

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *RHIZOBIUM* EN
LUPINUS SILVESTRES MEDIANTE PCR**

MODALIDAD: TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARIANA MARTÍNEZ PELAYO

LAS AGUJAS ZAPOPAN, JALISCO ENERO DE 2003

191 260/024579
B 759
62



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. MARIANA MARTÍNEZ PELAYO
PRESENTE.**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título "**Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus silvestres* mediante PCR**", para obtener la Licenciatura en Biología.

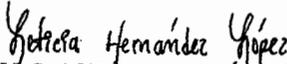
Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DR. HUGO CASTAÑEDA VÁZQUEZ** y como Asesor el/la **M.C. ERIKA MARTÍNEZ**.

**A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"**

**"2002, Año Constanza Hernández Alvirde"
Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 04 de diciembre del 2002**


**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIQUEJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DR. HUGO CASTAÑEDA VÁZQUEZ**.-Director del Trabajo.
c.c.p. **M.C. ERIKA MARTÍNEZ**.-Asesor del Trabajo.
c.c.p. **Expediente del alumno**

MERL/LHL/mam

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Titulación por Tesis que realizó la pasante: **Mariana Martínez Pelayo** con el código **193110196** con el título "**Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en *Lupinus silvestres* mediante PCR**", consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopán, Jal., a 10 de diciembre del 2002

EL DIRECTOR DE TESIS


DR. HUGO CASTAÑEDA
VÁZQUEZ



EL ASESOR


M. en C. ERIKA MARTÍNEZ

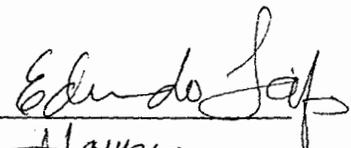
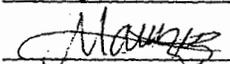
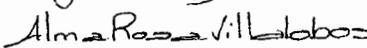
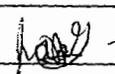
SINODALES

1.- DR. EDUARDO LÓPEZ ALCOCER

2.- DR. MARIO RUIZ LÓPEZ

3.- DRA. ALMA ROSA VILLALOBOS
ARÁMBULA

SUPL. M. C. ARMANDO ARIAS GARCÍA

CREDITOS

La presente tesis fue dirigida por el Dr. Hugo Castañeda Vázquez, así como la M. en C. Erika Martínez fungió como asesora. Los revisores fueron el Dr. Eduardo López Alcocer del Departamento de Ciencias Ambientales, el Dr. Mario Ruiz López del Departamento de Botánica y Zoología, la Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula del Departamento de Biología Celular y Molecular, y como suplente el M.C. Armando Arias García del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

Este proyecto fue apoyado por el proyecto CONACYT con N° de Registro 4047P-B, así como la asignación de Beca de Licenciatura.

AGRADECIMIENTOS

Al Director y asesora del presente trabajo por su ayuda, guía, tiempo, dedicación y paciencia.

A mi madre por su apoyo y por darme siempre valor, esperanza y confianza.

A mi padre por su admiración y apoyo.

A mi hermana por su cariño, compañía y ayuda.

A Charles por su paciencia y apoyo.

A la Dra. Marisela Hernández y el Dr. Miguel Angel Guevara por su amistad, comentarios y tiempo.

A la Universidad de Guadalajara por la oportunidad de formarme como profesionista.

A mis compañeros por su tiempo y amistad.

A mis sinodales por sus comentarios, apoyo y tiempo dedicado en la revisión del presente trabajo.

A mi familia que siempre me ha apoyado y dedicado tiempo a lo largo de mi vida.

DEDICATORIAS

A mi madre que ha sido la fuerza y el pilar de mi vida que me ha inspirado a seguir.

A TODA mi familia.

A Orlando por tu amor.

A mis amigos por su amistad.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
1.1 Fijación del nitrógeno	3
1.2 <i>Rizhobium</i>	
1.2.1 Descripción	7
1.2.2 Relaciones simbióticas	8
1.2.3 Taxonomía de la Familia Rhizobiaceae	13
1.3 <i>Lupinus</i> , La Planta	
1.3.1 Importancia de las leguminosas	15
1.3.2 Descripción	16
1.3.3 Distribución	17
1.4 Métodos de Aislamiento e Identificación de <i>Rhizobium</i>	
1.4.1 Aislamiento e identificación de <i>Rhizobium</i> en otras leguminosas	17
1.4.2 Producción de inoculantes	19
1.5 Pruebas Bioquímicas	19
1.6 Pruebas Moleculares	
1.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
1.6.2 Electroforesis	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Métodos	25
• Recolección y aislamiento	
• Pruebas bioquímicas	
• Extracción de ADN	
• PCR	
• Electroforesis	
• Preparación de inóculo	
5.2 Materiales	32

RESULTADOS	36
• Aislamiento e identificación de las bacterias por pruebas bioquímicas	
• Reacción en cadena de la polimerasa	
• Preparación del inóculo	
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	43

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno atmosférico es extremadamente inerte y a pesar de su enorme abundancia natural (80% del aire) se encuentra en una forma en la que no es directamente asimilable por plantas o animales por lo que tiene que obtenerse como componentes de otras moléculas. El nitrógeno de los nitratos es la forma de nitrógeno orgánico más accesible a las plantas, a través de una secuencia de reacciones microbianas, el nitrógeno orgánico se transforma en nitratos en un proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno, el cual es llevado a cabo por un complejo multienzimático que requiere un elevado costo energético (Tate, 1995).

La fijación biológica de nitrógeno en la actualidad tiene un gran interés agronómico, ya que en diferentes países del mundo el cultivo de leguminosas, plantas que intervienen para la fijación biológica de nitrógeno, es de importancia tradicional para la producción de alimentos vegetales. De las plantas leguminosas los campesinos aprovechan el grano y el forraje, además de que enriquecen los suelos en la rotación de cultivos. Se ha mencionado que muchas especies de *Lupinus* son invasoras de terrenos perturbados y desempeñan un papel activo en el ciclo del nitrógeno, lo que ayuda a regenerar los suelos pobres (Barrera-Necha, 1996; Grant y Long, 1989).

Actualmente se ha elevado el costo de la obtención de productos agrícolas por la gran demanda de fertilizantes sintéticos, lo que está haciendo difícil su adquisición en las cantidades requeridas, además de causar desequilibrios en la microbiota nativa del suelo. La sobreutilización de fertilizantes químicos nitrogenados, es una de las causas por las cuales se desaprovechan formas naturales y rentables de nitrógeno, teniendo como consecuencias, grandes inversiones en elementos básicos y nutritivos para los cultivos. Esto ha causado que se busquen alternativas confiables y económicas para sustentar la producción en calidad y cantidad de los productos que se consumen. En este sentido se han realizado estudios de los beneficios entre la bacteria simbiótica (*Rhizobium* y

Bradyrhizobium) y la leguminosa, así como su capacidad de fijación de nitrógeno, los cuales son conocidos desde hace mucho tiempo y se ha comprobado que se ahorran miles de toneladas de nitrógeno químico al año en los cultivos (150,000 toneladas) representando una importancia económica muy fuerte (Larcher, 1995).

El grupo de bacterias fijadoras de nitrógeno (también llamadas de forma general rizobios) es muy grande. Entre ellas se encuentra *Rhizobium*, que se tiene reportado como el género que nodula o infecta a especies de *Lupinus* (Barrera-Necha, 1996; Conich y cols., 2001; Dalton y cols., 1998; Laguere y cols., 1994; Larcher, 1995; Martínez-Romero y cols., 1998; Tate, 1995)

Para identificar esta bacteria se utiliza varios métodos. Entre los que se encuentran los métodos bioquímicos, que tienen la desventaja de no ser muy exactos, ya que muchas bacterias comparten características de reacción ante estos métodos. Por otro lado, están los métodos moleculares, que son los más utilizados actualmente, que incluyen "la Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR), DNA Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), etc. (Barrera-Necha, 1996).

Estos métodos resultan ser muy efectivos, no sólo como identificadores sino como una herramienta en la clasificación de las especies. En el caso de las bacterias estos métodos se aplican de forma general para amplificar el gen 16S ARNribosomal, ya que dicho gen está muy conservado en el reino y a la vez muestra variaciones que son típicas de especie y de familias (Sonnante y cols., 1997).

ANTECEDENTES

1.1 FIJACIÓN DEL NITRÓGENO

Dentro de los macronutrientes para las plantas, el nitrógeno es especialmente importante. En términos de cantidades de masa, es el cuarto de los bioelementos, después de carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H). El mundo orgánico encuentra su fuente principal de abastecimiento de nitrógeno en la fijación biológica del mismo. Si se suspendiera el proceso de fijación, todo el nitrógeno retenido en la biomasa regresaría a la atmósfera en 100 años. De poder fijar nitrógeno, el hombre no necesitaría ingerir proteínas (Martínez-Romero y cols., 1998).

Existe una relación estrecha entre el suministro de nitrógeno y el aumento de la biomasa. La energía y las estructuras moleculares requeridas para la incorporación de nitrógeno son derivadas del metabolismo del carbono que, al mismo tiempo, depende de compuestos que contienen nitrógeno como la clorofila. Así, uno de los principales factores limitantes del incremento en la masa de las plantas es el suministro de nitrógeno. Cuando hay insuficiente nitrógeno disponible, grandes cantidades de carbohidratos se convierten en formas almacenables o pueden ser utilizados en el metabolismo secundario. Si el déficit de nitrógeno es severo, las plantas se atrofian, las células individuales son pequeñas y sus paredes se engrosan (Larcher, 1995).

