 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AM181756.1	<i>Rhizobium gallicum</i> partial 16S rRNA gene, strain R-4387	0.0	96%
DQ406711.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain RP421 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY141980.1	<i>Rhizobium</i> sp. SH445 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ125688.1	Uncultured bacterium clone AKAU3774 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ113665.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 25292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF345555.1	<i>Rhizobium</i> sp. X59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU652870.1	<i>Rhizobium</i> sp. ZY046 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU532143.1	<i>Rhizobium loessense</i> strain CCBAU 25159 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU399697.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 05122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FN433081.1	<i>Rhizobium gallicum</i> partial 16S rRNA gene, isolate 8a3	0.0	96%
FJ444748.1	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone 4y-62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU652872.1	<i>Rhizobium</i> sp. ZY049 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU652871.1	<i>Rhizobium</i> sp. ZY047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256428.1	<i>Rhizobium mongolense</i> strain CCBAU 85031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256410.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85019 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY141986.1	<i>Rhizobium</i> sp. SH1718alt 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY998045.1	<i>Rhizobium gallicum</i> bv. <i>gallicum</i> strain IE4770 16S ribosomal RNA (<i>rrs</i>) gene, partial sequence	0.0	96%
U89822.1	<i>Rhizobium mongolense</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256405.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85141 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF634023.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain ISSDS-850 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ836143.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 13093 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256406.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85006 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY056831.1	<i>Rhizobium</i> sp. CA8561 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU170558.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 65308 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY775168.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 33220a 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AJ846892.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU33220A partial 16S rRNA gene	0.0	96%
AB552864.1	<i>Rhizobium</i> sp. DC2b-15 gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
GU552885.1	<i>Rhizobium alarii</i> strain CCBAU 15292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AB456618.1	<i>Rhizobium</i> sp. Cg-N13 gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
FJ183428.1	<i>Rhizobium sullae</i> strain CCBAU15292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU256432.1	<i>Rhizobium sullae</i> strain CCBAU 85011 16S ribosomal RNA gene, partial	0.0	96%

	sequence		
EU256407.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain CCBAU 85012 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF506199.1	<i>Rhizobium etli</i> isolate B11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY509211.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain S109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AB240369.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: RB396	0.0	96%
DQ337578.1	<i>Rhizobium</i> sp. CHNTR53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
U89823.1	<i>Rhizobium</i> sp. 'USDA 1920' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
U89821.1	<i>Rhizobium mongolense</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF070128.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 05134 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU488748.1	<i>Rhizobium gallicum</i> strain R602 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
GU552889.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 45133 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FJ172678.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> strain CCBAU 41150 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU723702.1	<i>Rhizobium sulae</i> strain CCBAU 61214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EU723701.1	<i>Rhizobium sulae</i> strain CCBAU 45230 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AM922177.1	<i>Rhizobium gallicum</i> partial 16S rRNA gene, isolate Sulf-70	0.0	96%
EF061101.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 05043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY500264.1	<i>Rhizobium</i> sp. ORS 1466 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF239242.1	<i>Rhizobium</i> sp. YAS34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
Y10170.1	<i>Rhizobium sulae</i> partial 16S rRNA gene, type strain IS 123T	0.0	96%
EF070130.1	<i>Rhizobium mesosinicum</i> strain CCBAU 25217 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY776233.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC90b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%
EF437248.1	<i>Rhizobium</i> sp. RB3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ267112.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 25232 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY776234.1	<i>Rhizobium</i> sp. AC90e1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%
U89819.1	<i>Rhizobium mongolense</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
JF125382.1	Uncultured bacterium clone ncd1452c06c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
FN796844.1	<i>Rhizobium alamii</i> partial 16S rRNA gene, strain GR17	0.0	96%
FJ418698.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 41184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AB456624.1	<i>Rhizobium</i> sp. Cg-S9 gene for 16S rRNA, partial sequence	0.0	96%
EU823105.1	<i>Rhizobium yanglingense</i> strain CCBAU 05160 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF061113.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 05182 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ485277.1	<i>Rhizobium mesosinicum</i> strain CCBAU 41228 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AY395697.1	<i>Rhizobium mesosinicum</i> strain CCBAU 41044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF325772.1	<i>Rhizobium</i> sp. WSM749 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ310800.1	<i>Rhizobium mesosinicum</i> strain CCBAU 41176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
AF195031.1	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU71462 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
EF651020.1	Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone AUVE_03H11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%
DQ310796.1	<i>Rhizobium mesosinicum</i> strain CCBAU 41015 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96%

