



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



## INSTITUTO DE CIENCIAS

### CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

## Diversidad molecular de *Cupriavidus* sp. nodulante de *Mimosa pudica* en México

### TESIS

Que para obtener el grado de  
**MAESTRIA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**  
Con opción en Bioquímica y Genética Microbiana

### PRESENTA

Biólogo Roberto Carlos Llano Villarreal

### DIRECTOR DE TESIS

D. C. José Antonio Munive Hernández



**BUAP**

Puebla, Pue. a 17 de noviembre 2015.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO  
EN MICROBIOLOGÍA  
CICM-ICUAP  
PRESENTE.**

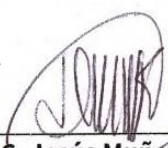
Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría del alumno **Roberto Carlos Llano Villarreal**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


**“Diversidad molecular de *Cupriavidus sp. nodulante de Mimosa pudica* en México”**

A nuestro juicio, el alumno Llano Villarreal puede proceder a la impresión de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

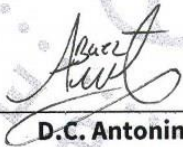
Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.  
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Jesús Muñoz Rojas

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Ricardo Carreño López

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Analilia Arroyo Becerra

  
\_\_\_\_\_  
D.C. Antonino Baez Rogelio

*Todos somos uno*

*Yo soy otro tu*

*Así como Tú*

*Eres otro yo*

## DEDICATORIA

*Este trabajo de Tesis está dedicado a las mujeres más importantes de mi vida:*

*Mi madre; María Magdalena Villarreal de Llano, quien siempre me apoyo incondicionalmente y quien no pudo acompañarme físicamente a la culminación de esta etapa de mi vida, te extrañare siempre Mamá, descansa en paz. ¡Lo logre!*

*A mi hija; Ambar Llano López quien es la alegría de mi vida, solo pensar en ti me da fuerza para superar todo. Te amo.*

*A mi Hermana; María Dolores Llano de Alameda, que siempre me está estimulando a seguir adelante.*

# AGRADECIMIENTOS

Al Doctor José Antonio Munive Hernández que primeramente me permitió formar parte de su grupo de trabajo, agradezco mucho sus consejos y su infinita paciencia ¡gracias!

A mi comité revisor; Dr. Jesús Muñoz Rojas, Dr. Ricardo Carreño López, Dra. Analilia Arroyo Becerra Y el Dr. Antonino Baez Rogelio, por todos sus consejos y sesiones donde aprendí mucho y me volví un mejor estudiante.

A los Rizobios; todos aquellos compañeros del laboratorio que sin ellos no hubiera podido terminar este trabajo, en especial a mi compañero y amigo Arturo quien siempre me brindó su apoyo, conocimientos y sincera amistad.

A los profesores del Posgrado de Microbiología, por compartir sus conocimientos y experiencias.

A todos mis compañeros de generación y amigos del Instituto y otros laboratorios.

Al Biólogo José Luis Contreras por su ayuda en el muestreo y en la identificación de las mimosas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca para llevar a cabo los estudios de Maestría.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP) por la extensión de beca otorgada.

A la dirección del ICUAP y al posgrado en Ciencia Microbiológicas por la impresión y encuadernado de tesis.

# INDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN.....  | 1  |
| 2. INTRODUCCIÓN.....   | 2  |
| 2.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN).....                         | 2  |
| 2.2 Las leguminosas.....   | 4  |
| 2.3 El género <i>Mimosa</i> .....                                      | 4  |
| 2.4 El grupo rizobia.....  | 5  |
| 2.5 El género <i>Cupriavidus</i> .....                                 | 6  |
| 2.6 El proceso de nodulación.....                                      | 7  |
| 2.7 Descripción taxonómica polifásica .....                            | 10 |
| 3. ANTECEDENTES .....  | 11 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....  | 12 |
| 5. OBJETIVOS .....   | 13 |
| 5.1 Objetivo general .....   | 13 |
| 5.2 Objetivos específicos .....  | 13 |
| 6. METODOLOGIA .....   | 13 |
| 6.1 Muestreo.....  | 13 |
| 6.2 Aislamiento.....   | 14 |
| 6.3 Prueba de nodulación en <i>Macropitium atropurpureum</i> .....     | 15 |
| 6.4 Amplificación de repetidos palindromicos extragénicos REP-PCR..... | 15 |
| 6.5 Amplificación del gen <i>rrs</i> .....                             | 16 |
| 6.6 Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA) ..... | 17 |
| 6.7 Amplificación del gen <i>gyrB</i> .....                            | 18 |
| 6.8 Alineamiento y manipulación de secuencias nucleotídicas .....      | 18 |
| 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....                           | 19 |
| 7.1 Material biológico obtenido .....                                  | 19 |

|      |   |    |
|------|---|----|
| 7.2  | REP-PCR Y ARDRA .....                                   | 22 |
| 7.3  | Análisis del gen <i>rrs</i> .....                       | 23 |
| 7.4  | Prueba de nodulación en <i>Mimosa pudica</i> .....      | 29 |
| 7.5  | Prueba de nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i> ..... | 30 |
| 7.6  | Análisis del gen <i>gyrB</i> .....                      | 31 |
| 7.7  | Árboles concatenados .....                              | 32 |
| 8.   | CONCLUSIONES.....                                       | 34 |
| 9.   | BIBLIOGRAFIA.....                                       | 35 |
| 10.  | ANEXOS .....  | 44 |
| 10.1 | Anexo 1. Medio agar levadura manitol (YMA).....         | 44 |
| 10.2 | Anexo 2. Solución nutritiva Jensen .....                | 44 |
| 10.3 | Anexo 3. Geles.....                                     | 45 |
| 10.4 | Anexo 4. ARDRAS.....                                    | 46 |
| 10.5 | Anexo 5. Secuencias gen <i>rrs</i> .....                | 48 |
| 10.6 | Anexo 6. Secuencias gen <i>gyrB</i> .....               | 51 |

# 1. RESUMEN

La familia Fabaceae está conformada por tres subfamilias: Papilionoideae, Mimosoideae, y Caesalpinioideae. México es el segundo centro de distribución de *Mimosa* después de Brasil (Grether 1978), la mitad son endémicas del país (Grether et al. 1996). Estas plantas se caracterizan por ser noduladas por un grupo de bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno conocidas como rizobia.

En este estudio se muestrearon distintas plantas pertenecientes al género *Mimosa* en los estados de Puebla y Veracruz. Del muestreo se obtuvieron un total de 20 cepas capaces de nodular *Macroptilium atropurpureum*. A las 20 cepas aisladas se les amplificó parcialmente el gen *rrs* y se analizaron. Del total de las cepas aisladas, 6 de ellas pertenecen al género *Rhizobium* y 5 cepas al género *Bradyrhizobium*, todas ellas aisladas de especies de *Mimosa* de climas áridos de sur del Estado de Puebla. Los 9 aislados restantes pertenecieron a los géneros; *Burkholderia* con 2 cepas y *Cupriavidus* con 7 cepas.

Se seleccionaron las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* y se corroboró la capacidad de nodular la planta de origen *M. púdica in vitro*. También se probó la capacidad de nodular la especie de interés económico *Phaseolus vulgaris*, todos los aislados de este género resultaron ser capaces de nodular esta planta a excepción de la cepa 707. Se les amplificó parcialmente el gen *gyrB* y las secuencias se analizaron de igual manera por los métodos filogenéticos Neighbor Joining y Maximum Likelihood.

Se realizó un análisis de las secuencias concatenadas de los genes amplificados *rrs-gyrB* de las cepas del género *Cupriavidus*. Según el análisis, las cepas se agrupan independientemente de las demás especies reportadas al momento, lo cual es un indicio de que podría tratarse de una especie diferente.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los seres vivos, ya que es necesario para la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN y ARN) y otras moléculas fundamentales para el metabolismo. Los seres vivos utilizan diferentes formas de este elemento, tanto orgánicas e inorgánicas, que se reciclan a través de distintos procesos en lo que conocemos como el ciclo del nitrógeno (figura 1).

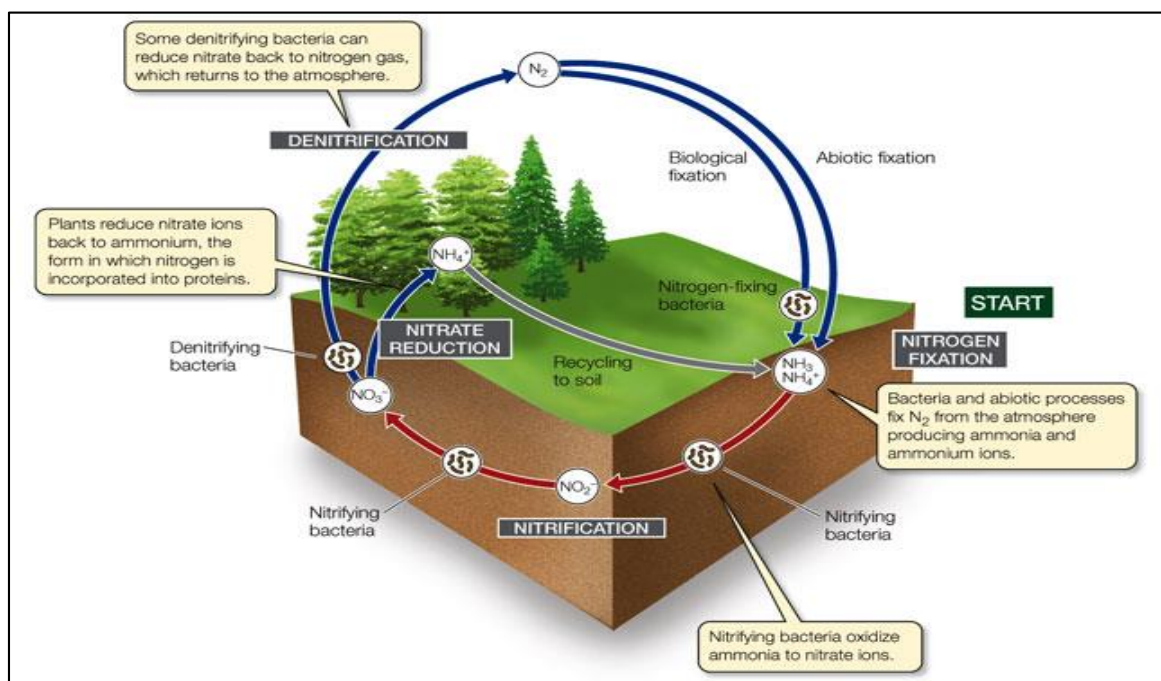
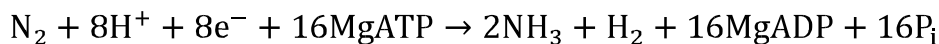


Figura 1. Esquematización del ciclo del nitrógeno. Tomado de Evolution 2007. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Aunque la presencia del nitrógeno en la atmósfera es muy abundante (78%), encontrándose en forma gaseosa  $N_2$  (dinitrógeno), esta molécula es muy estable debido a su triple enlace covalente, por lo que los organismos eucariotas no son capaces de asimilarlo (Fassbender y Bornemisza, 1994). Para que este elemento sea utilizable, es necesario que sea previamente transformado a compuestos solubles como el amonio ( $NH_4^+$ ) y los nitratos ( $NO_3^-$ ). El proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico pasa a sus formas combinadas se puede dar en 3 eventos:

1. La fijación espontánea, es un proceso natural en que descargas eléctricas de tormentas, radiación ultravioleta, rayos cósmicos, meteoritos, combustibles industriales, incendios y erupciones volcánicas entre otras causas.
2. La fijación industrial química, es la producción de amoníaco y fertilizantes nitrogenados por la industria a partir del nitrógeno del aire mediante el proceso Haber-boch.
3. La fijación biológica es la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco, es realizada por microorganismos de vida libre o en asociación con plantas, estos microorganismos reciben por ello el nombre de diazótrofos (azoe: nitrógeno; trofos: alimentación) y se logra gracias a la presencia de un sistema enzimático denominado nitrogenasa que se encuentra en este tipo de microorganismos. Las nitrogenasas son enzimas oxidorreductasas, por lo que son capaces de romper los tres enlaces de N<sub>2</sub>. Solo algunos procariontes (Eubacteria y Archea) son capaces de transformar el N<sub>2</sub> atmosférico en compuestos utilizables para los organismos eucariotas. Este proceso consume grandes cantidades de energía como podemos observar en la siguiente reacción:



De manera general, el complejo enzimático nitrogenasa está formado por dos metaloproteínas (Chan *et al.*, 1993):

- 1.- Una proteína Fe-M, donde el metal (M) puede ser molibdeno, vanadio o hierro. Esta proteína está codificada por los genes *nifD* para la subunidad  $\alpha$  y *nifK* para la subunidad  $\beta$  (Bergensen, 1997).
- 2.- Una ferroproteína, sensible al oxígeno, que contiene únicamente agrupamientos tipo 4Fe4S, así como dos sitios de enlace MgATP. Esta proteína está codificada por el gen *nifH* (Bergensen, 1997). La enzima activa requiere una molécula del componente 1 (proteína Fe-M), y dos moléculas del componente 2 (ferroproteína).