Las plantas utilizan nitrógeno inorgánico; por lo que son autotróficos con respecto al nitrógeno y al carbono. La mayoría de las plantas pueden entrar en contacto con sus requerimientos de nitrógeno desde el suelo en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+), siempre y cuando el pH en la zona de raíces sea apropiado. A un pH bajo, la toma de amonio es menos deteriorado que la de nitrato y otros cationes. Así como la absorción de todos los iones, el del nitrógeno requiere energía y es así dependiente de la respiración, lo que explica porqué las plantas que crecen en suelos fríos y poco aireados regularmente sufren de deficiencias de nitrógeno (Larcher, 1995).

El proceso de conversión de nitrógeno (N_2) en amoníaco (NH_3), es catalizado por la nitrogenasa, que puede ser inactivada rápida e irreversiblemente por el O_2 , no obstante, la fijación del nitrógeno es un proceso altamente demandante de energía, con un consumo de al menos 16 mol de ATP por cada mol de N_2 fijado. Así pues, confiar en la respiración aeróbica como proveedor de esta energía deja al organismo en riesgo de inactivar la nitrogenasa (Dalton y cols., 1998).

En leguminosas, el problema de la gran demanda de O_2 para fijar N_2 , se resuelve por tres mecanismos: una gran cantidad de proteína atrapadora de O_2 "leghemoglobina" para facilitar el flujo de O_2 a la bacteria simbiótica mientras se mantiene una concentración de O_2 extremadamente baja y no tóxica; un alto consumo de O_2 respiratorio; y por último, una barrera de difusión variable que controla la entrada de O_2 a la parte central donde está la infección de dicha bacteria (Dalton y cols., 1998).

El primer paso en la asimilación del nitrógeno es la reducción de nitrato (NO_4) a nitrito (NO_3), catalizado por la enzima nitrato reductasa (NR). Esta es una enzima compleja presente en el citosol. En especies herbáceas su gran actividad está generalmente en las hojas; en plantas leñosas en raíces o vástagos y hojas, dependiendo de las especies y hábitat. La máxima actividad de NR ocurre durante la etapa juvenil y en los órganos en crecimiento; dicha actividad es promovida por los suministros de nitrato, es estimulada por la citoquinina, y es regulada en ciertas formas por el diario cambio de luz a oscuridad (Larcher, 1995).

La enzima nitrito reductasa esta involucrada en reducir nitrito a amonio. La energía y el poder para la reducción de nitrito asimilado es proporcionada por la respiración y, en las células que contienen cloroplastos por la fotosíntesis (Larcher, 1995).

Los órganos y tejidos que están en crecimiento y guardando materiales típicamente sintetizan proteínas a una velocidad especialmente alta, mientras en hojas de edad mayor y en partes de flores es el paro de proteínas lo que predomina. En una planta bajo estrés, la síntesis de proteínas es inhibida, por lo que hay un aumento considerable en aminoácidos libres y amidas. Una característica distintiva de los disturbios en el metabolismo de proteínas es la



BIBLIOTECA CENTRAL

aceleración de las proporciones de aminoácidos, especialmente un aumento drástico en la concentración de prolina (Larcher, 1995).

El nitrato está acumulado en las células conductoras de savia de la raíz y del vástago. Los compuestos orgánicos nitrogenados traslocables se producen en alta escala durante la transición de la fase vegetativa a la reproductiva. Las plantas vasculares exhiben varios patrones de distribución de nitrógeno característicos dependiendo del sitio en el que la reducción del nitrato es más activa, de la naturaleza de los principales compuestos nitrogenados transportados y almacenados, y de la intensidad y dirección del metabolismo a diferentes tiempos. En la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*), que presentan nódulos en las raíces que contienen bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, mismo que es asimilado principalmente en la raíz, y es conducido al resto de la planta en la forma de nitrógeno orgánico (Larcher, 1995).

Los organismos que pueden hacer uso del nitrógeno atmosférico excedente inerte son conocidos como diazotróficos; estos representan el nivel más significativo de funcionamiento de autotrofia de nitrógeno. Los organismos simbióticos heterotróficos del carbono y fijadores de nitrógeno resuelven el problema del suministro de carbohidratos viviendo en las células de plantas autotróficas, o por la toma de exudados de las raíces en el plano rizoidal. Esto facilita mayor fijación de nitrógeno atmosférico que los microorganismos de vida libre. Los rizobios son aerobios obligatorios que viven como saprobios en el suelo de las regiones donde sus plantas hospederas se encuentran. La infección de plantas jóvenes y la formación de nódulos en las raíces es inducida por una cadena de signos controlada por genes bacterianos (Larcher, 1995).

La fijación de N_2 atmosférico comienza con la división reductiva de la molécula de N_2 . Esta fuerte acción endergónica es catalizada por el sistema nitrogenasa, un complejo de dos proteínas, una con hierro, y la otra que con molibdeno y hierro. La energía y los electrones necesarios para la reducción son suministrados por la respiración. La planta hospedera suministra a la bacteria amonio, protege los bacteroides de concentraciones excesivas de oxígeno por la presencia de

leghemoglobina y capas de suberina, y les asegura un ambiente húmedo constante (Larcher, 1995).

La cantidad de N_2 fijado por los simbioses depende en mucho del suministro de metabolitos fotosintetizados. Cuando la producción fotosintética de la planta hospedera es baja, la fijación de nitrógeno bacteriana disminuye, mientras que un incremento en la producción fotosintética puede triplicar la producción de nitrógeno orgánicamente ligado. La temperatura y el contenido de agua del suelo que rodea la raíz infectada, juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno. La relación temperatura-actividad de la nitrogenasa es ajustada a las temperaturas que prevalecen en el área de distribución de la planta hospedera. Aún cuando en relación con la sensibilidad al frío del sistema nitrogenasa, la fijación de nitrógeno se detiene en su menor capacidad, pero todavía a temperaturas sobre cero (Larcher, 1995).

La enzima responsable de fijar el nitrógeno, la nitrogenasa, está altamente conservada en todo este grupo diverso de bacterias. Hay dos características de este proceso reductivo que dicta el rendimiento de nitrógeno fijado en varios ambientes terrestres y las adaptaciones microbianas necesarias para proteger la enzima. Primero, la fijación de nitrógeno es un proceso que necesita mucha energía. Así, altas cantidades de dinitrógeno son fijadas solo en situaciones de alto consumo de energía. Segundo, la nitrogenasa es una enzima oxígeno-lábil. Por lo tanto, cada diazótrofo debe consumir reservas para mantener condiciones anóxicas en el ambiente de fijación activa de nitrógeno. Estas dos características del proceso de fijación de nitrógeno y el diverso grupo de bacterias capaces de catalizar la reacción combinada con el extremadamente heterogéneo ecosistema del suelo selecciona para una población indígena muy diversa de diazótrofos en cualquier ecosistema terrestre (Tate, 1995).

1.2 RHIZOBIUM

1.2.1 Descripción

De todos los seres vivos, sólo un centenar de géneros de bacterias están capacitados para fijar nitrógeno del aire, donde este elemento constituye alrededor del 70%, y convertirlo en compuestos asimilables por todos los organismos. Se estima que los rizobios llevan a cabo la fijación del 50-70% del nitrógeno reduciendo aproximadamente 20 millones de toneladas del nitrógeno atmosférico a amonio (NH_4) (Fenton, 1994). Entre las especies fijadoras de nitrógeno hay cianobacterias (por ejemplo; *Anabaena* y *Nostoc*), arqueobacterias (*Methanococcus*), bacterias grampositivas (*Frankia* y *Clostridium*), enterobacterias (*Klebsiella*) y otras proteobacterias (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* y *Acetobacter*, entre otras) (Martínez y cols., 1998). Aparentemente hay una gran diversidad de bacterias capaces de nodular leguminosas de las que se han reconocido anteriormente (Fenton, 1994).

Las bacterias del género *Rhizobium* (familia Rhizobiaceae), son un grupo de microorganismos genéticamente diversos y fisiológicamente heterogéneos, que están en una misma clasificación en virtud de su capacidad para nodular plantas del grupo Leguminosae (Dalton y cols., 1998).

La interacción simbiótica entre las plantas leguminosas y los rizobios resulta en el desarrollo de un nuevo órgano en las raíces, el nódulo, en el que los rizobios proveen nitrógeno fijado al hospedero a cambio de carbono y protección. Para establecer esta relación mutualista, la planta hospedera y los rizobios deben intercambiar continuamente señales moleculares (fig. 1). Entre ellos se encuentran los factores de nodulación, llamados factores Nod, que se consideran como la señal morfogenética primaria para la nodulación ya que desata en el hospedero el desarrollo de las primeras etapas del desarrollo del nódulo, incluyendo la deformación del pelo y divisiones celulares (Dalton y cols., 1998).

1.2.2 Relaciones simbióticas

En la naturaleza existen vegetales que aprovechan la fijación de nitrógeno realizada por bacterias que se les asocian. Ocho familias de plantas emparentadas entre sí gozan de la capacidad para asociarse en simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno. Estos grupos, alojan a las bacterias en estructuras especiales que se forman en sus raíces, llamadas nódulos (Martínez-Romero y cols., 1998).

La habilidad de las leguminosas de ser noduladas por varias especies de *Rhizobium* puede parecer que es una regla en lugar de una excepción (Laguerre y cols., 1994). En comparación con el gran número de leguminosas, sólo se han identificado unas 15 especies de *Rhizobium*, tres de *Bradirhizobium* y una de *Arzorhizobium*. Por eso se sospecha la existencia de una cifra elevada de especies de estas bacterias por describir. Los individuos de los géneros citados viven en el suelo y habitan en las zonas geográficas donde existe la planta con la que establecen simbiosis. En China, por ejemplo, hay una gran diversidad de bacterias capaces de nodular en la soya, pues ésta es originaria de Asia; mientras que en México no hay simbiosis de soya y sí una extensa variedad de *Rhizobium* simbiosis de frijol, ya que éste es nativo de la región. En un estudio de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de frijol de México y de Sudamérica realizado por Martínez-Romero y cols. (1998) los llevó a proponer dos nuevas especies de *Rhizobium*.