Blast de la secuencia de la cepa Zapotitlana

Cuadro 9 Coincidencias de la comparación de secuencia de cepa Zapotitlana contra las de la base de datos del NCBI

Accession	Description	E value	Max ident
JN009337.1	Sinorhizobium americanun strain ENC8TM 43 16S ribosomal RNA gene	0.0	94%
JN009835.1	Sinorhizobium americanun strain ENC8TM 31 16S ribosomal RNA gene	0.0	94%
JN009834.1	Sinorhizobium americanun strain ENC8TM 1 16S ribosomal RNA gene	0.0	94%
JF450189.1	<i>Ensifer</i> sp. AC47c 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450186.1	<i>Ensifer</i> sp. AC47a 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450185.1	<i>Ensifer</i> sp. AC38d2 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450184.1	<i>Ensifer</i> sp. AC38d1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450179.1	<i>Ensifer</i> sp. AC27e 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450177.1	<i>Ensifer</i> sp. AC27d1 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450176.1	<i>Ensifer</i> sp. AC27c 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450170.1	<i>Ensifer</i> sp. AC25c 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450169.1	<i>Ensifer</i> sp. AC25b 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450168.1	<i>Ensifer</i> sp. AC25a 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450165.1	<i>Ensifer</i> sp. AC25a 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450164.1	<i>Ensifer</i> sp. AC22d 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450162.1	<i>Ensifer</i> sp. AC21c1 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450159.1	<i>Ensifer</i> sp. AC19a 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450158.1	<i>Ensifer</i> sp. AC198a 1 16S rhibosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%

JF450156.1	<i>Ensifer</i> sp. AC17e1 1 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450149.1	<i>Ensifer</i> sp. AC16b1 1 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450144.1	<i>Ensifer</i> sp. AC10d 1 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF450139.1	<i>Ensifer</i> sp. AC08a1 1 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF330110.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU228 ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF330109.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU226 ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
JF330107.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCAU223 ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
HQ231461.1	<i>Sinorhizobium fredii</i> strain SCABAU 23319 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
HQ231459.1	<i>Sinorhizobium fredii</i> strain SCABAU 23343 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
HQ231455.1	<i>Sinorhizobium</i> sp. SCABAU 051127 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%
HQ231453.1	<i>Sinorhizobium fredii</i> strain SCABAU 25509 16S ribosomal RNA gene, parcial secuencia	0.0	94%

Anexo 3

Análisis estadístico pruebas de nodulación y parámetros fotosintéticos

Descriptive Statistics: No. nódulos, Raíz (cm), Tallo (cm), Fotosíntesis, Conductancia estomática, concentración de CO₂ intracelular y transpiración.

VARIABLE	CEPA	N	N*	MEAN	ST DEV	COEF VAR	MINIM	Q1	Median	Q3	Maxi
No. nódulos	Andícola	20	0	11.8	5.57	47.19	3	7.25	12	14.75	23
	Control	20	0	0	0	*	0	0	0	0	0
	Mexicana	20	0	0.55	1.701	309.2	0	0	0	0	6
Raíz (cm)	Andícola	20	0	26.02	15.61	59.99	9.4	12.08	22	33.2	58.5
	Control	20	0	20.04	6.99	34.9	10	15.13	19	24.75	37
	Mexicana	20	0	20.24	6.5	32.13	13.5	15.28	17.1	24.5	37
Tallo (cm)	Andícola	20	0	9.87	7.29	73.91	2.8	4.25	7.5	15	27
	Control	20	0	2.87	0.918	32	1.8	2.225	2.5	3.15	5
	Mexicana	20	0	3.83	1.463	38.19	2.5	3	3.5	4.15	8
Fotosíntesis	Andícola	20	0	1.386	1.304	94.08	0	0	1.9	2.295	3.78
	Control	20	0	0.263	0.615	233.68	0	0	0	0.0987	1.87
	Mexicana	20	0	0.537	0.652	121.37	0	0	0.101	1.215	1.86
Conductancia	Andícola	20	0	0.1029	0.2797	271.95	0	0	0.00933	0.0204	0.92
	Control	20	0	0.001454	0.00396	272.45	0	0	0	0	0.0159
	Mexicana	20	0	0.002531	0.003083	121.81	0	0	0.000885	0.00477	0.00844
CI	Andícola	20	0	295.7	374.1	126.49	0	0	4.82	693	843
	Control	20	0	105.6	229.8	217.66	0	0	0	37.4	694
	Mexicana	20	0	201.6	232.5	115.31	0	0	219	379	868
Transpiración	Andícola	20	0	0.3676	0.3365	91.56	0	0	0.475	0.562	1.03
	Control	20	0	0.0413	0.1037	251.07	0	0	0	0	0.419
	Mexicana	20	0	0.125	0.2103	168.21	0	0	0	0.177	0.662