Todas las bacterias que pueden fijar nitrógeno en asociación simbiótica con leguminosas protegen a su enzima nitrogenasa mediante una barrera física, por parte de la planta, que limita la difusión del O<sub>2</sub> hacia el sitio catalítico de esta.

## 2.2 Las leguminosas

La familia de las leguminosas pertenece al orden de las Fabales y la constituyen tres subfamilias: Caesalpiniaceae, Mimosaceae y Fabaceae (Lewis *et al.*, 2005). Las leguminosas junto con las familias Asteraceae, Orchidaceae, Poaceae, Cactaceae y Rubiaceae son las seis familias de angiospermas más diversas que existen (Sosa y Dávila, 1994) y se encuentran distribuidas en casi todo el planeta. Estudios con raíces fósiles indican que las leguminosas aparecieron hace 60 millones de años (Lavin *et al.*, 2005), desde entonces se han diseminado en todo el planeta. Por esta razón se consideran un grupo cosmopolita, en regiones tropicales destacan los árboles, mientras que en climas áridos predominan los arbustos y las hierbas (Barneby, 1989 y 1991). Los granos de leguminosas contribuyen con el 33% del requerimiento proteico de la dieta en humanos, mientras que la soya (*Glycine max*) y el cacahuate (*Arachis hypogaeae*) proveen más del 35% del aceite vegetal procesado en el mundo (Graham y Vance, 2003). La importancia de las leguminosas se refleja primordialmente en la economía por sus usos diversos, por otro lado el desarrollo de las leguminosas es teóricamente independiente de la cantidad o el estado del nitrógeno en el suelo, por lo que son uno de los importantes suministros de cereales y cultivos forrajeros en el mundo.

## 2.3 El género *Mimosa*

El género *Mimosa* se ubica dentro de la familia Mimosaceae, en la tribu Mimoseae (Polhill *et al.*, 1981), donde el 90% de las especies son americanas y las restantes se encuentran en África, Asia y Australia (Barneby, 1991). Estas plantas tienen una amplia distribución geográfica; encontrándose en la República Mexicana en diversas condiciones ecológicas, tanto en zonas áridas y semiáridas como en regiones templadas y cálido-húmedas (Grether, 1982). De las Mimosoideae presentes en México, *Mimosa* es el género con mayor número de especies con 110, seguido de *Acacia* con 85, *Inga* y *Calliandra* con 36 especies cada uno (Sousa y Delgado 1993; Grether *et al.*, 1996).

México es considerado como el segundo centro de distribución de *Mimosa* después de Brasil y cuenta con el 22% de las especies del género conocidas a nivel mundial; de estas, 60 especies (el 55%) son endémicas del país (Grether *et al.* 1996). En el género *Mimosa* se pueden encontrar hierbas anuales o bianuales, sufruticosas erectas, rastreras, decumbentes o trepadoras, arbustos erectos, rastreros o decumbentes, bejucos o árboles pequeños y grandes (Grether 1978).

Las especies que habitan el matorral xerófilo generalmente son arbustos espinosos de gran importancia ecológica, ya que además evitar la erosión del suelo y ayudar a su recuperación, puede formar islas de fertilidad que son nodrizas de diversas especies de cactáceas, agaváceas y otras plantas que evitan la erosión y aumentan la fertilidad de

los suelos (Valiente-Banuet y Ezcurra, 1991; Rzedowski y Rzedowski, 2001; Camargo-Ricalde y Dhillion, 2003; Luna-Suárez *et al.*, 2004; Martínez-Pérez *et al.*, 2006). Estas características distinguen a las especies de *Mimosa* como potenciales para ser usadas en proyectos de restauración ecológica, ya que generan condiciones ambientales propicias para el establecimiento de otras especies y con ello impulsan la sucesión ecológica (Camargo-Ricalde y Grether, 1998; García-Sánchez, 2005; Martínez-Pérez *et al.*, 2006).

Una de las razones por las cuales las plantas del género *Mimosa* son capaces de colonizar suelos degradados, es por su capacidad para establecer una relación simbiótica con bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno pertenecientes al grupo de los rizobia. Sin embargo, la relación que establecen con este grupo de bacterias presenta una característica muy especial. Este grupo de plantas se caracteriza por formar relaciones simbióticas con bacterias simbióticas pertenecientes principalmente a la clase  $\beta$ -proteobacteria.

## 2.4 El grupo rizobia

En 1888, Beijerinck obtuvo el primer cultivo puro de bacterias nodulantes de leguminosas a partir de nódulos de *Pisum* y *Vicia*, nombrándolo "*Bacillus radicícola*", el cual posteriormente fue renombrada como *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1889). Esta capacidad de nodular leguminosas, junto con algunas características bioquímicas y fenotípicas y también la velocidad de crecimiento, tuvieron un papel fundamental en la taxonomía de los rizobia. El término "rizobia" se utilizó en un inicio para referirse al género *Rhizobium*. Sin embargo, con el paso del tiempo este término ha sido empleado para designar a todas las bacterias que son capaces de nodular y fijar nitrógeno, en asociación con leguminosas.

En la actualidad se sabe que los genes que participan en la nodulación, se encuentran en un plásmido llamado "plásmido simbiótico" (pSym) o en una región del cromosoma denominada "isla simbiótica" (IS), este plasmido o isla simbiótica es adquirida por transferencia horizontal. Así mismo han ido evolucionando por transferencia horizontal. El surgimiento de técnicas moleculares tales como análisis de la secuencia de genes ribosomales 16SrRNA (Laguerre *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1998), hibridación DNA-DNA (Willems *et al.*, 2001), recientemente el MLSA (Análisis de secuencias Multilocus) (Martens *et al.*, 2008; Vinuesa *et al.*, 2005a, 2005b) y el acceso generalizado a otros métodos genéticos *in Silico*, han permitido la identificación y descripción de nuevos géneros y especies, por lo tanto son parte fundamental en la taxonomía de los rizobia como actualmente lo conocemos.

El grupo rizobia incluye trece géneros que comprenden setenta y seis especies. Este grupo está constituido por miembros de las clases  $\alpha$  y  $\beta$  de las Proteobacterias. Dentro de las  $\alpha$ -Proteobacterias se encuentran los géneros *Rhizobium* (incluyendo a *Allorhizobium*)

y *Ensifer*, que pertenecen a la familia Rhizobacteriaceae (Jordan, 1982, Chen *et al.*, 1988); los géneros fijadores *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium* (Mantelin *et al.*, 2006) de la familia Phyllobacteriaceae. En la familia Hyphomicrobiaceae sólo los géneros *Azorhizobium* y *Devosia* son capaces de nodular leguminosas (De Lajudie *et al.*, 1998; Rivas *et al.*, 2002). El género simbiótico *Methylobacterium* constituye la familia Methylobacteriaceae (Sy *et al.*, 2001). El género *Bradyrhizobium* forma parte de la familia Bradyrhizobiaceae (Jordan, 1982). Recientemente se ha descrito al género *Ochrobactrum* (Zurdo *et al.*, 2007), que se encuentra en la familia Brucellaceae. También tenemos a el género fijador *Shinella* de la familia Rhodocyclaceae (Lin *et al.*, 2008) aun así constantes cambios se llevan en cuanto a la taxonomía de los Rizobia (Weir 2008). En las  $\beta$ -Proteobacterias el género simbiótico *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001), constituyendo la familia Burkholderiaceae; el género *Hebaspirillum* se encuentra en la familia Oxalobacteraceae (Valverde *et al.*, 2003); mientras que en el género *Cupriavidus*, en particular *C. taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001) y *C. necátor* son los únicos miembros de este género descritas como capaces de entrar en simbiosis y nodular especies de leguminosas.

## 2.5 El género *Cupriavidus*

La palabra *cupriavidus* proviene del latín *cuprum* (“cobre”) y *avidus* (“ansioso”) y significa ansioso por el cobre este metal potencializa el crecimiento de este tipo de bacterias. El género fue descrito por primera vez en 1987 por Makkar y Casida como Bacterias depredadoras de bacterias no obligadas en suelos. Las bacterias de este género son Gram-negativas, bacilos con flagelos peritricos, Quimioheterotrofos o quimiolitotrofos. El metabolismo es oxidativo, utilizan varios aminoácidos como única fuente de carbón y nitrógeno. Presentan actividad oxidasa y catalasa, así como la resistencia a varios metales pesados incluyendo  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ag}^{+}$ , y también algunos cationes como  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}$  (Mergeay *et al.*, 2003). Tienen actividad respiratoria quinona Q8 se presenta en *C. pinatubonensis*. Estos microorganismos se han encontrado en suelos, asociados a plantas y en pacientes con deficiencia inmunológica. La especie tipo con la que se describió el género es: *Cupriavidus necátor*, recientemente descrita como capaz de nodular leguminosas (Da Silva *et al.*, 2012), del cual también, destaca su capacidad de depredar otras bacterias tanto Gram+ como Gram- y hongos.

La primera especie reportada de este género capaz de nodular leguminosas fue *C. taiwanensis* anterior mente nombrada *Ralstonia taiwanensis* (Chen *et al.*, 2001). Las bacterias pertenecientes a éste género han sufrido varios cambios en cuanto a su ubicación dentro de la taxonomía pasando de *Ralstonia* a *Wautersia* y finalmente *Cupriavidus*. Una revisión de algunos de los últimos cambios se encuentra en la publicación de Vandamme y Coenye (2004). Actualmente el género *Cupriavidus* abarca 14 especies (*C. alkaliphilus*, *C. basilensis*, *C. campinensis*, *C. gilardii*, *C. laharis*, *C. metallidurans*, *C. necátor*, *C. numazuensis*, *C. oxalaticus*, *C. pampae*, *C. pauculus*, *C. pinatubonensis*, *C. respiraculi* y *C. taiwanensis*) según NCBI y EMBL/GenBank database.