Rhizobium metaboliza varios carbohidratos, posiblemente con la producción de ácido. La asociación simbiótica con las leguminosas es un rasgo de clasificación distintiva del género. *Rhizobium* en el suelo es capaz de infectar las raíces susceptibles de plantas para producir nódulos en las raíces (fig.1). El proceso de formación de nódulos en las raíces de leguminosas está dividida en tres fases: a) Reconocimiento químico entre las raíces hospederas susceptibles y las células del microbio. b) Propiedades de la planta y microbio que facilitan el contacto y anclaje de células rizobiales en la raíz hospedera) y c) El proceso de invasión y desarrollo de nódulos efectivos (Larcher, 1995).

Aún cuando las densidades de población pueden ser bajas, los rizobios se encuentran en casi todos los suelos, aún en esos sitios donde las leguminosas no han crecido por décadas. Considerando la heterogeneidad del suelo, el tamaño de la célula bacteriana, y la baja proporción de suelo en el horizonte ocupado por raíces de plantas, los encuentros casuales entre células bacterianas y raíces en crecimiento debe ser considerado como un medio ineficiente de inducir nodulación. Afortunadamente, una variedad de propiedades básicas del sistema del suelo realza esta probabilidad naturalmente baja. En suelos no modificados, las células rizobiales están concentradas en los alrededores de raíces en decaimiento de épocas de crecimiento previas (Larcher, 1995).

Un aumento posterior en la frecuencia de nodulación puede resultar por el movimiento o migración de bacterias infectivas que puede ocurrir en el perfil del suelo. Esta migración de células rizobiales es pasivo principalmente; esto es, que puede no involucrar movilidad directa de las células. Las bacterias preferiblemente son acarreadas por el agua que fluye por los macro poros del suelo, que son pasajes largos en la matriz del suelo que permite el movimiento facilitado de agua y aire. Estos poros incluyen los espacios entre agregados de suelo así como los canales creados por el crecimiento de raíces y el movimiento de animales (lombrices de tierra, etc.) (Larcher, 1995).

Se ha encontrado que los componentes exudados atraen varias líneas de *Rhizobium*, estos componentes incluyen azúcares, aminoácidos, proteínas, ácidos dicarboxílicos y flavonoides (fig.1). La atracción a los componentes generales de exudados de raíces no es específica a los rizobios, pero una gran variedad de bacterias de la rizosfera son atraídas a la raíz (Larcher, 1995).

La reacción a los componentes exudados permite a las líneas de rizobios alcanzar la porción específica de la estructura de la raíz más susceptible a la infección de *Rhizobium* (la porción detrás del meristemo apical en el sitio de emergencia de un pelo absorbente) donde el reconocimiento de anclaje tiene lugar. El reconocimiento de un tejido hospedero susceptible involucra una interacción entre proteínas en la superficie de la raíz de la planta y

exopolisacáridos rizobiales (Martínez-Romero y cols., 1998; Fang y Hirsch, 1998).

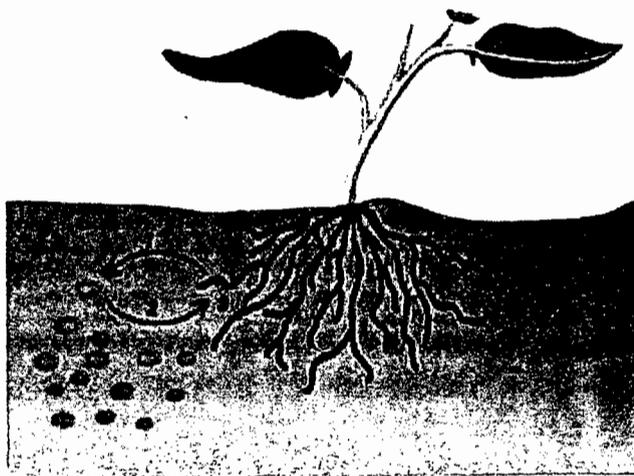
Una vez que la célula rizobial se ha anclado a la raíz de la leguminosa, se forma un "hilo" de infección sobre el pelo de la raíz. El desarrollo de esta estructura es precedida por la deformación del pelo de la raíz, que es inducida por exopolisacáridos formados por la célula rizobial. La invaginación de la pared el pelo, formando el hilo de infección en la celulosa permite a la célula bacteriana invadir las porciones centrales de lo que será el nódulo. La célula rizobial invasiva pasa a través del hilo de infección y hacia las células de las raíces adyacentes al pelo de la raíz. Estas células de la raíz subsecuentemente se infectan con las células rizobiales que están invadiendo. Sólo las células tetraploides son infectadas y se transforman en el nódulo primordial. Solo una pequeña porción de los pelos de las raíces invadidos se transforman en nódulos. La división de células infectadas resulta de la formación del nódulo. Las bacterias se multiplican dentro de las células tetraploides formando células de formas variables y ramificadas conocidas como bacteroides, que se separan en paquetes dentro del nódulo por una membrana peribacteroidea. Hay típicamente de cuatro a seis bacterias por paquete. La fijación de nitrógeno dentro del nódulo de la raíz ocurre solo después de la formación de bacteroides. El ciclo de nodulación puede decirse que se completa con la muerte y deterioro del nódulo y la liberación de los bacteroides y bacterias contenidas hacia el suelo (Larcher, 1995).

En algunos casos se ha encontrado que bajo exposición a los factores de nodulación (Nod) secretados por *Rhizobium etli*, en las células de los pelos de las raíces, los filamentos de actina del citoesqueleto se fragmentan y se mueven hacia la región apical de la célula. Con esto se concluyó que los factores Nod alteran la organización de los microfilamentos en las células de los pelos de la raíz y esto puede ser un preludio para la formación de hilos de infección (Cardenas y cols. 1998).

También, en el estudio realizado por Volpin y Phillips (1998) encontraron que las moléculas producidas por *Rhizobium meliloti* aumentan la respiración de las raíces de alfalfa. El dióxido de carbono (CO₂) que liberan las raíces puede ayudar

a *Rhizobium* y *Bradirhizobium* a colonizar raíces ya que requieren CO₂ exógeno para su crecimiento.

Por otro lado, también se ha encontrado que hay interacción entre los factores Nod y células de los pelos de las raíces que alteran el crecimiento normal de dichas células, causando distorsiones, ramificaciones y encurvamiento de las células y es el momento en el que los rizobios pueden invadir las células (Ridge, 1996).



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

Figura 1. La interacción leguminosa-*Rhizobium* se inicia con un intercambio de señales químicas entre plantas y bacterias. Los compuestos (1) que excretan las plantas por sus raíces los reconoce el *Rhizobium* correspondiente; en respuesta, los bacteroides producen (2) factores Nod que estimulan en la planta el desarrollo de los nódulos (3), en los que albergan las bacterias que fijan nitrógeno. (Tomado de Martínez-Romero y cols., 1998).

1.2.3 Taxonomía de la Familia Rhizobiaceae

En general, esta familia se clasifica en dos grupos de acuerdo con sus características de crecimiento. En un grupo encontramos a las bacterias con crecimiento rápido y productoras de ácidos que desarrollan una gran turbidez en el medio líquido durante 2 a 3 días. Las células tienen forma circular a pleomórfica con un diámetro de 1.2 a 3 μm de largo y son móviles debido a los flagelos peritricos. Pueden crecer en un rango muy amplio de carbohidratos, pero normalmente crecen mejor en glucosa, manitol o sucrosa. Su clasificación esta basada en la afinidad con el hospedero (Jordan, 1984).

En el segundo grupo tenemos a las bacterias con un crecimiento lento y productoras de álcalis (*Bradyrhizobium*). Estas necesitan de 3 a 5 días para producir una turbidez moderada en medio líquido. La mayoría de estas bacterias crecen mejor utilizando las pentosas como fuente de carbono. Tienen un tiempo de reproducción de 6-7 horas. Las células tienen una forma predominante redonda y tienen el mismo tamaño que el primer grupo (Ferrera-Cerrato y cols., 1993).

En la actualidad las relaciones filogenéticas pueden determinarse de manera mucho más fácil y con mucho más detalle y profundidad. En consecuencia los microbiólogos han inundado con información de secuencias las revistas científicas y los análisis y conclusiones filogenéticas tienden a incrementarse. Por otra parte la perspectiva filogenética y el descubrimiento de las arqueobacterias permite que las bacterias no se definan en términos de su morfología y bioquímica sino que la relación con otras bacterias es la definición central (Barrera-Necha, 1996).

Los marcadores moleculares y bioquímicos se utilizan ampliamente como herramienta para evaluar la validez de la clasificación taxonómica en muchos organismos (Menkir y cols., 1997). Se ha demostrado que es preferible identificar especies de *Rhizobium* utilizando el gen 16S de ARNr (Fenton, 1994). Con pocas excepciones los genes de ARNr son similares en longitud en el reino bacteriano, y contiene regiones altamente conservadas, así como regiones que varía de acuerdo a especies y familias (Zhang y cols., 2001).

Las especies del género *Rhizobium* tienen una gran variación fenotípica, las técnicas de identificación bioquímica e inmunológica son muy lentas y en ocasiones variables, además de su baja confiabilidad. Los métodos que utilizan el análisis genómico son más rápidos y comúnmente más confiables que aquellos basados en las características fenotípicas. Entre estos se han utilizado la amplificación de una región del gen 16S ARNr, el cual es una herramienta diagnóstica muy confiable para la identificación de bacterias. La estructura primaria del ARNr incluye secuencias variables y secuencias conservadas características de diferentes grupos taxonómicos, confiables e incluso hasta nivel de bacterias especie-específica (Aguilar y cols. 2001; Chen y cols., 2000; Corich y cols., 2001; Gao y cols., 2001; Khbaya y cols., 1998; Laguere y cols., 1994; Menkir y cols., 1997; Volpin y Phillips, 1998; Wang y Martínez-Romero, 1998; Zhang y cols., 2001).