Results for Cepa = Andina

Variable	Tiempo	N	N*	Mean	StDev	CoefVar	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
No. nódulos	48	10	0	10.5	5.06	48.2	3	5.75	11	13.5	20
	140	10	0	13.1	6.01	45.87	5	7.75	12.5	18.75	23
Raíz (cm)	48	10	0	14.2	4.66	32.81	9.4	11	12.15	18.95	23
	140	10	0	37.83	13.5	35.69	21	27.8	32.9	53.25	58.5
Tallo(cm)	48	10	0	4.53	1.605	35.43	2.8	3.08	4.5	5.35	8
	140	10	0	15.2	6.81	44.81	7	9.5	14	20.5	27
Fotosíntesis	48	10	0	1.501	1.312	87.36	0	0	1.965	2.315	3.78
	140	10	0	1.27	1.356	106.75	0	0	1.156	2.27	3.78
Conductancia	48	10	0	0.104	0.287	276.53	0	0	0.0141	0.0258	0.92
	140	10	0	0.102	0.288	282.32	0	0	0.0089	0.0258	0.92
CI	48	10	0	296	384	129.79	0	0	4.82	718	843
	140	10	0	296	385	130.13	0	0	3.07	718	843
Traspiración	48	10	0	0.393	0.335	85.38	0	0	0.487	0.577	1.03
	140	10	0	0.343	0.354	103.36	0	0	0.35	0.577	1.03

Results for Cepa = Control

Variable	Tiempo	N	N*	Mean	StDev	CoefVar	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
No. nódulos	48	10	0	0	0	*	0	0	0	0	0
	140	10	0	0	0	*	0	0	0	0	0
Raíz (cm)	48	10	0	16.29	3.36	20.64	10	14.1	15.9	19.7	20
	140	10	0	23.78	7.79	32.78	13.5	16.3	23.5	30.13	37
Tallo (cm)	48	10	0	2.74	0.925	33.77	1.8	2	2.4	3.25	4.6
	140	10	0	3	0.942	31.39	2	2.5	2.5	3.475	5
Fotosíntesis	48	10	0	0.513	0.811	158.04	0	0	0	1.433	1.87
	140	10	0	0.0132	0.0416	316.23	0	0	0	0	0.1316
Conductancia	48	10	0	0.00291	0.00533	183.36	0	0	0	0.00629	0.0159
	140	10	0	0	0	*	0	0	0	0	0
CI	48	10	0	124.7	249.5	200.11	0	0	0	149.5	694
	140	10	0	86.5	220.1	254.47	0	0	0	42.8	694
Traspiración	48	10	0	0.0826	0.1375	166.47	0	0	0	0.1708	0.419
	140	10	0	0	0	*	0	0	0	0	0

Results for Cepa = Mexicana

Variable	Tiempo	N	N*	Mean	StDev	CoefVar	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
No. nódulos	48	10	0	0	0	*	0	0	0	0	0
	140	10	0	1.1	2.331	211.9	0	0	0	1.25	6
Raíz (cm)	48	10	0	15.33	0.986	6.43	13.5	14.5	15.35	16.15	16.7
	140	10	0	25.15	5.89	23.43	17.5	20.88	24	30.13	37
Tallo (cm)	48	10	0	3.27	0.727	22.24	2.5	2.5	3	4	4.5
	140	10	0	4.39	1.814	41.32	2.5	3	3.6	6.125	8
Fotosíntesis	48	10	0	0.626	0.725	115.7	0	0	0.273	1.285	1.86
	140	10	0	0.448	0.596	132.9	0	0	0.093	1.185	1.45
Conductancia	48	10	0	0.003383	0.00292	86.23	0	0	0.00391	0.00534	0.00844
	140	10	0	0.001679	0.00315	187.79	0	0	0	0.00297	0.00844
CI	48	10	0	245	278.2	113.52	0	0	234.5	424.3	868
	140	10	0	158.2	180.4	114.03	0	0	109.7	297	437
Traspiración	48	10	0	0.2329	0.254	109.08	0	0	0.175	0.4955	0.662
	140	10	0	0.0171	0.0541	316.23	0	0	0	0	0.171