## 2.6 El proceso de nodulación

La interacción que se desarrolla entre estas bacterias nodulantes fijadoras de nitrógeno y las plantas leguminosas tiene como consecuencia la formación de estructuras especializadas en las cuales se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. En el proceso de nodulación se pueden distinguir una sucesión de etapas que se describen a continuación:

La primera etapa es el reconocimiento entre hospedero y el microorganismo, la quimiotaxis bacteriana es un evento crucial en la interacción rizobia-Leguminosa. La raíz de la planta exuda altos niveles de nutrientes y muchos de ellos actúan como quimioattractantes para la bacteria. Varias cepas se han descrito como quimiotácticas positivas a: azúcares, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos -como el succinato y el malato, también algunos compuestos aromáticos (Bergman *et al.*, 1991; Robinson y Bauer, 1993). El siguiente evento es el anclaje de la bacteria al hospedero, este proceso puede ser reversible en su etapa inicial. Las lectinas actúan como receptores para los exopolisacáridos bacterianos, este es uno de los filtros de especificidad en la relación rizobia-leguminosa. Posteriormente la síntesis de celulosa bacteriana causa una fuerte e irreversible unión formando agregados bacterianos en la superficie del hospedero en este caso los pelos radicales.

En el tercer paso se lleva a cabo el encorvamiento del pelo radical. Este acontecimiento es gobernado por la producción y percepción recíproca de señales, que es denominado "diálogo molecular" (De'narie *et al.*, 1993). El diálogo molecular es iniciado por la liberación de moléculas por parte de la planta, es decir, los flavonoides o derivados de éste. Los flavonoides actúan en concentraciones micro o nanomolares al igual que las hormonas ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$ ) (Cooper 2004). La molécula se compone de dos anillos aromáticos denominados A y B y un pirano heterocíclico denominado anillo C. Comparaciones entre las estructuras de diferentes flavonoides, revelan que la hidroxilación en las posiciones C-7 y C-4 (figura 2), son importantes para inducir la actividad de los genes *nod*, *noe* y *noI* (Cunningham *et al.*, 1991).

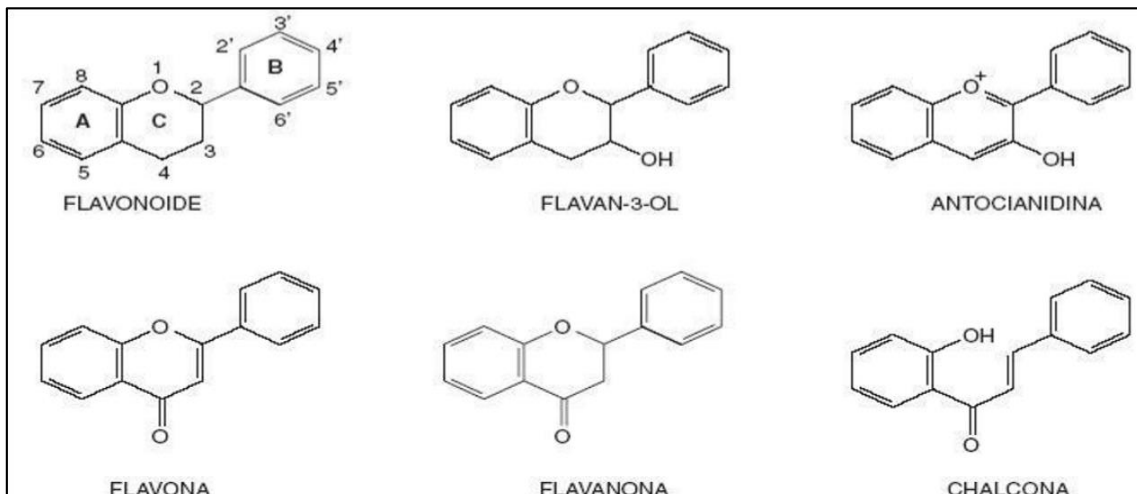


Figura 2. Estructura de la molécula de flavonoide y algunos derivados

Los genes *nodABCD* se encuentran en la mayoría de los representantes de rizobia, también se han descrito los genes *noe* y *nol* (Downie, 1998). El gen *nodD* se expresa constitutivamente y la proteína de superficie NodD reconoce y se activa por los flavonoides específicos secretados por la planta (Wais *et al.*, 2002). Ya que fue activada por los flavonoides, la proteína NodD a su vez activa la transcripción de los genes de la nodulación mediante su unión a la caja promotora de los genes *nodABC*. Estos genes están involucrados en la síntesis de la estructura básica de LCOs (del inglés: lipo-chitin-oligosaccharides), también llamados factores Nod (figura 3). Los factores Nod intervienen promoviendo la división celular en la raíz de la planta deformando los pelos radicales, lo que produce el encorvamiento de estos.

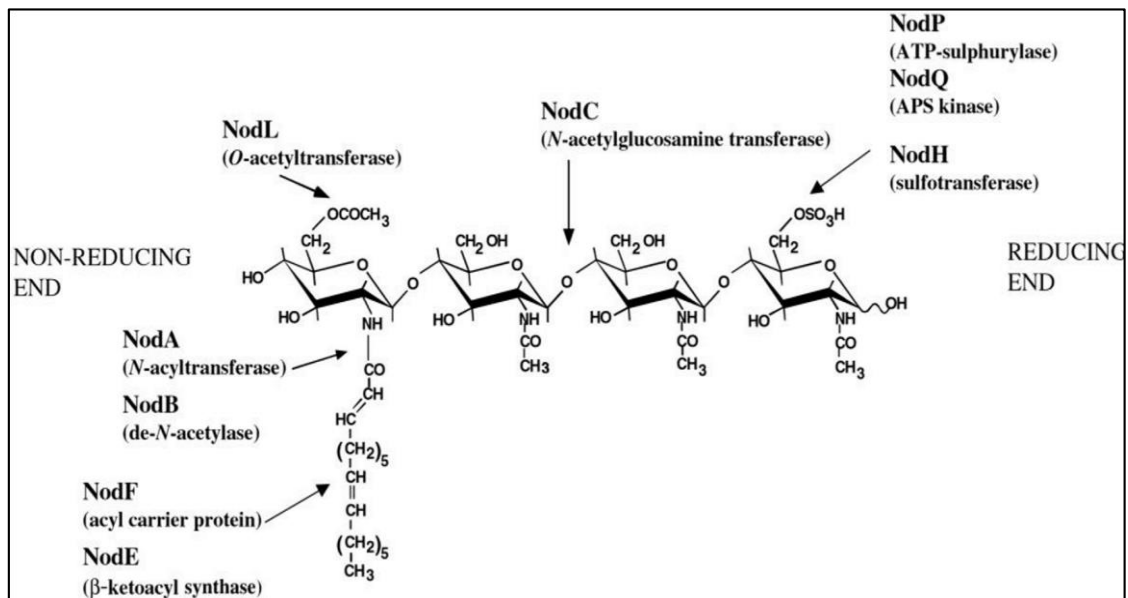


Figura 3. Estructura de los Factores Nod y la actividad de algunas proteínas Nod (Wais *et al.*, 2002).

En el cuarto suceso se lleva a cabo la degradación de la pared celular de la planta por parte de la bacteria, posteriormente por invaginación de la célula vegetal la bacteria se introduce en la raíz. La cicatriz que deja a su paso la bacteria junto con restos de la pared celular forma el canal de infección, permitiendo el acceso de las bacterias. Este canal se extiende y ramifica hasta alcanzar las células del córtex y las células del meristemo (Brewin *et al.*, 1992).

Finalmente, los rizobia penetran las células del córtex interno y externo donde posteriormente se convierten en simbiontes intracelulares, iniciando también la diferenciación en las células vegetales que empiezan a formar el nódulo.

Las bacterias al interior de las células vegetales están rodeadas de una cubierta con restos de origen vegetal llamada membrana peribacteroide, entonces, las bacterias sufren cambios en su metabolismo, también sufren diferenciación a células especializadas fijadoras de nitrógeno capaces de sintetizar nitrogenasa. Estas células diferenciadas son denominadas bacteroides; (Inzé y De Veylder, 2006; Oldroyd y Downie, 2008). La formación de estas estructuras especializadas (nódulos) es crucial

para la FBN. La razón es, que la actividad de la nitrogenasa está limitada por la presencia de oxígeno y es fácilmente inactivada de forma irreversible en presencia de éste.

Los nódulos de raíces de leguminosas son compartimentos especializados en los cuales la fijación de nitrógeno y el consumo de oxígeno por parte del microorganismo son compatibles fisiológicamente. Entre las células del nódulo existen pocos espacios intracelulares lo que constituyen una barrera para la difusión del O<sub>2</sub> (figura 4). Además, la presencia de la sustancia leghemoglobina (confinada en el citosol de la célula invadida por la rizobia), esta sustancia facilita el flujo de O<sub>2</sub> necesario para el metabolismo del bacteroide sin llegar a la toxicidad para la enzima (Ott *et al.*, 2005).

Los microorganismos que llevan a cabo la FBN poseen diversas estrategias para evitar que la enzima sea inactivada: la respiración activa, la protección conformacional y la producción de exopolisacáridos.

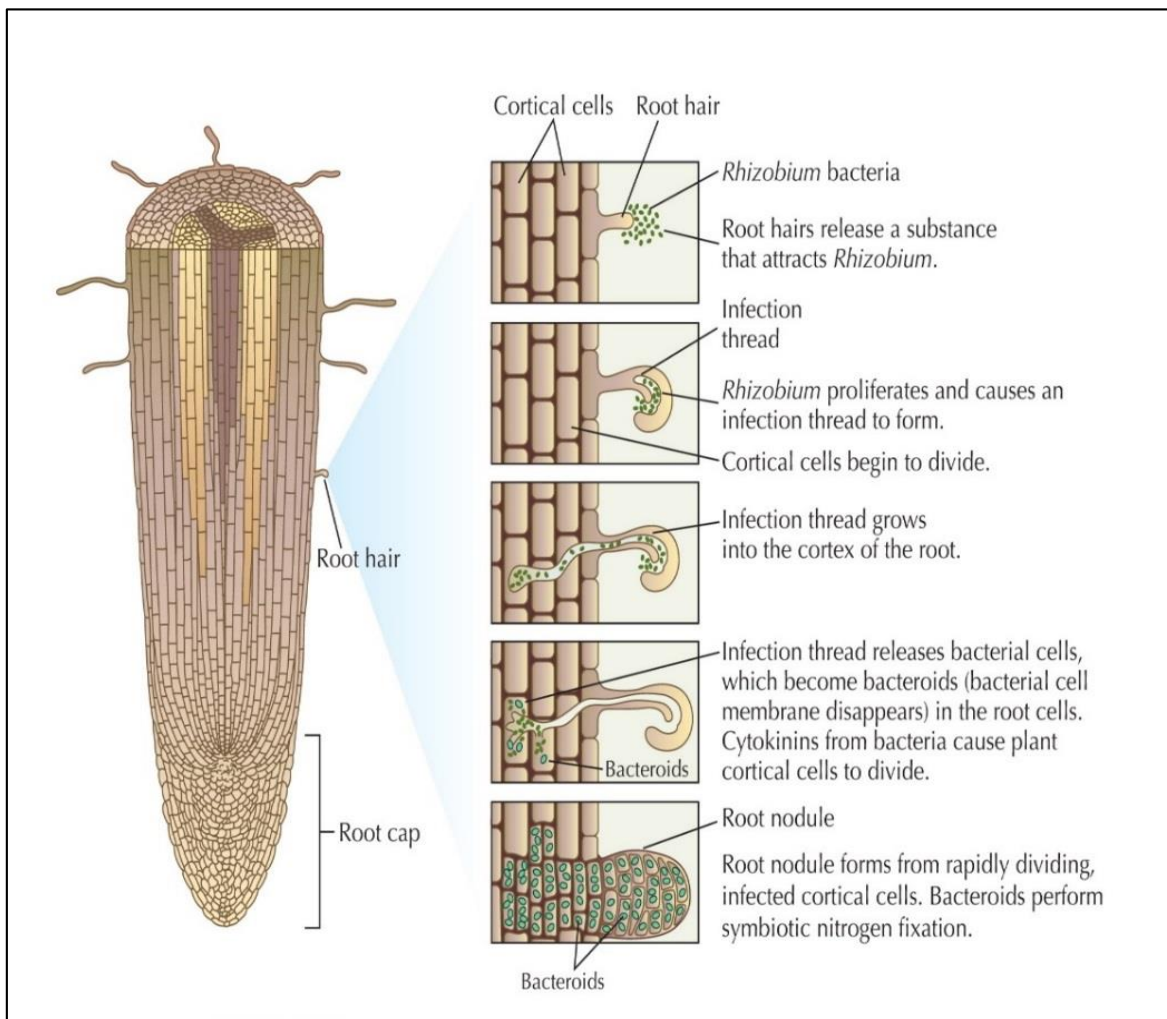


Figura 4. Dinámica de formación de un nódulo en la raíz en una leguminosa causado por *Rhizobium*. Tomado de Evolution 2007. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## 2.7 Descripción taxonómica polifásica