1.3 LUPINUS, LA PLANTA

1.3.1 Importancia de las leguminosas.

Las leguminosas se cultivan en todo el mundo, desde los trópicos hasta las zonas templadas y áridas, aportando un 20% del total de proteínas mundialmente. Algunas leguminosas presentan la ventaja de contener aceite comestible en grandes cantidades así como niveles de proteína de buena calidad; además de su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico mejorando con esto la fertilidad de los suelos (Hassett y Banwart, 1992). Las especies del género *Lupinus* (lupinos) reúnen estas características, además de que sus semillas han sido consideradas como una buena fuente proteica para humanos y animales. Debido a esto actualmente se ha domesticado y cultivado ampliamente las siguientes especies: *L. albus* (lupino blanco), *L. angustifolius* (lupino azul), *L. luteus* (lupino amarillo) y *L. mutabilis* (tarwi) (Barrera-Necha, 1996). La especie de *Lupinus nootkatensis* se ha utilizado para controlar la erosión y para regenerar suelos erosionados en Islandia. Para esto se utilizaron cepas de *Rhizobium* con el fin de inocular las plantas utilizadas (Einarsson y cols., 1993).

En nuestro país las especies del género *Lupinus* crecen de forma silvestre en diversos estados y al igual que la mayoría de las leguminosas forman nódulos en sus raíces, donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno por la asociación simbiótica que surge entre estas plantas y las bacterias del género *Rhizobium*, donde ambas se ven beneficiadas (Barrera-Necha, 1996).

A pesar de estas cualidades, actualmente en nuestro país se han realizado pocos estudios de esta relación y su importancia agrícola, sin embargo en algunos países de Europa, América y en Australia, aún cuando tienen especies nativas, otras especies de este género han sido introducidas y son utilizadas como cultivos en rotación alternando con otros cultivos. Los lupinos ayudan al mejoramiento del suelo, sin producir daños, como en el caso de los fertilizantes químicos, y además incrementa la microbiota del suelo. Debido a su diversidad biológica, ecológica y geográfica, la región occidente de nuestro país es una de las zonas con mayor número de especies de *Lupinus* silvestres, entre 15 a 20, ya que existen algunas de difícil clasificación por su complejidad

morfológica (Aguilar y cols., 2001; Barrera-Necha, 1996; Corich y cols., 2001; Long, 1989; Mc Vaught, 1987).

En Jalisco se encuentra a *L. stipulatus*, *L. montanus*, *L. simulans*, *L. leptocarpus* y *L. rotundiflorus* en localidades específicas y en ocasiones son escasas. Adicionalmente se observan variaciones en el comportamiento fenológico de estas especies; la mayoría fructifica en invierno, algunas en verano y muy pocas durante el otoño (Barrera-Necha, 1996).

1.3.2 Descripción

El *Lupinus* es una planta herbácea o arbustiva, anual o perenne; tallos solitarios, cespitosos o abundantemente ramificados, de 3 cm a 5 m de alto; hojas alternas, estipuladas, palmadamente compuestas y raramente simples, con 4 a 17 folios; estipulas adnadas a la base del peciolo; flores en racimos terminales pedunculados que normalmente sobresalen del follaje, racimos desde 3 a 5 cm hasta 5 cm o más largos; brácteas del racimo caducas o persistentes, de largo variable, flores con pedicelos de 2 a 12 mm de largo; cálices fuertemente bilabiados, los labios enteros o dentados y entonces el superior bifido y el inferior tridentado; corolas zigomorfas, generalmente azules o azul-moradas con una mancha blanca a amarilla en el centro del estandarte por encima del ángulo producido por su mitad exterior que es refleja, ocasionalmente las flores son rosadas, rojas, blancas o amarillas; corolas glabras, excepto en la quilla, quillas glabras o ciliadas a lo largo de los bordes superiores, falcadas o bien el margen superior casi recto, ángulo del margen inferior de 80 a 120°; estambres 10 todos conados, monadelfos, anteras dimórficas, alternando las más largas con las más cortas; estigma generalmente barbado; estilo glabro; ovario sésil; legumbre dehiscente a lo largo de ambas suturas, valvas coriáceas, comprimida lateralmente, con diversos tipos de pubescencia, a menudo torulosa entre las semillas; óvulos 4 a 12, semillas de tamaño y color variable, generalmente semejan el color del suelo del área en que viven las plantas (Rzedowski y Rzedowski, 1979; McVaugh, 1987).

1.3.3 Distribución

Este género constituye uno de los grupos más complejos de plantas, habiendo entre 200 y 400 especies en América (McVaugh, 1987; Dussman-Loock, 1992). La mayoría habita en Norte y Sudamérica; algunas especies de semilla larga habitan la región mediterránea, otras habitan en tierras altas tropicales de África (McVaugh, 1987; Rzedowzki y Rzedowski, 1979). Este grupo de plantas es muy activo y dinámico, con especies que ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta la tundra alpina. Las especies comúnmente son invasoras de terrenos perturbados y desempeñan un papel activo en el ciclo del nitrógeno. También contienen altas cantidades de alcaloides amargos y por consiguiente no son atractivas para la mayoría de los animales. Han sido utilizadas en la medicina y las semillas tostadas se emplean como sustituto del café (Rzedowski y Rzedowski, 1974).

1.4 MÉTODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *RHIZOBIUM*

Las cepas de *Rhizobium* se obtienen de los nódulos de las leguminosas. Al seleccionar los nódulos para aislar la cepa es necesario tomar en cuenta que los nódulos sean grandes, de color rosado, superficie rugosa y con estrías claras o blancas más acentuadas. La coloración interna roja producida por la leghemoglobina, indica que hay actividad de la nitrogenasa, y en consecuencia fijación biológica de nitrógeno (Ferrera y cols., 1993).

1.4.1 Aislamiento e identificación de *Rhizobium* en otras leguminosas

La asociación planta-*Rhizobium* implica fenómenos bioquímicos y de reconocimiento altamente específicos, junto con una expresión génica y una diferenciación celular coordinada de ambos simbioses (Barrera-Necha, 1996).

Por lo que es importante investigar la diversidad genética y la efectividad simbiótica de poblaciones indígenas de rizobios, para comprender mejor la respuesta de inoculación (Chen y cols., 2000).

Se conocen rizobios que nodulan otras especies de leguminosas y en otros países. Por ejemplo, se encontraron rizobios del género *Bradyrhizobium* que nodulan leguminosas silvestres en el Mediterráneo y encontraron variabilidad entre ellos en el gen 16S ARNr (Quatrini y cols., 2002) En Argentina, Aguilar y cols. (2001), analizaron nódulos de *Phaseolus vulgaris* y compararon también el gen 16S ARNr, y descubrieron que la especie *R. etli* es predominante en sus muestras, aunque se encontró gran diversidad dentro de la especie. Por su parte, Gao y cols. (2001), realizaron un estudio en China en el que amplificaron los genes 16S y 23S de ADNr y encontraron que los géneros *Agrobacterium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, nodulan al *Astragalus adsurens*.

En la variante *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae*, se han hecho numerosos estudios dada su gran distribución tanto geográfica como de hospedero. En Alemania, Zhang y cols. (2001), encontraron esa cepa nodulando a especies como *Vicia hirsuta* y *Pisum sativum*, extraídas de suelos que habían sido restaurados con alfalfa; las cepas fueron tipificadas utilizando los genes 16S y 23S de ADNr. Por otro lado en Italia, también se encontró gran permanencia de esta cepa del género *Rhizobium* nodulando plantas de chícharo (Corich y cols., 2001).

En Paraguay, Chen y cols. (2000), encontraron especies de *Rhizobium* en soya y los tipificaron por medio del gen 16S de ARNr. Por su parte, Khbaya y su equipo, aislaron 10 cepas de *Rhizobium* de cuatro especies de *Acacia* en diferentes lugares de Marruecos, utilizando el mismo gen (Khbaya y cols., 1998).

En México, específicamente en Cuernavaca se aislaron cepas de los géneros de *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* de *Sesbania herbacea* y de suelos inundados; y se identificaron por medio del gen 16S de ARNr. Estos aislados se obtuvieron de suelos drenados de Cuernavaca, Morelos (Wang y Martínez-Romero, 2000).

Varios autores reportaron que en plantas consideradas infectadas por cepas de crecimiento lento, encontraron que estaban infectadas por bacterias de

crecimiento rápido; como en la soya (*Glicine max.*) (Scholla y Elkan, 1984, Keyser y cols., 1982; Broughton y cols., 1984), loto (*Louts peduncularus*) (Cooper, 1982), lupino (*Lupinus densiflorus*) (Jordan, 1984).

Así mismo, Schilnkert-Miller y Pepper (1988), encontraron que *Lupinus* de Baja California eran infectadas por cepas bacterianas de crecimiento rápido, aunque su estudio fue fisiológico y bioquímico exclusivamente.

1.4.2 Producción de Inoculantes

La producción de inoculantes para leguminosas es un proceso establecido en diferentes partes del mundo. Debido a su aplicación en el campo, conduce a una asociación simbiótica que tiene la capacidad de sustituir de manera parcial la fertilización nitrogenada y aumentar la producción de algunos cultivos de leguminosas. La calidad de un inoculante se refleja en dos características, una cuantitativa, que consiste en el número de *Rhizobium* adecuado que debe de tener el inoculante y la otra cualitativa, que es el tipo de cepa que contiene este inoculante, y que debe de tener una fijación del nitrógeno eficaz, además de otros atributos ecológicos como son la competencia y sobrevivencia en el suelo (Ferrera-Cerrato y cols., 1993).