Results for Cepa = Andícola

Variable	Tiempo	N	N*	Mean	StDev	CoefVar	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
No. nódulos	48	10	0	10.5	5.06	48.2	3	5.75	11	13.5	20
	140	10	0	13.1	6.01	45.87	5	7.75	12.5	18.75	23
Raíz (cm)	48	10	0	14.2	4.66	32.81	9.4	10.98	12.15	18.95	23
	140	10	0	37.83	13.5	35.69	21	27.75	32.9	53.25	58.5
Tallo (cm)	48	10	0	4.53	1.605	35.43	2.8	3.075	4.5	5.35	8
	140	10	0	15.2	6.81	44.81	7	9.5	14	20.5	27
Fotosíntesis	48	10	0	1.501	1.312	87.36	0	0	1.965	2.315	3.78
	140	10	0	1.27	1.356	106.75	0	0	1.156	2.27	3.78
Conductancia	48	10	0	0.104	0.2871	276.53	0	0	0.0141	0.0258	0.92
	140	10	0	0.102	0.2878	282.32	0	0	0.00887	0.0258	0.92
CI	48	10	0	296	384	129.79	0	0	4.82	718	843
	140	10	0	296	385	130.13	0	0	3.07	718	843
Traspiración	48	10	0	0.393	0.335	85.38	0	0	0.487	0.577	1.03
	140	10	0	0.343	0.354	103.36	0	0	0.35	0.577	1.03

General Linear Model: No. nódulos, Raíz (cm), ... versus Cepa, Tiempo

Factor	Type	Levels	Values
Cepa	fixed	3	Andina, Control, Mexicana
Tiempo	fixed	2	48, 140

Analysis of Variance for No. nódulos, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	1774.03	1774.03	887.02	79.3	0
Tiempo	1	22.82	22.82	22.82	2.04	0.159
Cepa*Tiempo	2	17.03	17.03	8.52	0.76	0.472
Error	54	604.3	604.3	11.19		
Total	59	2418.18				

S = 3.34526 R-Sq = 75.01% R-Sq(adj) = 72.70%

Analysis of Variance for Tallo (cm), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	575.15	575.15	287.58	31.64	0
Tiempo	1	242	242	242	26.62	0
Cepa*Tiempo	2	333.85	333.85	166.93	18.36	0
Error	54	490.84	490.84	9.09		
Total	59	1641.84				

S = 3.01489 R-Sq = 70.10% R-Sq(adj) = 67.34%

Analysis of Variance for Raíz (cm), using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	461.02	461.02	230.51	4.44	0.016
Tiempo	1	2793.47	2793.47	2793.47	53.77	0
Cepa*Tiempo	2	761.07	761.07	380.54	7.33	0.002
Error	54	2805.29	2805.29	51.95		
Total	59	6820.86				

S = 7.20762 R-Sq = 58.87% R-Sq(adj) = 55.06%

Analysis of Variance for Fotosíntesis, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	13.7004	13.7004	6.8502	8.06	0.001
Tiempo	1	1.3782	1.3782	1.3782	1.62	0.208
Cepa*Tiempo	2	0.2977	0.2977	0.1488	0.18	0.84
Error	54	45.8819	45.8819	0.8497		
Total	59	61.2581				

S = 0.921772 R-Sq = 25.10% R-Sq(adj) = 18.17%

Analysis of Variance for Conductancia, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	0.13569	0.13569	0.06785	2.46	0.095
Tiempo	1	0.00007	0.00007	0.00007	0	0.96
Cepa*Tiempo	2	0	0	0	0	1
Error	54	1.48732	1.48732	0.02754		
Total	59	1.62309				

S = 0.165961 R-Sq = 8.36% R-Sq(adj) = 0.00%

Analysis of Variance for CI, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	361636	361636	180818	2.1	0.132
Tiempo	1	26225	26225	26225	0.3	0.583
Cepa*Tiempo	2	18732	18732	9366	0.11	0.897
Error	54	4644612	4644612	86011		
Total	59	5051205				

S = 293.277 R-Sq = 8.05% R-Sq(adj) = 0.00%

Analysis of Variance for Traspiración, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Cepa	2	1.14845	1.14845	0.57422	10.63	0
Tiempo	1	0.20221	0.20221	0.20221	3.74	0.058
Cepa*Tiempo	2	0.07722	0.07722	0.03861	0.71	0.494
Error	54	2.91656	2.91656	0.05401		
Total	59	4.34443				

S = 0.232401 R-Sq = 32.87% R-Sq(adj) = 26.65%