Taxonomía polifásica es un término acuñado por Colwell (1970) y es la herramienta comúnmente utilizada en la delimitación de los taxones a todos los niveles, siendo su característica distintiva la utilización de diversas técnicas, tanto moleculares como fenotípicas, que permitan llevar a cabo dicha delimitación.

El análisis y la identificación de los microorganismos han experimentado un notable avance en los últimos años, gracias al desarrollo de técnicas de biología molecular. Aunque las pruebas bioquímicas siguen siendo muy importantes en la identificación de los microorganismos, en los últimos años se han desarrollado numerosos métodos moleculares que permitan conocer a fondo la microbiología de diferentes ambientes (Escalante, 2007; Lister, 2009). Sin embargo, a pesar de la gran variedad de metodologías, no existe una técnica que por sí sola permita conocer la diversidad microbiana completa de un ecosistema. Por ello, es necesario combinar varias metodologías incluyendo las técnicas de información fenotípica, genotípica y filogenética (Bécquer, 2004; Escalante, 2007). Uno de los primeros genes utilizados como marcador molecular y que ha sido ampliamente analizados para hacer construcciones filogenéticas es el gen *rrs* que codifica para el RNA ribosomal 16S en procariotas, que constituye la subunidad genética de los ribosomas (Normand *et al.*, 1991). Su secuencia nucleotídica presenta una estructura de mosaico en donde existen regiones muy conservadas y otras variables que son útiles para establecer relaciones filogenéticas de amplio rango.

El gen *rrs* es un buen marcador molecular para construir filogenias de linajes a nivel dominio, división y subdivisión y quizás la resolución pueda llegar a nivel de género en la mayoría de los casos; pero a nivel de especie, no es suficientemente resolutivo debido al alto grado de conservación que existe entre algunas especies como en los rizobia (Molouba *et al.*, 1999, Fox *et al.*, 1992; Willems y Collins, 1992). También existen técnicas basadas en la utilización de regiones que aparecen repetidas en el genoma bacteriano como lo son: REP-PCR (PCR sobre elementos palindrómicos extragenómicos repetidos), ERIC-PCR (PCR sobre elementos consenso intergenómicos repetidos de enterobacterias) y BOX-PCR (PCR sobre elementos box). Mediante estas técnicas se obtienen perfiles tras someter el producto de PCR a una electroforesis en gel de agarosa. Esto nos permite distinguir entre cepas y deducir sus relaciones filogenéticas (Versalovic *et al.*, 1994; Schneider y de Bruijn, 1996; Chen *et al.*, 2000).

Por otra parte, considerando las incongruencias filogenéticas reportadas entre los genes que constituyen parte del genoma básico (*rrs*, *atpD*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *glnA* y *glnII*) y los genes simbióticos que forman parte del paquete genético flexible (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD* y *nifH*), así como la existencia de fondos genéticos no simbióticos, para la reconstrucción de la filogenia de los rizobia debe considerar tres criterios que incluyan: genes cromosomales comunes del genoma básico, genes involucrados en la fijación de nitrógeno y genes de la nodulación que son buenos marcadores de la coevolución de los Rizobia con su hospedero, así como de su origen biogeográfico (Sarita *et al.*, 2005).

### 3. ANTECEDENTES

Hasta hace un poco más de una década, las especies descritas como capaces de nodular leguminosas, pertenecían a la clase de la  $\alpha$ -proteobacteria. Sin embargo, en el año 2001, se hizo la descripción por primera vez de bacterias pertenecientes a la clase  $\beta$ -proteobacteria como capaces de nodular leguminosas. El primer género descrito como nodulante de leguminosas perteneciente a la clase  $\beta$ -proteobacteria fue el género *Burkholderia*, con la descripción de dos especies, *B. phymatum* y *B. tuberum* (Moulin *et al.* 2001; Vandamme *et al.*, 2002). En ese mismo año se describió la capacidad de nodulación de otra  $\beta$ -proteobacteria, *Ralstonia taiwanensis* (ahora descrita como *Cupriavidus taiwanensis*) (Chen *et al.*, 2001); cambiando el panorama con respecto a la diversidad de microorganismos capaces de nodular leguminosas.

A partir de que las  $\beta$ -proteobacterias se describieron como nodulantes de leguminosas, varios estudios relacionados con la diversidad de este grupo se han llevado a cabo, en particular aquellos correspondientes a la diversidad genética de estas poblaciones y a la gran especificidad microorganismo-planta que se desarrolla en esta interacción; además de la amplia distribución de esta asociación en la naturaleza (Chen *et al.*, 2003).

Como algunos ejemplos de los estudios que se han llevado a cabo, tenemos los trabajos relacionados con el género *Cupriavidus*, que fue encontrado nodulando especies de *Mimosa* en la India, Filipinas y China (Verma *et al.*, 2004; Andrus *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012). Otro estudio demuestra la prevalencia de especies del género *Burkholderia* en cuatro especies de Leguminosas mimosoides en Panamá (Barret y Parker, 2005). En adición se han encontrado representantes de las  $\beta$ -proteobacterias nodulando *Mimosa* en Costa Rica, Puerto Rico, y Texas (Barrett y Parker, 2006; Andam *et al.*, 2007).

Las especies: *Cupriavidus taiwanensis*, *Burkholderia phymatum*, *Burkholderia mimosarum*, *Burkholderia nodosa* y *Burkholderia sabiae* se han aislado a partir de nódulos de plantas del género *Mimosa*, mostrando una especificidad muy alta en cuanto a su hospedero. La nodulación por *Burkholderia* y *Cupriavidus* ha sido confirmada en varios estudios. Sin embargo, estas bacterias han sido encontrados principalmente asociadas a diferentes especies de mimosas, y todas las nuevas especies descritas dentro de las  $\beta$ -rizobia, con excepción de *B. tuberum* (Elliott *et al.*, 2007b; Kock, 2004), ya sea que han sido aisladas o son capaces de nodular *Mimosa*. Por ejemplo, *C. taiwanensis* es frecuentemente aislada de nódulos de plantas de *M. pudica* y *M. diplotricha* en Taiwan (Chen *et al.*, 2001, 2003b, 2005a, 2005b), India (Verma *et al.*, 2004) y China (Liu *et al.*, 2011), y *Burkholderia* spp. Como *B. mimosarum* y *B. phymatum* son con frecuencia aisladas de estas dos mismas especies de *Mimosa*, así como de una tercera especie, *M. pigra*, la cual es considerada una especie agresiva-invasiva del sur de Asia (Chen *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2011) y Australia (Parker *et al.*, 2007), está catalogada en el "top ten" de las plantas invasivas del mundo debido a que desplaza a las especies nativas (Lowe *et al.*, 2000).

Estudios moleculares basados en análisis de secuencias de los genes *rrs*, *nifH* y *nodA* sugieren que las cepas que nodulan a estas plantas en ambientes no naturales son muy similares a las que lo hacen en su ambiente natural. Por ejemplo, *B. mimosarum* nodula *M. pigra* tanto en Sudamérica como en Taiwan (Chen *et al.*, 2005a, 2005b), así como también en Australia, donde aislados de *M. pigra* son genéticamente muy similares a las cepas aisladas de su sitio de origen (Parker *et al.*, 2007).

Revisiones sobre los hallazgos más recientes respecto a esta relación se pueden verificar en el escrito de Bontemps y colaboradores (2010) y también otro realizado en Brasil donde el género *Mimosa* ha evolucionado y diversificado en más de 200 especies

## 4. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias, pertenecientes a la subclase  $\beta$ -rizobia presentan una especificidad muy marcada con plantas leguminosas pertenecientes al grupo de las mimosas. Las  $\beta$ -rizobia son simbioses de leguminosas altamente efectivos, y han co-evolucionado con su planta huésped por más de 50 millones de años, con su principal centro de diversificación en Sudamérica, Sudáfrica, y Australia. Solo ha pasado poco más de una década desde que su existencia fue puesta en evidencia, por lo que aún queda mucho por aprender sobre su genética, taxonomía y factores geográficos que regulan esa preferencia de algunas leguminosas para ser noduladas principalmente por  $\beta$ -rizobia, así como las diferencias que pudieran presentarse a nivel de genes simbióticos y que pudieran marcar diferencias en la forma en que estas bacterias interactúan con su huésped

A pesar que las  $\beta$ -rizobia se asocian particularmente con el género *Mimosa*, y géneros relacionados (plantas mimosoides), estas pueden también nodular leguminosas papilionoides de importancia como *Phaseolus vulgaris* y *Cyclopia* spp, con lo que surge la posibilidad de ser utilizadas como inoculantes agrícolas con características particulares (por ejemplo, tolerancia a pH extremo, tolerancia a salinidad, etc). Igualmente se ha reportado que el aporte de nitrógeno de estas bacterias a la planta es muy alto, cercano al 60% con lo cual surge la posibilidad de ser utilizada como inoculantes agrícolas (Gyaneshwar *et al.*, 2011). Sin embargo, antes del desarrollo de inoculantes es necesario conocer si su relación con patógenos tanto humanos, como de animales y de plantas, pudiera causar problemas para su uso en agricultura, además de la efectiva capacidad de nodulación en plantas de interés agrícola.

La creciente diversidad encontrada dentro del grupo  $\beta$ -rizobia asociadas a leguminosas mimosoides, los factores tanto genéticos como ambientales que pudieran intervenir en especificidad de esta interacción, así como la posibilidad de ser utilizadas como inoculantes con fines agrícolas y la falta de estudios de estas interacciones en nuestro país, justifica el llevar a cabo un estudio a profundidad de estas asociaciones simbióticas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- Analizar la diversidad molecular de  $\beta$ -rizobia nodulantes de *Mimosa* sp. en México.