1.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Los microorganismos presentan diferentes actividades fisiológicas, que han permitido a los investigadores su clasificación. Para lo cual se han desarrollado esquemas de clasificación que se basan en la actividad fisiológica que una cepa de bacterias tiene en ciertos tipos de medios. En general, las características elegidas para un esquema de identificación deberían ser fáciles de determinar. Aunque estos esquemas de identificación son confiables ya que se han desarrollado con especies de bacterias ya identificadas, las pruebas que se utilizan para cada tipo de bacterias pueden variar en su resultado dependiendo del tamaño del inóculo, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, etc.

Aunque estas pruebas son muy efectivas pueden llegar a aportar falsos positivos o falsos negativos por los factores ya descritos (Kendrew, 1994).

Aunque la única prueba concluyente para identificar a *Rhizobium* es que forma nódulos en su hospedero correspondiente, el conocimiento microbiológico y bioquímico de las especies de éste género nos permite reconocerlas y agruparlas con base en su actividad y comportamiento en los diferentes medios de cultivo (Ferrera-Cerrato y cols., 1993).

Las pruebas que se aplican a *Rhizobium* son observar la morfología macroscópica, así como la prueba con tinción de Gram. Su velocidad de crecimiento, es decir, si crece dentro de tres a cuatro días o de siete o más. Si producen ácido o álcali en medio extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT), crecimiento en leche tornasolada, su motilidad en medio MIO y su reactividad con reactivos Byla y Benedict (Ferrera-Cerrato y cols., 1993). Los resultados esperados de estas pruebas están descritos en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características bioquímicas y morfológicas de las cepas del género *Rhizobium*

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO
Tinción de Gram	Negativo
Crecimiento	Rápido
Producción de ácido o álcali	Viraje amarillo (acidez)
Leche Tornasolada	Sin crecimiento y producción superficial de suero
Motilidad	Positiva
Reactivos de Byla y Benedict	Negativo

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

1.6 PRUEBAS MOLECULARES

1.6.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se superaron limitaciones que existían con técnicas desarrolladas y ampliamente utilizadas anteriormente, como lo son las técnicas de Southern y Northern. Dichas limitaciones tenían que ver con la cantidad de la muestra biológica, sensibilidad, tiempo requerido, principalmente (Alberts y cols., 1994; Griffiths y cols., 1993)

Esta técnica es un proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADNpolimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (Alberts y cols., 1994; Griffiths y cols., 1993; Barrera-Saldaña y cols., 1993; Mullis, 1990).

En general, los componentes requeridos para un PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación; mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa (Alberts y cols., 1994; Griffiths y cols., 1993; Barrera-Saldaña y cols., 1993; Mullis, 1990).

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son (Alberts y cols., 1994; Griffiths y cols., 1993; Barrera-Saldaña y cols., 1993; Mullis, 1990; Mullis, y Faloona, 1987):

- a) Desnaturalización (92 – 98°C, 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.
- b) Alineamiento (50-60°C, 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
- c) Extensión (70-74°C, 30-90 segundos), en el que la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los

desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

Esta técnica se utiliza en muchos laboratorios y tiene múltiples aplicaciones en diferentes campos como lo son el diagnóstico clínico, en el campo de la oncología, en la microbiología, en la medicina legal, en el proyecto de genoma humano, en la arqueología, en la construcción de árboles evolutivos, en biología molecular, la ingeniería genética, la biotecnología, etc. (Alberts y cols., 1994; Griffiths y cols., 1993; Barrera-Saldaña y cols., 1993; Mullis, 1990).

1.6.2 ELECTROFORESIS

Esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de ADN poseen a pH alcalino habitualmente una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad hacia el cátodo (+) solo venga determinada por el tamaño de la molécula (número de pares de bases, si es lineal) (Kendrew, 1994; Luque y Herráez, 2001).

Actualmente la electroforesis en gel es la técnica más ampliamente utilizada para detectar polimorfismos en DNA, ya que estos polimorfismos varían en al menos 10 pares de bases que pueden ser detectados por esta técnica (McClean, 2000).

La electroforesis se utiliza en casi cada estudio que utilice la técnica de PCR como herramienta, ya que los fragmentos amplificados se pueden observar fácilmente con alguna variante de esta técnica (Aguilar y cols, 2001; Barrera-Necha, 1996; Chen y cols, 2000; Corich y cols, 2001; Dickinson y cols, 1995; Fang y Hirsch, 1998; Gao y cols, 2001; Khbaya y cols, 1998; Laguerre y cols, 1994; Menkir y cols, 1997; Quatrini y cols, 2002; Sonnante y cols, 1997)

2 JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia de la fijación del nitrógeno en los suelos y en el metabolismo de las plantas, en particular las leguminosas, el género *Rhizobium* es uno de los más importantes dentro de los géneros que se conocen como simbioses fijadores de nitrógeno. Su relación con las leguminosas provoca en ellas una deformación en las raíces y la formación de nódulos. Como se conocen un gran número de especies de *Rhizobium*, este trabajo pretende identificar si las cepas recuperadas son de la misma especie haciendo uso de pruebas bioquímicas ampliamente utilizadas y de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

3 HIPOTESIS:

La amplificación del gen ribosomal 16S por PCR permitirá la identificación del género *Rhizobium* de *Lupinus* del estado de Jalisco.

4 OBJETIVOS:

Objetivo General:

Identificación bioquímica y molecular de cepas de *Rhizobium* aisladas a partir de *Lupinus montanus*, *Lupinus stipulatus*, *Lupinus reflexus* y *Lupinus rotundiflorus* silvestres.

Objetivos Específicos:

- Aislar las cepas de *Rhizobium* de *Lupinus* silvestres.
- Identificar por pruebas bioquímicas las cepas de *Rhizobium*.
- Identificar las cepas de *Rhizobium* por amplificación del gen ribosomal 16S mediante la técnica de PCR.
- Comparar los resultados obtenidos con las técnicas aplicadas.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MÉTODOS

5.1.1 RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO

Para este estudio se realizaron varias salidas a las siguientes localidades: Norte de Jalisco (Mezquitic, Los Amoles, Sierra de Bolaños y Monte Escobedo, así como la Sierra de San Juan Capistrano) Sur de Jalisco (Cercanías de Ciudad Guzman (Zapotlán el grande), las faldas del Volcán de Colima y diferentes zonas del mismo. También se realizaron muestreos en el municipio de Tapalpa y bosques cercanos a este municipio, en donde crecía la planta.

Las especies de *Lupinus* que se encontraron son las siguientes de Lupinos: *L. montanus*, *L. stipulatus*, *L. reflexus* y *L. rotundiflorus*. Las especies fueron identificadas siguiendo la guía de Rzedowski y Rzedowski (1979).

Cuidadosamente se excavaban las raíces de la leguminosa y se colocaron en bolsas de polietileno para transportarlas al Laboratorio de Microbiología del CUCBA. Al final de los muestreos se obtuvieron 34 muestras de nódulos viables. Todas las especies de *Lupinus* antes mencionadas estaban representadas en estos nódulos seleccionados.

Los nódulos seleccionados eran grandes, de color rosado con superficie rugosa. Enseguida se realizó la limpieza de los nódulos, eliminando la tierra y los contaminantes, se seleccionaron los mejores nódulos, los cuales se sumergían en etanol al 95% 10 segundos y en agua estéril 10 segundos para finalmente darles un tratamiento con $HgCl_2$ acidulado durante uno a tres minutos y enjuagarlos con agua destilada estéril. Posteriormente se hizo un corte transversal para extraer el jugo lechoso del interior sobre cajas de Petri con agar extracto de levadura-manitol rojo congo (ELMARC).

Se metieron a incubar a 25°C durante 4-10 días, observando cada 48 horas su crecimiento para diferenciar las de crecimiento lento (crecimiento franco entre 3 y 4 días) y las de rápido (crecimiento franco entre 4 y 6 días).

Una vez observado el crecimiento se anotaba su morfología macroscópica. En caso de contaminación se escogían colonias sencillas y se realizaba una resiembra (Ferrera-Cerrato, 1993).

Fueron seleccionadas dos cepas de los aislamientos realizados, con base en sus características bioquímicas, de nodulación, morfológicas así como de crecimiento. Se inoculó una asada de un cultivo joven de crecimiento rápido de *Rhizobium* en medio líquido de ELMARC, enseguida se incubaron a 26°C por un periodo de 3 a 5 días. Enseguida se cuantificó la cantidad de células midiendo la turbidez mediante el Método de McFarland, midiendo enseguida el pH, cuando obtuvimos la cantidad de 10^9 bacterias por mililitro (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

5.1.2.1 Tinción de Gram

Se colocó en el portaobjetos una gota de agua estéril. Se tomó una colonia con el asa y se mezcló en el agua. Se dejó secar la preparación y fijó a la llama del mechero sin que se haya efectuado un calentamiento excesivo. Se cubrió el área del frotis con cristal violeta por un minuto. Se lavó con agua destilada y se escurrió. Se cubrió con lugol por un minuto. Se lavó con agua destilada y se escurrió. Se cubrió con alcohol etílico por 30 segundos. Se lavó con agua destilada y se escurrió. Se cubrió con safranina durante cinco minutos. Se lavó con agua destilada y se dejó secar. Se observó al microscopio bajo objetivo de inmersión (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2.2 Velocidad de crecimiento.

Las cepas aisladas se sembraron por el método de estría en el medio ELMARC las cepas aisladas. Se incubaron a 25° C durante 10 días observando cada 48 horas. Se anotó el tiempo en que se presentó un crecimiento franco considerando de crecimiento rápido aquellas rizobias que crecen en tres o cuatro días, y de crecimiento lento a las que crecen entre siete o más días (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2.3 Producción de ácido o álcali.

Se sembraron las cepas recuperadas en forma de "S" en el medio extracto de levadura manitol agar azul de bromotimol (ELMABT). Se incubaron de tres a siete días y se observó el viraje de color de este medio considerando los cambios de colores de la siguiente forma; si no registra cambio en el medio se considera neutro, si hay cambio a color azul indica alcalinidad y un viraje a amarillo indica acidez (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2.4 Prueba de Leche Tornasolada

Se inocula una colonia en el medio, se incubaron a 28°C por 15 días haciendo observaciones periódicas sin agitar. Se observaron los cambios ocurridos en el medio tomando en cuenta las siguientes consideraciones; si no se registra cambio la cepa inoculada pertenece al género *Rhizobium*, si se da un crecimiento pobre o no hay crecimiento con un ligero cambio de pH, producción superficial de suero se considera una cepa pura de *Rhizobium*; si se reconoce un cambio de color a pardo con cambio de pH, formación de coágulos y disolución del medio no se considera una cepa de *Rhizobium*.

Se realizó esta prueba para constatar la pureza de la cepa *Rhizobium*, así como para observar que no hubiese cambio en el pH de esta prueba bioquímica (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2.5 Prueba medio MIO

Esta se basa en la movilidad de las bacterias, se realiza una inoculación en forma de punta casi hasta el fondo del agar. Después de la incubación, se observa si hubo turbidez en el medio que indica que las bacterias son móviles; por el contrario, si únicamente crecen alrededor de la punción es indicador de movilidad negativa (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.2.6 Reactivos de BYLA y Benedict

Estas pruebas se realizaron a cada una de las cepas para descartar que tuviéramos aislamientos de *Agrobacterium*, ya que en ocasiones se pueden confundir con aislamientos de *Rhizobium*. Se sembraron las cepas aisladas hasta la fase estacionaria en el medio BYLA. Se añadió 0.1ml de reactivo de Benedict y se esperó de 15 a 60 minutos para obtener coloración (Ferrera-Cerrato, 1993).

5.1.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Para este experimento se utilizaron 28 cepas de *Rhizobium spp.* aisladas de las cuatro especies silvestres de *Lupinus* antes mencionados.

1. Preparación de la muestra para la extracción del ADN. Las bacterias fueron inoculadas en el medio de ELMARC a 26°C durante tres a cuatro días.
2. Extracción de ADN. Se utilizaron dos procedimientos.
 - 2.a. El primero fue con la preparación de una solución amortiguadora de lisis de las células utilizando 2.5 ml para una o dos colonias del microorganismo (0.12 M $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ pH 8.0, 1% de duodecil sulfato de sodio p/v (SDS) con 0.1 mg de proteinasa K por ml). Se colocaron en baño María durante una hora a 45°C con agitación, enseguida se realizó la extracción del ADN con una solución de fenol-cloroformo 24:24.
 - 2.b. El otro procedimiento que también dio buen resultado, se realizó la extracción del ADN con el reactivo DNAzol-Plant ultrapuro, de Life Technologies™. Una vez resuspendido el ADN se cuantificó midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro Perkin Elmer a 260 y 280 nm (Ausubel, 1987).

Método de Plant DNAzol

Este método está dividido en cuatro fases:

1.-Extracción

Se colocaron 0.3 ml de Plant DNAzol más 0.1g de muestra, se mezcló por inversión suave varias veces. Se incubó a 25° C con agitación por 5 min. Se agregaron 0.3 ml de cloroformo y se mezcló vigorosamente. Se incubó a 25° C con agitación. Se centrifugó a 12,000rpm por 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

2.-Precipitación

Se mezcló la fase acuosa con 0.225 ml de etanol al 100%. Se mezclaron las muestras por inversión de 6 a 8 veces y se mantuvieron a temperatura ambiente por 5 minutos. El ADN se precipitó a 5,000 rpm por 4 min. Se eliminó el sobrenadante.

3.-Lavado

Se mezcló 1 volumen de Plant DNAzol y 0.75 volúmenes de etanol 100%. Se mezcló 0.3 ml de la solución etanol-Plant DNAzol con el precipitado de ADN con vortex.

Se dejaron reposar las muestras por 5 min y luego se centrifugaron a 5,000 rpm por 4 min. Se eliminó la solución y se lavó la pastilla de ADN mezclando vigorosamente con 0.3 ml de etanol al 70% seguida de centrifugación a 5,000g por 4 min.

4.-Solubilización

Se removió el etanol por decantación. Se mantuvieron los tubos verticales por 1 a 2 min. y se removió el etanol en exceso con una micropipeta. Se dejó secar al aire la pastilla.

Para ambos procedimientos la pastilla de ADN se guardó en etanol al 95% a 4°C.

5.1.4 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada para amplificar una región conservada del gen 16S ARNr de *Rhizobium*. Los iniciadores o cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 308 pb fueron el Y1 que corresponden a las posiciones 20 a 43 del gen 16S ARNr de *Escherichia coli*, y Y2 que corresponden a las posiciones 361-338 también de *E. coli*. La secuencia de ambos iniciadores se muestra a continuación en la cuadro 2 (Barrera-Necha, 1996).

Cuadro 1. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar el gen 16S ARNr de *Rhizobium*

Nombre	Secuencia	Número de b
Primer Y1	5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'	(24b)
Primer Y2	5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	(24b)

El PCR fue realizado en un volumen de 50 μ l conteniendo de 0.5 a 1 μ l de ADN con una concentración de 50 ng/ml en densidad óptica, 1.5 μ M de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 20 mM de cada uno de los desoxirribonucleotidos trifosfatos, 1.25 U de Taq DNA polimerasa, 0.5 μ M de cada uno de los iniciadores.

El PCR fue realizado con una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos que constan de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 65°C, 2.5 minutos a 72°C y una extensión final de 7 minutos a 72°C.

5.1.5 ELECTROFORESIS

Posteriormente al PCR se tomó una alicuola de 5 μ l para poder observar los productos de amplificación, esto se hizo en la siguiente forma.

Se preparó un gel de agarosa al 1.2% en TBE 0.5X. Se prepararon las muestras para cargar 6 μ l por pozo (5 μ l del amplificado y 1 μ l de Buffer de carga). Colocando en el primer carril el marcador de peso molecular que tenía pesos desde 100 hasta 1000 pb de la marca BioRad™ el cual sirvió de referencia para visualizar los productos de amplificación de 308 pb. Así mismo, se dejó el carril 5 de testigo con

agua destilada. Se cerró la cámara y se conectó a la fuente de poder a 80 V. Se dejó correr por espacio de una hora verificando que el corrimiento de las muestras fuera correcto.

Posteriormente, se realizó una tinción del gel en una solución de Bromuro de etidio conteniendo 1gr/ml por 30 min. para su posterior observación y análisis en un transiluminador de luz ultravioleta marca Perkin Elmer.

5.1.6 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

De acuerdo a sus características de nodulación, crecimiento y morfología, fueron seleccionadas al azar 2 cepas de *Rhizobium* y se sembraron en un medio ELMARC con agitación en baño María. Teniendo al final de la incubación una concentración de 10^9 microorganismos por mililitro. Después de esta preparación fue inoculada a 60 semillas de *Lupinus* de las mismas especies que se aislaron las cepas de bacterias. Dichas semillas fueron cultivadas en tierra estéril con el inóculo. Se esperó hasta el crecimiento de las plantas antes de su floración. Se extrajeron las plantas para comprobar que dichas cepas habían logrado una infección observando los nódulos y partiéndolos a la mitad para ver el característico color rojo de la leghemoglobina. De esta forma se comprobó que dichas cepas eran efectivas infectando a las plantas.

5.2 MATERIALES

5.2.1 Para aislamiento de nódulos

Gasa
Caja de petri
Solución al 0.1% de bicloruro de mercurio
Agua esterilizada
Espátula
Caja de petri con agar
Agua destilada 4000 ml.
Bicloruro de mercurio 4g
Ácido clorhídrico 20 ml.

5.2.2 Medios para pruebas bioquímicas

a) Medio ELMARC

K ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
Extracto de levadura	1.5 g
NaCl	0.18 g
Manitol (Dextrosa)	9 g
Agar	15 g
Rojo Congo 1:400	10 ml
Agua destilada	1000 ml
Rojo Congo:	
Rojo Congo	1 g
Agua destilada	400 ml

b) Medio ELMABT

K ₂ HPO ₄	1g
NaCl	0.2 g
Extracto de Levadura	1.5 g
MgSO ₄	0.18 g
Manitol (Dextrosa)	9 g
Azul de bromotimol	5 ml
Agua destilada	1000 ml
Azul de Bromotimol:	
Azul de Bromotimol	0.5 g

Etanol	50 ml
Agua destilada	50 ml

c) Medio de Leche Tornasolada

Leche deshidratada	10 g
Polvo de tornasol	0.075 g
Agua destilada	100 ml

d) Medio MIO

Agar Medio MIO	3.1 g
Agua destilada	100 ml

e) Reactivo de Ehrlich

Paradimetilamino benzaldehido	2 g
Alcohol Etilico Absoluto	1 ml
Ácido clorhídrico concentrado	40 ml

f) Tinción de Gram

1. Solución de Cristal Violeta

Cristal Violeta	10 g
Oxalato de amonio	4 g
Alcohol absoluto	100 ml
Agua destilada	400 ml

2. Solución de Lugol

Yodo	1 g
Yoduro de Potasio	2 g
Alcohol absoluto	25 ml
Agua destilada	100 ml

3. Solución de Safranina

Safranina	2.5 g
Etanol	10 ml
Agua destilada	90 ml

g) Medio BYLA

K ₂ PO ₄	0.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂	0.2 g
FeCl ₃ 6H ₂ O	0.005 g
Extracto de Levadura	3 g
Lactosa	10 g

h) Reactivo de Benedict

Mezclar las soluciones A y B y completar a 100 ml de agua.