### 5.2 Objetivos específicos

- Establecer una colección de bacterias simbióticas nodulantes provenientes de leguminosas mimosoides de los estados de Puebla y Veracruz.
- Analizar la capacidad de nodulación de las cepas en *Macrotillium atropurpureum* mediante un ensayo en nivel invernadero.
- Analizar la diversidad molecular de las cepas mediante las técnicas de REP-PCR y ARDRA.
- Identificar de las cepas a nivel de género mediante el análisis de las secuencias del gen *rrs*.
- Corroborar la capacidad de nodulación en la planta de origen y probar la capacidad de nodular la planta de interés económico *Phaseolus vulgaris* variedad Jamapa.
- Llevar a cabo el análisis del gen de mantenimiento *gyrB* de las cepas nodulantes que pertenezcan a la clase  $\beta$ -proteobacteria, nucleotídicas.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Muestreo

Se colectaron nódulos a partir de las raíces de Leguminosas mimosoides en diferentes localidades en los estados de Puebla (Tepenene Tepexi y Tonahuixtla) y Veracruz en los

poblados de Nogales, La Tinaja y Paso del Toro (figura 5). Los nódulos se recolectaron y almacenaron secos, en tubos con silicagel, hasta su utilización. La búsqueda se llevó a cabo con la ayuda del Biólogo José Luis Contreras (Ecomuseo de Metepec-BUAP), quien se encargó de llevar a cabo la identificación de las especies tanto a nivel de campo, como a nivel taxonómico. Igualmente se colectaron muestras de suelo y semillas para posteriores estudios.



Figura 5. Ubicación geográfica de los muestreos realizados en los estados de Puebla y Veracruz.

## 6.2 Aislamiento

El aislamiento de las cepas inicio con la hidratación de los nódulos en agua destilada estéril durante 30 min y esterilización superficial por inmersión en  $H_2O_2$  al (70%) por 10 minutos. Posteriormente, los nódulos fueron enjuagados 5 veces en agua destilada estéril y triturados en una gota de agua estéril con ayuda de una punta de micro pipeta,

y la suspensión se sembró en Agar levadura manitol (YMA) (Munive, 2002) (anexo 1). Las colonias se incubaron a 28 °C en condiciones aerobias. Las colonias fueron purificadas por resiembra, verificando al microscopio la pureza de los cultivos

### **6.3 Prueba de nodulación en *Macropitium atropurpureum***

Los ensayos de nodulación *in vitro* se realizaron utilizando la leguminosa *Macropitium atropurpureum* (siratro) como planta huésped. Esta ha sido utilizada ampliamente como planta modelo en los estudios de nodulación debido a su alta promiscuidad con casi todos los géneros de Rizobias (Ezura *et al.*, 2000). Para la escarificación de las semillas, se mantuvieron en etanol al 70 % durante cinco minutos y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril. Se sometieron a un tratamiento con ácido sulfúrico concentrado durante 10 min y luego fueron sumergidas en hipoclorito de sodio al 25 % (v/v) durante 15 minutos, para finalmente ser lavadas varias veces con agua destilada estéril. Una vez finalizada la etapa de escarificación, las semillas se colocaron en placas con Agar-Agua (0.75 %) (m/v) e incubadas a 28°C en la oscuridad durante 24 h. Las semillas con raíces emergentes (hipocotilo-radícula de 2-3 cm) se colocaron en tubos de 200 mL (5,5 cm de diámetro y 12,0 cm de altura) con 50 mL de medio Jensen (anexo 2), a razón de una semilla por tubo. Tres días después, la inoculación de las raíces de las plantas directamente de una colonia de la placa con la ayuda de un asa bacteriológica. La prueba se llevó a cabo por triplicado con el uso de 3 controles negativos. Las plantas inoculadas al igual que los controles negativos se mantuvieron en condiciones controladas, con un foto-período de 16 h luz/8 h oscuridad, a una temperatura día/noche de 26/22 °C y humedad relativa del 70 % durante 25-30 días.

### **6.4 Amplificación de repetidos palindromicos extragénicos REP-PCR**

Esta técnica de PCR amplifica las regiones repetidas palindrómicas (REP) en el genoma bacteriano. Se amplificaron los fragmentos delimitados por secuencias invertidas, utilizando los primers Rep1 (5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3') y Rep 2 (5'-ICG ICT TTA TCI GGC TAC-3') (Versalovic *et al.*, 1994). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el Kit PCR MASTER MIX marca Promega, un volumen total de 25 µL, conteniendo 1.25 µL a 20 pM de cada uno de los primers, 12.5 µL de Master mix 2X (50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suplementada con buffer proporcionado (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>) 9 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Los productos de la reacción se separaron y visualizaron en geles de agarosa al 2 % por 2.5 h a 70 mV teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), observados y registrados a

través de un transiluminador luz UV (anexo 1). Los tiempos y temperaturas de amplificación fueron las que se indican en la figura 6.

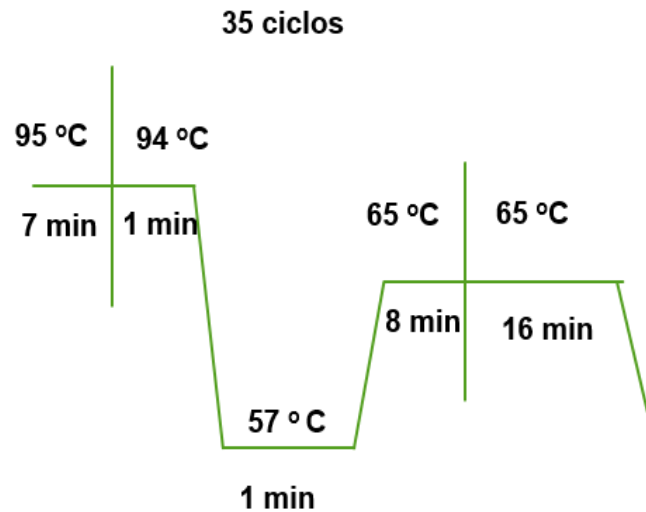


Figura 6. Perfil de temperaturas para la amplificación de repetidos palindromicos extragenicos.

## 6.5 Amplificación del gen *rrs*

Con el fin de identificar a nivel de género a los aislados obtenidos, se amplificó y secuenció el gen *rrs* (anexo 3.2). La extracción del DNA se llevó a cabo utilizando el kit (WizardGenomic DNA purification kit), la amplificación se realizó utilizando los primers universales UN27F 5'-TAGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3' and UN1392R 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3' (Biodiversa Inc., México). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el Kit PCR MASTER MIX marca Promega, un volumen total de 25  $\mu$ L, conteniendo 1.25  $\mu$ L a 20 pM de cada uno de los primers, 12.5  $\mu$ L de Master mix 2X (50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suplementada con buffer proporcionado (pH 8.5), 400 $\mu$ M dATP, 400 $\mu$ M dGTP, 400 $\mu$ M dCTP, 400 $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>) 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Los pesos de los productos de la amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1% por 30 minutos a 10 mV teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) y registrados a través de un transiluminador luz UV. Una vez corroborado el peso los productos se purificaron por medio del kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, según las instrucciones del fabricante. Los amplificados se enviaron a secuenciar a la unidad de secuenciación capilar de servicios genómicos Langebio, Cinvestav-campus Irapuato, las condiciones de amplificación se muestran en la figura 7.

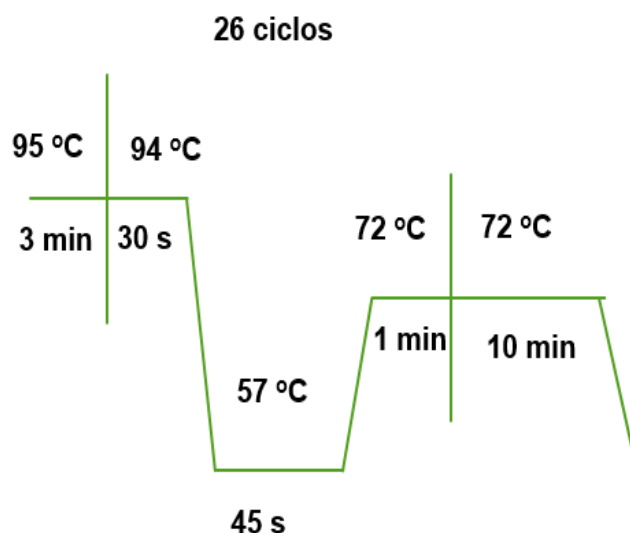


Figura 7. Perfil de temperaturas para la amplificación del gen *rrs*.

## 6.6 Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA)

El Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA) ha sido ampliamente utilizado en numerosos estudios de los rizobia. (Vanechoute et al., 1992; Laguerre et al., 1994, Selenska y Evguenieva 1995; Nick, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Para elaborar este análisis, se amplificó el gen 16SrDNA y posteriormente, se utilizó una mezcla de reacción en un volumen total de 20  $\mu$ L conteniendo 10  $\mu$ L del producto de PCR, 2  $\mu$ L de buffer 10X y 0.5  $\mu$ L de la enzima de restricción. Finalmente, se incubaron durante 1 noche a 37 °C. Las enzimas utilizadas en este estudio fueron: Cfo I, Hinf I y Nhe I, las cuales tienen sitios de reconocimiento palindrómicos de 4 bases (tabla 1). El producto de la digestión se separó y visualizo por electroforesis en geles de agarosa al 2% a 50 mV teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) observándose y registrándose en un sistema de documentación de imágenes equipado con transiluminador de luz UV (anexo 4).

| ENZIMA | SITIO DE RESTRICCIÓN                             | TEMPERATURA °C |
|--------|--|----------------|
| Cfo I  | 5'-GCG* <i>C</i> -3'<br>5'-C*CGC-3'              | 37 °C          |
| Hinf I | 5'-G* <i>A</i> NTC-3'<br>5'-CTNA* <i>G</i> -3'   | 37 °C          |
| Nde II | 5'-CA* <i>T</i> ACG-3'<br>5'-GCAT* <i>A</i> C-3' | 37°C           |

Tabla 1. Enzimas, sitios de corte y condiciones utilizadas para el ARDRA.

## 6.7 Amplificación del gen *gyrB*

Para poder identificar la especie a la que pertenecen las cepas empleadas en este estudio se llevó a cabo el análisis amplificando fragmentos del gen housekeeping (*gyrB*), con los cebadores: *gyrB1F* (GACAACGGCCGCGGSATTCC) y *gyrB2R* (CACGCCGTTGTTTCAGGAA SG) (Lineda *et al.*, 2007). La extracción de ADN se realizó utilizando el kit “WizardGenomic DNA Purification Kit” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el Kit PCR MASTER MIX marca Promega, en un volumen total de 25  $\mu$ L, conteniendo 1.25  $\mu$ L a 20 pM de cada uno de los primers, 12.5  $\mu$ L de Master mix 2X (50 unidades/ml de Taq DNA polimerasa suplementada con buffer proporcionado (pH 8.5), 400 $\mu$ M dATP, 400 $\mu$ M dGTP, 400 $\mu$ M dCTP, 400 $\mu$ M dTTP, 3mM MgCl<sub>2</sub>) y 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) con una concentración de 0.5 mg/mL. Los productos correspondientes a los pesos esperados (anexo 3.3) de la amplificación fueron purificados utilizando el kit ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la amplificación del fragmento de dicho gen, se usaron los tiempos y temperaturas que indica la figura 8.

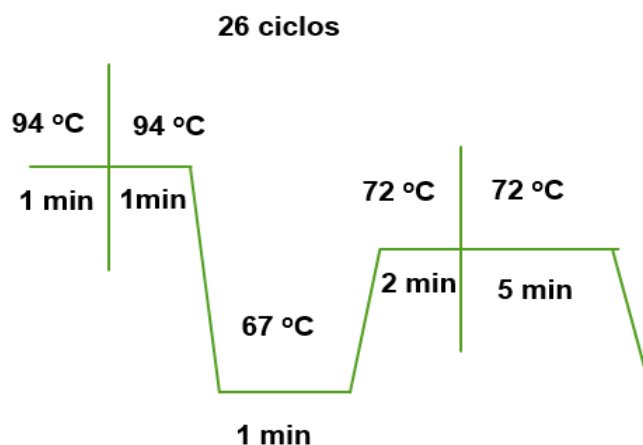


Figura 8. Perfil de temperaturas para la amplificación del gen *gyrB*.