Solución A:

Citrato de Sodio	17.3 g
Carbonato de Sodio	10 g
Agua destilada	60 ml

Solución B:

Sulfato de cobre	1.73 g
Agua destilada	10 ml

5.2.3 Reactivos para Electroforesis

a) T.B.E. 5X

Tris	54 g
Acido Bórico	27.5 g
EDTA	20 ml, 0.5 M pH 8
Agua desionizada	900 ml

b) T.B.E. 0.5X

T.B.E. 5X	100 ml
Agua desionizada	900 ml

c) Agarosa al 1.2% en T.B.E. 0.5X

Agarosa	1.2 g
T.B.E. 0.5X	100 ml

d) Buffer de carga

Glicerol	15 l
Azul de Bromofenol	0.001 g
Xylene Glicol	500 l

e) Bromuro de etidio para teñir

Bromuro de etidio (10mg/ml)	1 gr
Agua destilada	100 ml

f) Buffer de lisis (100 ml)

100mM Tris HCl pH 8.5	1.211 g
5mM EDTA	0.186126 g

0.2% SDS	0.0052 g
200mM NaCl	1.169 g
200 g/ml Proteinaza K	0.2 g

g) TE 50:20

Tris 1M pH8	2.5 ml
EDTA 0.25 M	0.4 ml
Agua destilada	50 ml

5.2.4 Reactivos para PCR

Los primers, desoxinucleótidos tri-fosfato, y la enzima Taq polimerasa utilizados, fueron de la marca Life Technologies™. El $MgCl_2$ se utilizó 1.5 mM. El buffer 10X contenía: 200mM Tris-HCl pH 8.4 y 500mM KCl, se utilizó 1X al final.

6 RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Algunos cultivos se contaminaron por hongos, por lo que para purificar la cepa, se resembraron en agar ELMARC. Las cajas que no presentaban crecimiento o que presentaban contaminación excesiva fueron desechadas. En esta investigación se observó que el crecimiento de las bacterias era muy rápido, de tres a cuatro días en todas las cepas aisladas por lo que se trató de microorganismos del género *Rhizobium* los cuales fueron aislados, hasta tener un total de 28 cepas puras que procedían de las 4 especies de *Lupinus* antes mencionadas.

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se enlistan en la cuadro 3. El 100% de las cepas seleccionadas presentaron un crecimiento rápido de 3 a 4 días, esto concuerda con lo mencionado por Ferrera-Cerrato (1993) y nos indica que seguramente son cepas de *Rhizobium* y no son *Bradirhizobium*. Siendo esta prueba la considerada más contundente, aún cuando se observó que en la prueba de producción de ácido o álcali hubo un 22/28 78.57% de respuesta ácida; en la prueba de leche tornasolada 24 de las 28 cepas tuvieron respuesta negativa, es decir, el 85.71%. En la prueba de motilidad en medio MIO 22 cepas dieron respuesta positiva, siendo el 78.57%. Todas se consideraron como pertenecientes al género *Rhizobium*. Además, se observó la morfología macroscópica en el medio ELMARC, y se encontró que las colonias tenían una morfología convexa o cónica, con un color variable desde blancas a rosas opaco (Holt y cols, 1994).

6.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Una vez extraído el ADN de cada una de las 28 cepas aisladas de *Rhizobium*, se realizó el PCR bajo las condiciones mencionadas en la metodología y los resultados fueron positivos para la amplificación del gen 16S ribosomal de *Rhizobium*. En la figura 2 se muestra un gel representativo de los resultados del PCR, en el que se puede observar lo siguiente; en el primer carril se colocó el

marcador de peso molecular. En los carriles 2-4 se encuentran las muestras 2,5,6 respectivamente; en el carril 5 se colocó agua destilada como testigo. Finalmente en los carriles 6-8 las muestras 7, 11, 15 fueron colocadas respectivamente. El nivel al que llegaron las muestras respecto del marcador molecular fue de 300 pb que concuerda con lo esperado.

Este mismo comportamiento fue observado en la electroforesis de la amplificación de todas las muestras.

6.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

El resultado del inóculo fue positivo, ya que todas plantas que se infectaron con las cepas seleccionadas presentaron nódulos después de 15 a 20 días.

NUMERO DE CEPA	PRUEBA Tinción de Gram	Velocidad de crecimiento	Producción de ácido/alcali	Leche Tornasolada	Motilidad (medio MIO)	Reactivos Byla/Benedict
1	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
2	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
3	negativo	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
4	negativo	rápido	ácido	positivo	positivo	negativo
5	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
6	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
7	negativo	rápido	ácido	positivo	positivo	negativo
8	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
9	negativo	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
10	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
11	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
12	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
13	negativo	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
14	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
15	negativo	rápido	ácido	positivo	positivo	negativo
16	negativo	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
17	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
18	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
19	negativo	rápido	ácido	positivo	positivo	negativo
20	negativo	rápido	álcali	negativo	positivo	negativo
21	ácido	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
22	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
23	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
24	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
25	negativo	rápido	ácido	negativo	negativo	negativo
26	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
27	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo
28	negativo	rápido	ácido	negativo	positivo	negativo

Cuadro 3. Resultados de las pruebas bioquímicas obtenidas de las 28 cepas estudiadas

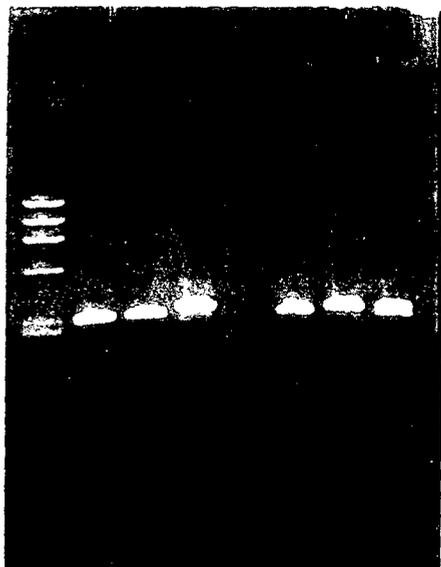


Figura 2. Electroforesis de 6 muestras después de PCR

7 DISCUSIÓN

La aplicación de técnicas clásicas de tipificación bacteriana que involucran la forma de reacción de la bacteria ante ciertos químicos presentes en determinados medios, son de suma importancia, para garantizar la identificación correcta de la bacteria en cuestión. Sin embargo, en ocasiones es difícil identificar las diferencias entre ellas. Por lo que es necesario aplicar varias pruebas bioquímicas para determinar el tipo de bacteria de interés.

En respuesta a esto, se ha propuesto la utilización de pruebas más exactas, como el PCR, RAPD y RFLP. En numerosos estudios se ha demostrado ampliamente su alto grado de especificidad, sensibilidad, fácil aplicación y rapidez; de forma tal que no únicamente permite la identificación sino también ayuda a identificar filogenias y relaciones evolutivas. De forma general, para este tipo de técnicas se utilizan genes que estén relacionados con lo que se requiere encontrar, es decir, si lo que se busca son diferencias, se utilizan genes que tengan cambios entre especies y que no sean resultado de una transferencia horizontal; por otro lado, si lo que se busca es una identificación de una especie o un género, se utiliza un gen que esté conservado y que al mismo tiempo produzca diferencias identificables entre géneros o especies. En el caso de este estudio el objetivo fue identificar un género bacteriano, por lo que se utilizó el gen 16S de ARNr, ya que dicho gen está bien conservado entre bacterias pero presenta pequeñas diferencias entre especies y géneros (Sonnante y cols., 1997; Menkir y cols., 1997; Laguerre y cols., 1994).

De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica del PCR es una herramienta sensible, específica y rápida que permite de forma sencilla, la identificación de géneros bacterianos (Dickinson y cols, 1995).

Sigue siendo importante contar con los resultados de las pruebas bioquímicas ya que estas junto con los resultados de PCR se complementan y nos permite tener seguridad en los resultados para la caracterización e identificación de cepas.

Con los resultados de las pruebas bioquímicas comprobamos que el género con el que trabajamos es *Rhizobium* y no *Bradyrhizobium*; lo que resulta importante,

ya que, por un lado, existe confusión entre estas dos bacterias cuando se observa el nódulo y la morfología en cultivo; por otro lado, nos permite confirmar que *Rhizobium* es un género predominante en las áreas estudiadas (Schlinkert-Miller y Pepper, 1988).

En estudios recientes en nuestro país, se han encontrado otras cepas de rizobios en estados como el de Morelos. En estos estudios encontraron cepas de *Bradyrhizobium*, que nodulan plantas de *Lupinus*. En otro estudio realizado también en Morelos, encontraron cepas de *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*, además de *Rhizobium*, pero aisladas de suelo. Lo que indica que en esa área, *Rhizobium* no es el género predominante (Wang y Martínez-Romero, 2000).

En el presente trabajo, al comparar lo obtenido con las pruebas bioquímicas y el PCR, se comprobó que el género *Rhizobium* es el principal simbiote de *Lupinus* en la región estudiada, y por consiguiente está muy difundido por el occidente del país. Esta relación estrecha nos permite trabajar con *Lupinus* como planta regeneradora de suelos con la certeza de que está acompañada por *Rhizobium* como simbiosis en sus raíces. Así mismo, *Lupinus*, resulta una fuente segura de *Rhizobium*, en caso de buscar solamente la bacteria para su posterior inoculación en otro tipo de leguminosa (Wang y Martínez-Romero, 2000; Barrera-Necha, 1996)

Al comparar los resultados obtenidos con las pruebas bioquímicas con los del PCR, se puede observar que los resultados de las pruebas bioquímicas pueden llevar a confusiones, siendo más confiable la técnica de PCR ya que no presenta dudas en la interpretación de los resultados. Aunque con el apoyo de la técnica de PCR se puede comprobar y apoyar lo obtenido con las pruebas bioquímicas, es decir, que las cepas efectivamente pertenecen al género *Rhizobium*,

8 CONCLUSIONES

1. Las cepas estudiadas coincidieron con lo esperado en el caso del método de pruebas bioquímicas, demostrando pertenecer al género *Rhizobium*
2. En la prueba de velocidad de crecimiento, las cepas resultaron tener crecimiento rápido probando ser *Rhizobium*.
3. Los resultados de algunas pruebas bioquímicas arrojaron dudas para asegurar que todas las cepas pertenecieron al género *Rhizobium*.
4. El total de las cepas aisladas de las cuatro especies de *Lupinus sp.* estudiadas resultaron positivas a la prueba de PCR amplificando el gen 16S de ARNr.
5. La utilización de la técnica de PCR confirmó que el total de las cepas estudiadas pertenecieron al género *Rhizobium*.
6. De acuerdo con lo observado en este trabajo, se reafirma que el PCR es una herramienta sensible, específica y rápida que permite la identificación de géneros bacterianos
7. La técnica de PCR resulta más efectiva sobre las pruebas bioquímicas ya que presenta pocas dudas en los resultados, a diferencia de las pruebas bioquímicas.
8. Las cepas en estudio de *Lupinus* tienen una relación muy estrecha con el género de bacterias fijadoras de nitrógeno *Rhizobium*.

REFERENCIAS

- ❖ AGUILAR O. M; López M. V; Riccillo P. M., (2001). The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J. Biotechnology*. 91 (2-3); 181-188.
- ❖ ATLAS R. M; Bartha R., (1993). *Microbial Ecology: Fundamentals and application*. Tercera Edición. Ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California, pp. 513-516.
- ❖ ALBERTS B; Bray D; Lewis J; Raff M; Roberts K; Watson J. D., (1994). *Molecular biology of the cell*. Tercera Edición. Ed. Garland Publishing, Inc. Nueva York, pp. 316-317.
- ❖ AUSUBEL F. M; Rent R; Kingston R.E; Moore D.D; Seidman J.G; Smith J.A; Struhl K., (1987). *Current protocols in molecular biology*. Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- ❖ BARRERA-NECHA, L. L., (1996). Diversidad genética de las cepas mexicanas de *Bradyrhizobium* simbiotes de *Lupinus* sp. Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional. México.
- ❖ BARRERA-SALDAÑA H. A; Ortíz-López R; Rojas-Martínez A; Reséndez-Pérez D., (1993). Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo* enero-febrero. 50-60.
- ❖ BROUGHTON W. J; Keycke N; Heiner-Meyer Z. A; y Pankhurst C. E., (1984). Plasmid linked nif and nod genes in fast growing rhizobia that nodulate *Glicine max.*, *Psophocarpus tetragonolobus* and *Vigna unguiculata*. *Proceedings of the National Academy of Science*. 81; 3093-3097.
- ❖ BUSSMAN-LOOCK A; Dabrath M; Menge-Hartmann U., (1992). Histological observation on intraspecific crosses in the genus *Lupinus*. *Plant Breeding*, 109; 82-85.
- ❖ CARDENAS L; Vidali L; Domínguez J; Pérez H; Sánchez F; Hepler P. K; Quinto C., (1998). Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiology*, 116; 871-877.
- ❖ CHEN L. S; Figueredo A; Pedrosa F. O; Hungria M., (2000). Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Applied and Environmental Microbiology*; 6 (1); 5099-5103.
- ❖ CORICH V; Giacomini A; Carlot M; Simon R; Tichy H. V; Squartini A; Nuti M.P., (2001). Comparative strain typing of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae natural populations. *Can J Microbiol*. 47(6): 580-4.
- ❖ COOPER J. E., (1982). Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory medium. *Soil Biology & Biochemistry*; 14; 127-131.
- ❖ DALTON D.A; Joyner S.L; Becana M; Iturbide-Ormaetxe I; Chatfield J.M., (1998). Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiology*. 116: 37-43.

- ✦ DICKINSON J.H; Kroll R. G; Grant K. A., (1995). The direct application of the polymerase chain reaction to DNA extracted from foods. *Letters in Applied Microbiology*. 20; 212-216.
- ✦ EINARSSON S; Gudmundsson J; Sverrisson H; Kristjansson J. K; Runolfsson S., (1993). Production of *Rhizobium* inoculants for *Lupinus nootkatensis* on nutrient-supplemented pumice. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11); 3666-3668.
- ✦ FANG Y; Hirsch A. M., (1998). Studying early nodulin gene ENOD40 expression and induction by nodulation factor and cytokinin in transgenic alfalfa. *Plant Physiology*. 116. 53-68.
- ✦ FENTON, M., (1994). En: <http://callfrey.taranaki.ac.nz/~mfenton/BIOLOGY/rhiz1994.htm>
- ✦ FERRERA-CERRATO R; González-Chavez M. C. A; Rodríguez-Mendoza Ma. N; (1993). *Manual de Agromicrobiología*. Primera Edición. Ed. Trillas S.A. de C. V. México.
- ✦ GAO J; Terefework Z; Chen W; Lindstrom K., (2001). Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. *J Biotechnology*. 91(2-3); 155-68.
- ✦ GRANT W.D; Long P.E., (1989). *Microbiología Ambiental*. Ed. Acirbia S.A. España pp. 145-149.
- ✦ GRIFFITHS A; Miller J.H; Suzuki D.T; Lewontin R.C; Gelbart W.M., (1993). *Genética*. Quinta edición. Ed. Interamericana – McGraw-Hill de España, S.A. Madrid.
- ✦ HASSET J. J; Banwart W.L., (1992). *Soil and their Environment*. Ed. Prentice-Hall, Inc. Nueva Jersey.
- ✦ HOLT J. G; Krieg N. R; Sneath P. H. A; Staley J. T.; Williams S. T., (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena Edición. Ed. Williams & Wilkins. Bartimore. P.p. 95, 112, 120, 169.
- ✦ JORDAN D. C., (1984). *Berey's Manual of Determinative Bacteriology* (N.R. Krieg. ED.) vol 1.. Williams & Wilkins, Baltimore. pp. 234-244
- ✦ KENDREW J., (1994). *The encyclopedia of molecular biology*. Primera edición. Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford.
- ✦ KEYSER H. H; Bohloot B. B; Hu T. S; Weber D. F., (1982). Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 43; 636-642.
- ✦ KHBAYA B; Neyra M; Normand P; Zerhari K; Filali-Maltouf A., (1998). Genetic diversity and phylogeny of rhizobia that nodulate *Acacia* spp. in Morocco assessed by analysis of rRNA genes. *Applied Environmental Microbiology*. 64(12); 351-7.
- ✦ LAGUERRE G; Allard M; Revoy F; Amarger N., (1994). Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*; 60 (1); 56-63.
- ✦ LARCHER W., (1995). *Physiological Plant Ecology*. Tercera Edición. Ed. Springer-Verlag. Berlin.

- ✧ LUQUE J; Herráez A., (2001). Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética "Conceptos, Técnicas y Aplicación en Ciencias de la Salud". Ed. Harcourt. Madrid.
- ✧ MARTINEZ-ROMERO E; Palacios R; Mora J., (1998). Cepas mejoradoras de *Rhizobium*. Investigación y Ciencia; 265; 14-19; España.
- ✧ McCLEAN, P. (2000). En : www.ndsu.nodak.edu/instruct/macclean/plsc731/mapping/mapping5.htm
- ✧ McVAUGH R., (1987). Flora Novo-Galiciana: A Descriptive Account of the Vascular Plants of Western México. Vol 5: Leguminosae. Ed The University of Michigan Press. Michigan.
- ✧ MENKIR A; Goldsbrough P; Ejeta G., (1997). RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of sorghum. Crop Science. 37; 564-569.
- ✧ MULLIS K.B., (1990). The unusual origin of polymerase chain reaction. Scientific American. 262; 43-46.
- ✧ MULLIS K. B; Faloona F. A., (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. Method Enzimol. 155; 335-350.
- ✧ QUATRINI P; Scaglione G; Cardinale M; Caradonna F; Puglia A. M., (2002). *Bradyrhizobium* sp. nodulating the Mediterranean shrub spanish broom (*Spartium junceum* L.) Applied Microbiology. 92 (1); 13-21.
- ✧ RIDGE R. W., (1996). Root hairs: Cell Biology and Development. En "Plant Roots: The Hidden Half" (Editores Y.Waisel y cols.) Ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York. pp. 127-147 (capítulo 7).
- ✧ RZEDOWSKI J. y RZEDOWSKI G., (1979). Flora Fanerogámica del Valle de México. Primera Edición. Segunda Reimpresión. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. México D. F-
- ✧ SONNANTE G; Spinosa A; Marangi A; Pignone D., (1997). Isozyme and RAPD analysis of genetic diversity within and between *Vigna luteola* and *V. marina*. Annals of Botany. 80. 741-746.
- ✧ SCHOLLA M. H; Elkan G, .H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. International Journal of Systematic Bacteriology. 34; 384-386.
- ✧ SCHLINKERT-MILLER M; Pepper I. L., (1988). Physiological and biochemical characteristics of a fast-growing strain of Lupin rhizobia isolated from de sonoran desert. Soil Biol. Biochem. 20:3; 319-322.
- ✧ TATE R. L., (1995). Soil Microbiology. Primera Edición. Ed. John Wiley & Sons, Inc. Nueva York.
- ✧ VOLPIN H; Phillips D. A., (1998). Respiratory elicitors from *Rhizobium meliloti* affect intact alfalfa roots. Plant Physiology. 116; 777-783.
- ✧ WANG E. T; Martínez-Romero E., (2000). *Sesbania herbacea-Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. Microb. Ecol. 40(1); 25-32.
- ✧ ZHANG X. X; Kosier B; Priefer U. B., (2001). Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. Mol. Ecol. 10 (9); 2297- 305.