## 6.8 Alineamiento y manipulación de secuencias nucleotídicas

El empalme de las secuencias, tanto *forward* como *reverse*, se llevaron a cabo mediante el programa BioeditSequenceAlignment Editor, versión 7.0.8.0. Y para el manejo de las secuencias en formato “fasta” se utilizó un editor de texto. Se compararon cada una de las secuencias con las reportadas en la base de datos del National Center

forBiotechnologyInformation (NCBI) para comprobar que efectivamente las secuencias obtenidas pertenecen al gen de interés.

Las secuencias se alinearon mediante el programa CLUSTALX versión 2.0.10. Y los archivos de alineamiento (\*.aln) se importaron con el programa GeneDoc versión 2.7.000 para poder manipular las secuencias. Después de esto, los archivos exportados desde GeneDoc (\*.aa) se manipularon con el programa DNAsp versión 5.1 para con ello producir los archivos con formato MEGA (\*.meg) los cuales posteriormente fueron procesados con el programa MEGA versión 6.0, el cual nos permite llevar a cabo el análisis filogenético al generar los dendrogramas con base en algoritmos diferentes: MaximumLikelihood y NeighborJoining con un análisis de confianza (bootstrap) para cada árbol filogenético de 1000 y 2000 “remuestreos” respectivamente.

Se analizaron los 2 genes *rrs* y *gyrB* de manera conjunta en un árbol concatenado, el cual contiene las 2 secuencias unidas para obtener mayor resolución. Para producir este tipo de árboles, las secuencias se manejaron del mismo modo que las anteriores excepto que, con el programa dnaSP se produjo el archivo concatenado

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1 Material biológico obtenido

Se obtuvieron un total de 32 cepas a partir del muestreo, que se sometieron a prueba de nodulación en *M. atropurpureum*, esta planta es de amplio rango de hospedero, por la cual se ha utilizado como planta huésped para las rizobias nodulantes de leguminosas.

A los 12 días después de la inoculación se empezaron a visualizar la formación de protuberancias en las raíces de algunos individuos experimentales hasta convertirse en nódulos. 20 de las 32 cepas obtenidas fueron capaces de nodular esta planta. Se presentaron nódulos determinados característicos de esta planta, este tipo de nódulos es inducido en plantas como las de los géneros *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*, entre otros. En esta clase de nódulos no hay un meristemo permanente. Así, su crecimiento se basa principalmente en la expansión y no en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica (Hirsch A.M., 1992).

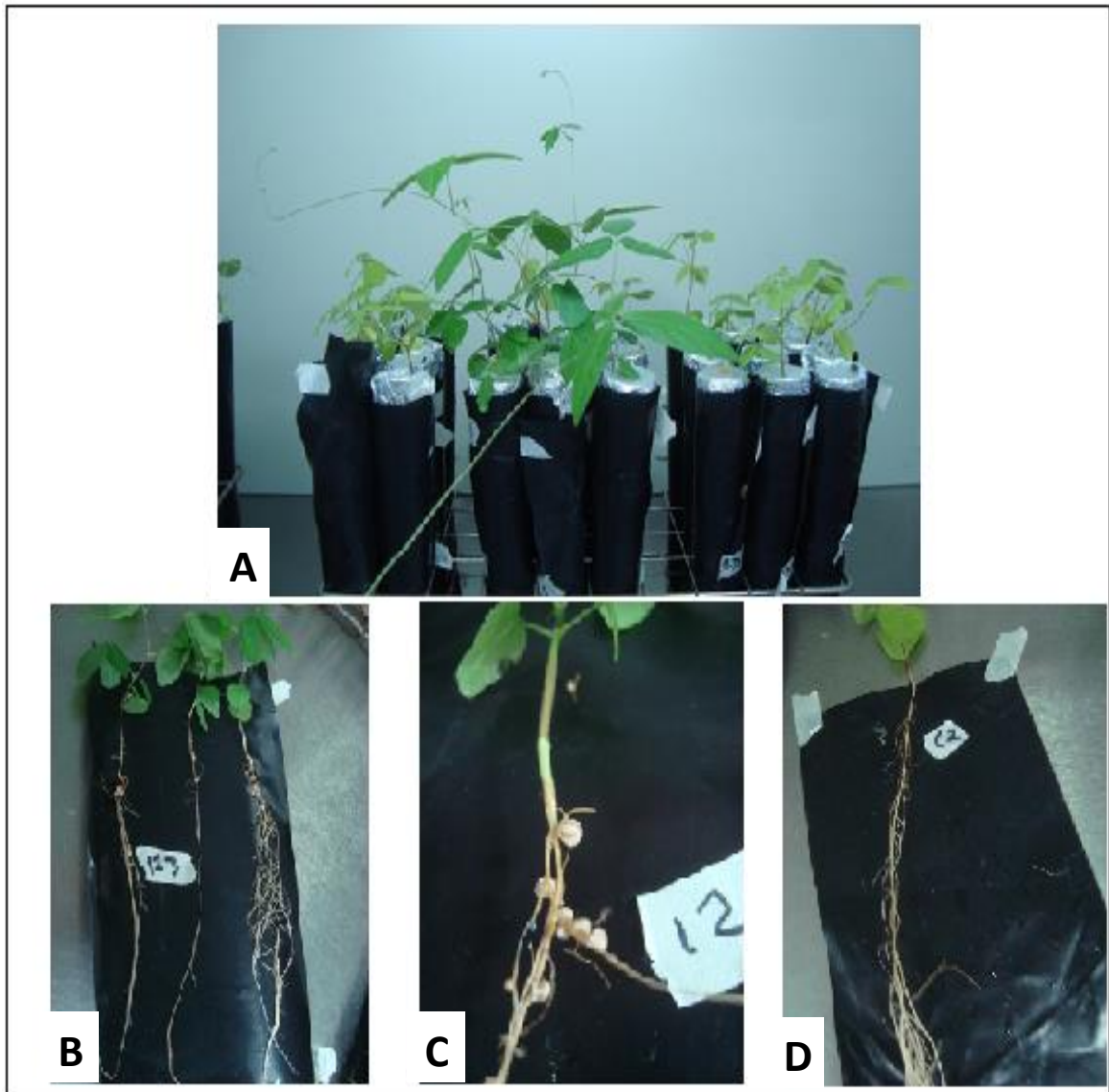


Figura 9. Prueba de nodulacionen *M. atropurpureum*. A) apariencia de plantas no noduladas, noduladas y controles negativos. B) grupo experimental positivo.C) Nodulos. D) control negativo sin nodulos.

Los controles negativos así como las plantas inoculadas que no presentaron nódulos, mostraron coloración amarillenta en las hojas que puede indicar falta de nitrógeno (medio sin nitrógeno). Estas plantas amarillentas sin nódulos, murieron entre los días 20-24 en comparación con los individuos nodulados que sobrevivieron hasta el final del experimento (día30). Los aislados capaces de nodular se etiquetaron y se congelaron a -80 °C en medio YM (mismo medio sin agar) adicionado con 20 % de glicerol para conservación para posteriores estudios. En la tabla 2 se muestran las cepas obtenidas, plantas muestreadas y su procedencia.

| LOCALIDAD   | ESPECIE (PLANTA)           | CEPAS  |
|---|----------------------------|--------|
| Cañon del Río Blanco, autopista México-Veracruz. Ver. | <i>Mimosa albida</i>       | LEM701 |
|   | <i>Mimosa acapulcensis</i> | LEM702 |
|   |                            | LEM703 |
|   |                            | LEM704 |
| Carretera libre Cordoba-Boca del Río.Ver.             | <i>Mimosa pudica</i>       | LEM705 |
|   |                            | LEM706 |
|   |                            | LEM707 |
|   |                            | LEM708 |
|   |                            | LEM709 |
|   |                            | LEM710 |
| Paso del Toro, carretera libre Cordoba-Boca del Río   | <i>Mimosa pudica</i>       | LEM711 |
|   |                            | LEM712 |
|   |                            | LEM713 |
|   |                            | LEM714 |
|   |                            | LEM715 |
| Tonahuiztla Pue.                                      | <i>Mimosa lacerata</i>     | LEM716 |
| Tepexi de rodriguez Pue.                              | <i>Mimosa luisana</i>      | LEM717 |
|   |                            | LEM718 |
| Tepenene Pue  | <i>Acacia sheffneri</i>    | LEM719 |
|   |                            | LEM720 |

Tabla 2. Especie de planta y lugar de procedencia de los aislados.

Las bacterias que se aislaron tuvieron diferentes características al ser propagadas en placas con medio YMA, sin embargo los aislados presentan la morfologías típicas (visibles al microscopio), de las bacterias rizobias reportadas con anterioridad. De acuerdo a esto los obtenidos aislados se pueden agrupar en 3 grupos;

- a) Colonias grandes mucoides blancas de crecimiento rápido (12-24 hrs).
- b) Colonias mucoides pequeñas con bordes definidos color blanco, de crecimiento medio (24-36 hrs).
- c) Colonias secas, pequeñas, ámbar, con bordes definidos con efecto tornasol a contra luz y de crecimiento medio (24-36 hrs).

## 7.2 REP-PCR Y ARDRA

Las restricciones enzimáticas se visualizaron en geles de agarosa y se analizaron (Tabla 3).

| CEPA   | Cfol | Ndell | Hinfl | REP-PCR | CODIGO  |
|--------|------|-------|-------|---------|---------|
| LEM701 | C1   | N1    | H1    | a       | C1N1H1a |
| LEM702 | C2   | N2    | H2    | b       | C2N2H2b |
| LEM703 | C2   | N2    | H2    | c       | C2N2H2c |
| LEM704 | C2   | N3    | H2    | d       | C2N3H2d |
| LEM705 | C5   | N4    | H3    | o       | C5N4H3ñ |
| LEM706 | C7   | N2    | H1    | p       | C7N2H1o |
| LEM707 | C3   | N4    | H3    | e       | C3N4H3e |
| LEM708 | C4   | N5    | H1    | f       | C4N5H1f |
| LEM709 | C3   | N6    | H3    | g       | C3N6H3g |
| LEM710 | C4   | N5    | H1    | h       | C4N5H1h |
| LEM711 | C5   | N6    | H4    | i       | C5N6H4i |
| LEM712 | C8   | N2    | H6    | q       | C8N2H6p |
| LEM713 | C8   | N9    | H6    | r       | C8N9H6q |
| LEM714 | C3   | N7    | H3    | j       | C3N7H3j |
| LEM715 | C3   | N7    | H3    | k       | C3N7H3k |
| LEM716 | C5   | N7    | H3    | l       | C5N7H3l |
| LEM717 | C5   | N7    | H3    | m       | C5N7H3m |
| LEM718 | C6   | N6    | H5    | n       | C6N6H5n |
| LEM719 | C7   | N2    | H1    | s       | C7N2H1r |
| LEM720 | C7   | N2    | H1    | t       | C7N2H1s |

Tabla 3. Nombres asignados a los diferentes perfiles obtenidos y código otorgado.

De la digestión enzimática con CfoI del gen *rrs* se obtuvieron 8 perfiles diferentes a los cuales se les asignó la letra inicial de la enzima y un número. De la digestión con la enzima NdeI se obtuvieron un total de 9 perfiles diferentes y 6 de la digestión con HinfI (anexo 3).

De la amplificación de las secuencias de repetidos extragénicos palindrómicos (REP-PCR), se obtuvieron un total de 20 perfiles diferentes (uno para cada cepa) y se asignó una letra minúscula para cada perfil como se observa en la tabla 1 y anexo 3.1. Los perfiles obtenidos tanto de las digestiones enzimáticas como de la REP-PCR se analizaron simultáneamente y se asignaron códigos dependiendo de los perfiles obtenidos.

Como se puede observar en la tabla cada código está sombreado con colores, para aquellos códigos sombreados con el mismo color significa que presentaron perfiles iguales con las digestiones enzimáticas, lo que indica que están relacionados a nivel del gen *rrs* (mismo género). Sin embargo los perfiles obtenidos por REP-PCR indican que se trata de 20 microorganismos diferentes a nivel de cepa ya que es un análisis a nivel de genoma. Se han hecho estudios donde se compararon REP-PCR con estudios de homología DNA-DNA, encontrando una alta correlación; esto sugiere que los análisis de los perfiles REP-PCR reflejan la relación entre la filogenia y el genotipo de los microorganismos estudiados (Rademaker *et al.* 2000).

### **7.3 Análisis del gen *rrs***

Se obtuvieron las secuencias del gen *rrs* (aproximadamente 1400 pares de bases) (anexo 5) para cada cepa aislada. Se construyó un árbol filogenético junto con secuencias relacionadas reportadas en el NCBI. Se construyeron árboles con los algoritmos NeighborJoining (NJ) (figura 10) y Maximum Likelihood (ML) (figura 11), los cuales nos muestran las relaciones y diferencias en cuanto a las relaciones filogenéticas de nuestras cepas de interés.

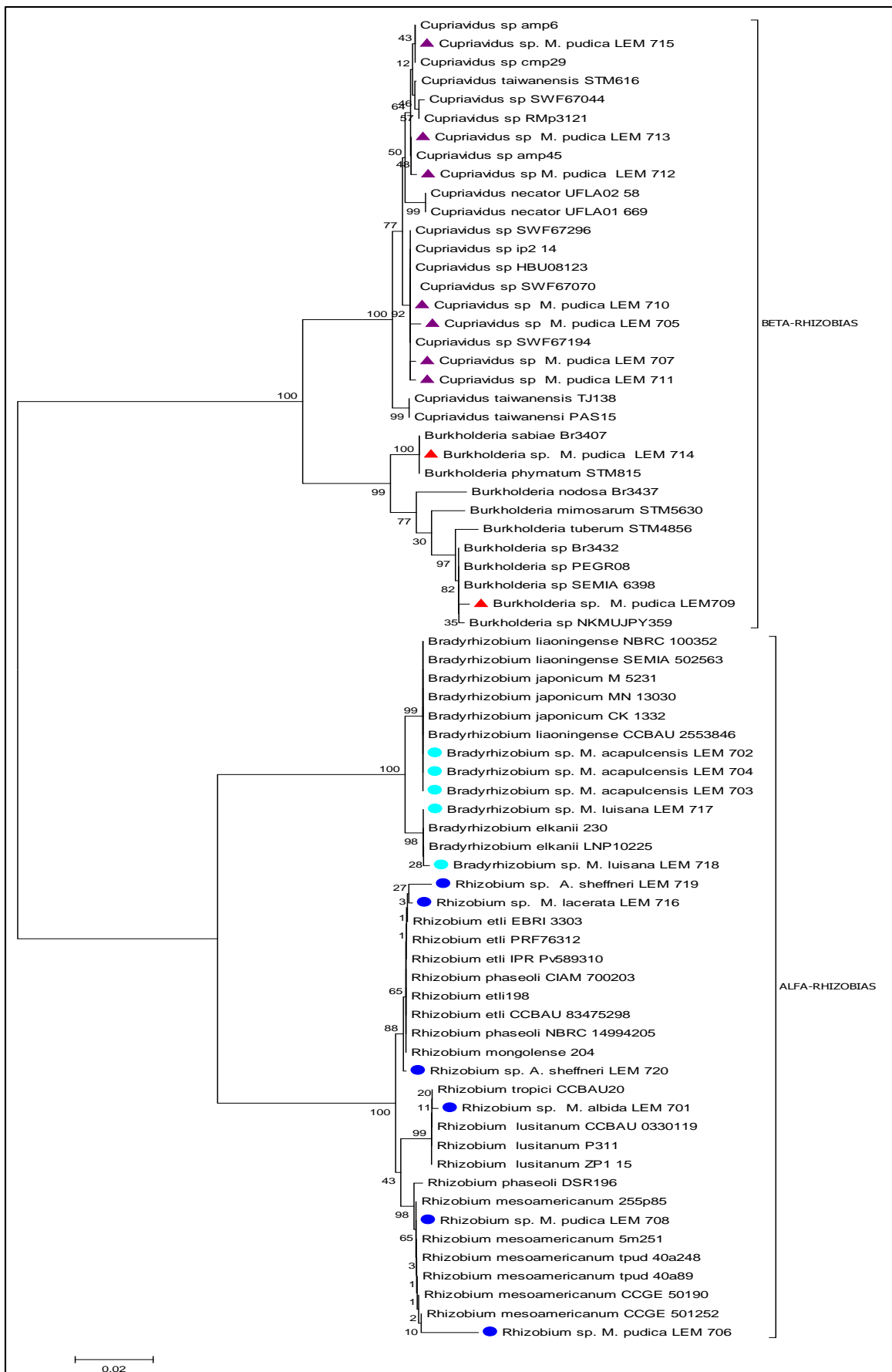


Figura 10. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor Joining para secuencias parciales del gen *rrs* (900 pb) de las cepas obtenidas de leguminosas mimosoides en México. Bootstrap: 2000

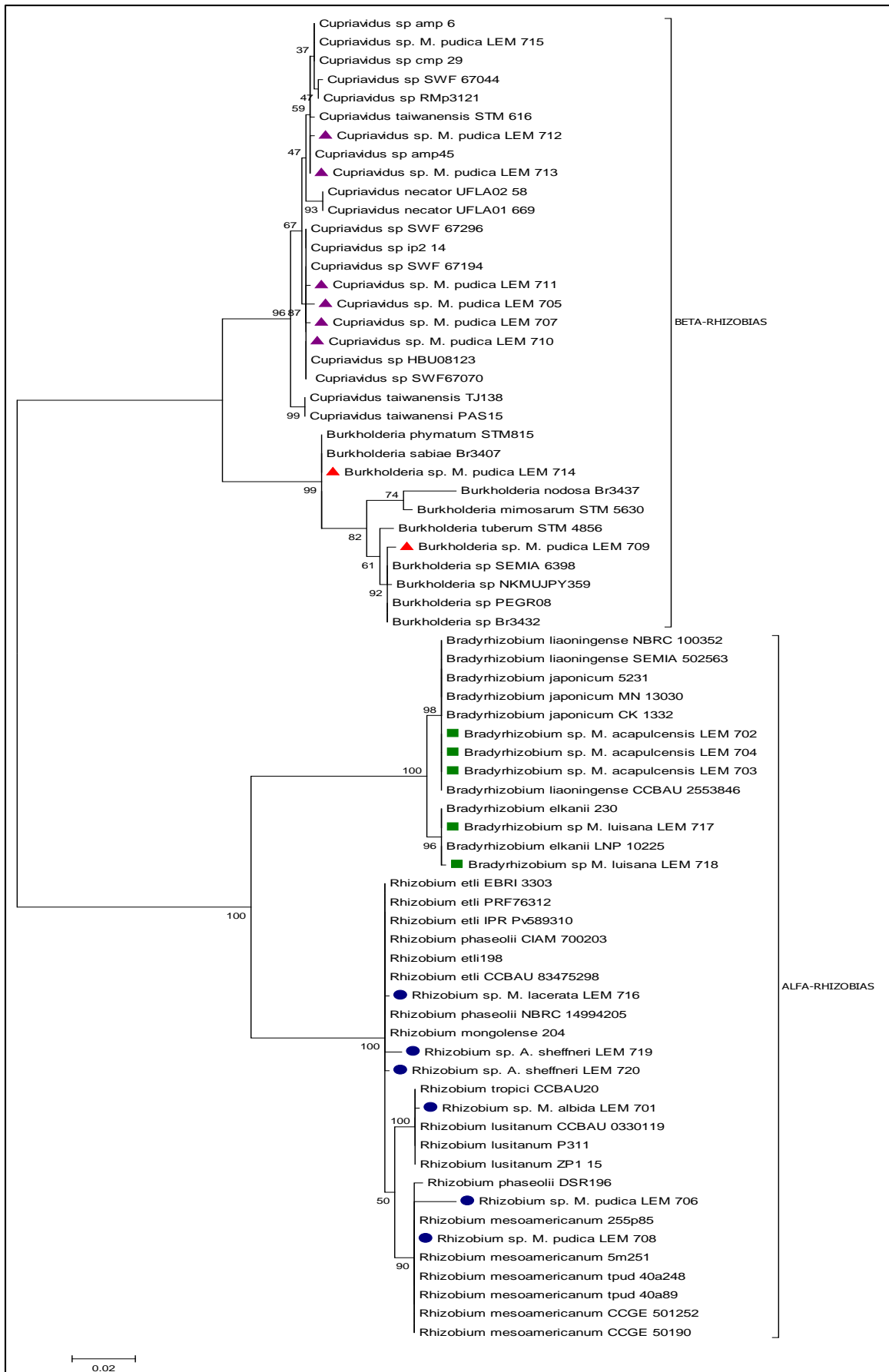


Figura 11. Árbol filogenético obtenido por el método Maximun Likelihood para secuencias parciales del gen *rrs* (900 pb) de las cepas obtenidas de leguminosas mimosoides en México. Bootstrap: 1000

Como se puede apreciar de acuerdo al análisis, las cepas se agrupan en 2 clases; alfa- y beta-proteobacteria.

Por el lado de las alfa-proteobacterias, 5 cepas pertenecen al género *Bradyrhizobium*, 3 de ellas (LEM702, LEM703 y LEM704) relacionadas cercanamente a las especies *B. japonicum* y *B. lianongense*, las cuales han sido aisladas en plantas de soya, *Trifolium Crotalaria* y *Mimosas* de regiones templadas y subtropicales de China (Liu *et al.*, 2007). Cabe mencionar que estas cepas fueron aisladas de la planta *M. acapulcensis*, en la localidad de Nogales Veracruz, que cuenta con clima subtropical y vegetación de Selva baja caducifolia y mediana caducifolia. Las otras 2 cepas (LEM717 y LEM 718) se aislaron de la especie *Mimosa luisana* en la región de Tepexi de Rodriguez el cual presenta un clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano y suelos de menos de 10 centímetros de espesor sobre roca o tepetate, no son aptos para cultivos de ningún tipo y se relacionaron cercanamente a la especie *B. elkanii* que se ha aislado también en soya.

Pertenecientes al género *Rhizobium* se obtuvieron 6 cepas: LEM701, LEM, 706, LEM708, LEM716, LEM719 y LEM720. La cepa LEM 701, que se relaciona cercanamente a la especie *R. lusitanum* se aisló de *M. albida* fue la única cepa que se pudo obtener de esta planta en Nogales Veracruz. La cepa LEM716 se relaciona con la especie *R. mesoamericanum* el cual se ha aislado de *Vigna unguiculata*, también fue la única cepa obtenida de la especie *M. lacerata* en la región de Tonahuixtla Puebla, el cual se presenta la transición de los climas secos muy cálidos de la Mixteca Baja. Las cepas LEM710 y LEM720 que se aislaron de *Acacia sheffneri*, se relacionan con las especies *R. etlii* y *R. mongolense*, las cuales han sido aisladas en *P. vulgaris* y *M. ruthenica* que también son, cultivos comunes en la zona del el muestreo. Las cepas 706 y 708 relacionadas a la especie *R. mesoamericanum* se aislaron de *M. púdica* en la zona 2 en Veracruz que presenta un clima tropical. Esto concuerda con lo encontrado en el estudio realizado en Costa rica donde se encontró la coexistencia de *Rhizobium*, *Burkholderia* y *Cupriavidus* como simbiontes de *M. pudica* (Barrett y Parker 2006).

Las cepas aisladas pertenecientes a las clase beta-proteobacteria fueron en total 9 y todas fueron aisladas en *M. púdica* en las localidades con clima tropical de La Tinaja y Paso del Toro Veracruz. De acuerdo a este análisis Las cepas se agrupan en dos géneros:

1.- *Burkholderia*. Se obtuvieron 2 cepas (LEM 709 y LEM 714) pertenecientes a este género, la primera de ellas se relaciona cercanamente con la especie *B. tuberum* la segunda con *B. phymatum*. Las especies nodulantes pertenecientes a este género se han aislado de especies de mimosas en climas tropicales principalmente *M. pudica* y *M. pigra* (Bontemps *et al.*, 2010). En estos estudios se ha encontrado una prevalencia sobre especies nodulantes de este género sobre *Rizobium* y alfa-proteobacterias.

2.- *Cupriavidus*. De este género se obtuvieron 7 cepas y se agrupan en 2 clusters; El grupo formado por las cepas LEM 712, LEM 713, LEM 715 y LEM 716 que a su vez se acerca a la especie *C. necátor*. Y el grupo formado por las cepas 707, 707, LEM 710 y LEM 711 forman una grupo que se relaciona con la especie *C. taiwanensis*. El alcance

del análisis para estas bacterias fue muy ambiguo y lo muestran los valores de bootstrap muy bajos. Lo que concuerda con estudios anteriores en este género con secuencias de este gen (Lineda *et al.*, 2007).

En las muestras obtenidas de *M. púdica*, que es hospedera tanto de  $\alpha$ -rizobia como de  $\beta$ -rizobia, también se observa una marcada prevalencia de bacterias pertenecientes a la clase  $\beta$ . Sin embargo, el número de plantas muestreadas en este estudio no permite hacer una estimación precisa sobre esta preferencia.

Por otro lado tampoco se puede decir que contradice lo observado en China, donde la proporción de nódulos que contienen cada género de  $\beta$ -rizobias varió entre las especies *Mimosa*; con *Cupriavidus* siendo predominante en nódulos *M. diplotricha* (63,3% frente a 36,7% de ocupación con *Burkholderia*), pero con *M. púdica* mostrando una ligera preferencia por *Burkholderia* sobre *Cupriavidus*, ocupando el 56,5% y el 43,5% de los nódulos, respectivamente (Liu *et al.*, 2012). Liu y colaboradores explican esta preferencia debido a las condiciones de los suelos donde fueron encontradas las bacterias.

En este estudio esa preferencia también se puede explicar por las condiciones en que se encuentra el suelo del muestreo, localidad de La Tinaja Veracruz por ejemplo, son terrenos de cultivo erosionados y abandonados, donde la presencia de metales pesados y compuestos tóxicos es alta debido al excesivo uso de los fertilizantes industriales y riego indebido (Landeros *et al.*, 2002).

Por su parte la localidad de Paso del Toro Veracruz, son potreros inundables en la temporada de lluvias con el río y desechos de las poblaciones aledañas. Por esta razón, es posible que esta mayoría que presenta *Cupriavidus* sobre *Burkholderia* y *Rhizobium* sea debido a sus versátiles capacidades metabólicas.

Se realizó un análisis independiente con secuencias parciales del gen *rrs* de cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* y de todas las especies descritas de este género, en el cual por el método NJ se forman 2 grupos uno formado por las cepas LEM 712, LEM 713 y LEM 715 que se relaciona con la especie *C. oxalaticus*. El otro grupo formado por LEM 705, LEM 707, LEM 710 y LEM 711 se relaciona con la especie *C. alkaliphilus* (figuras 12 Y 13).

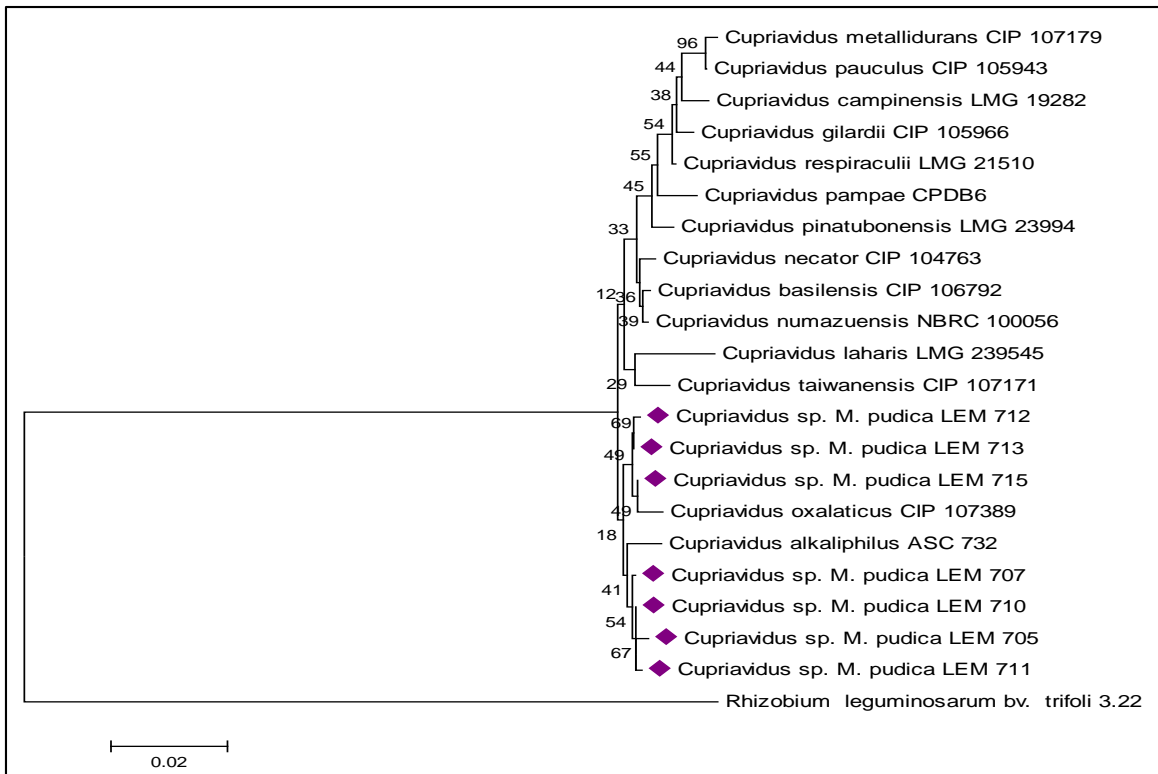


Figura 12. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor joining para secuencias parciales del gen *rrs* de las cepas del género *Cupriavidus* (900 pb). Bootstrap: 2000

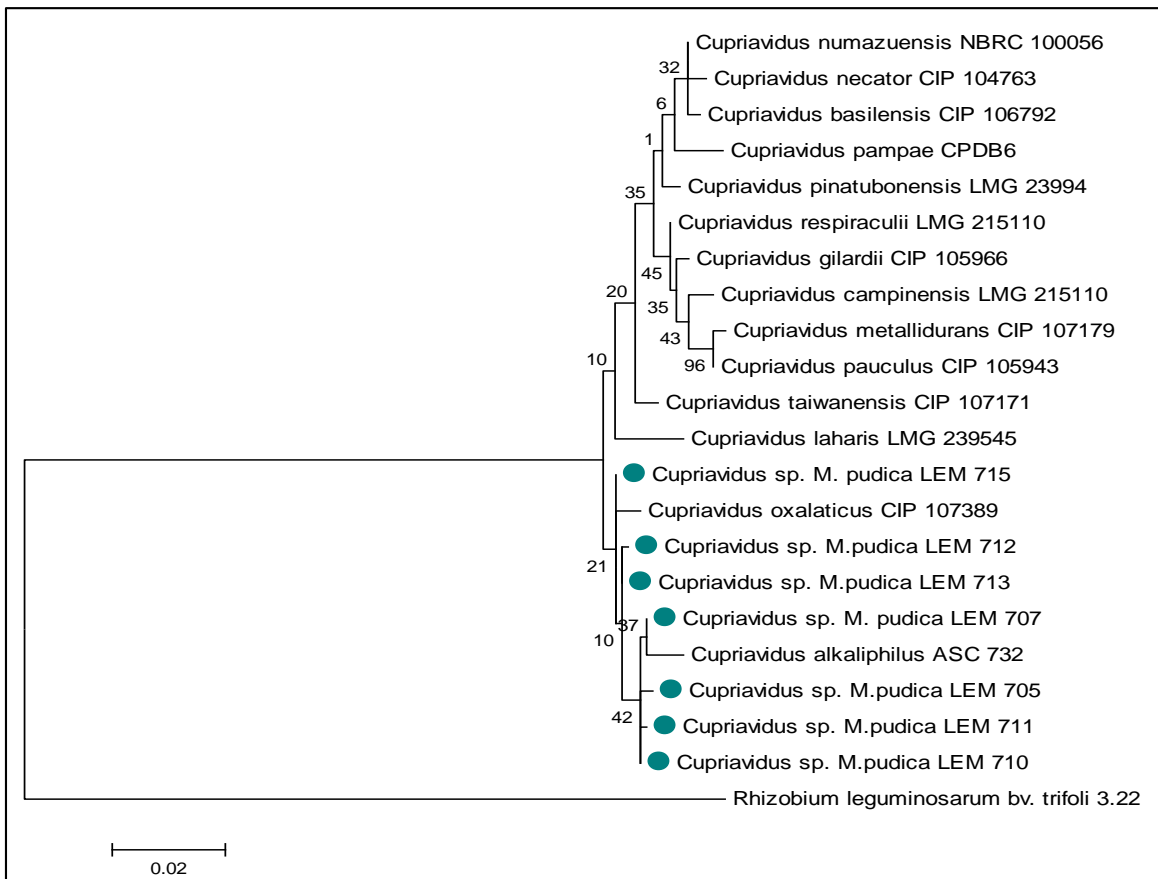


Figura 13. Árbol filogenético obtenido por el método Maximun Likelihood para secuencias parciales del gen *rrs* de las cepas del género *Cupriavidus*. (900 pb). Bootstrap: 1000

## 7.4 Prueba de nodulación en *Mimosa pudica*

Se seleccionaron las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* para corroborar la capacidad de nodular la planta de origen. A los 13 días después de la inoculación se empezaron a visualizar la formación de nódulos en las raíces de algunos individuos (figura 14). Todas las cepas obtenidas pertenecientes al género *Cupriavidus*, fueron capaces de nodular esta *M. pudica*. Se presentaron nódulos indeterminados característicos de esta planta, (Hirsch 1992). Los controles negativos no presentaron nódulos, mostraron coloración amarillenta en las hojas que puede indicar falta de nitrógeno. Estas plantas amarillentas sin nódulos, murieron entre los días 20-24 en comparación con los individuos nodulados que sobrevivieron hasta el final del experimento.

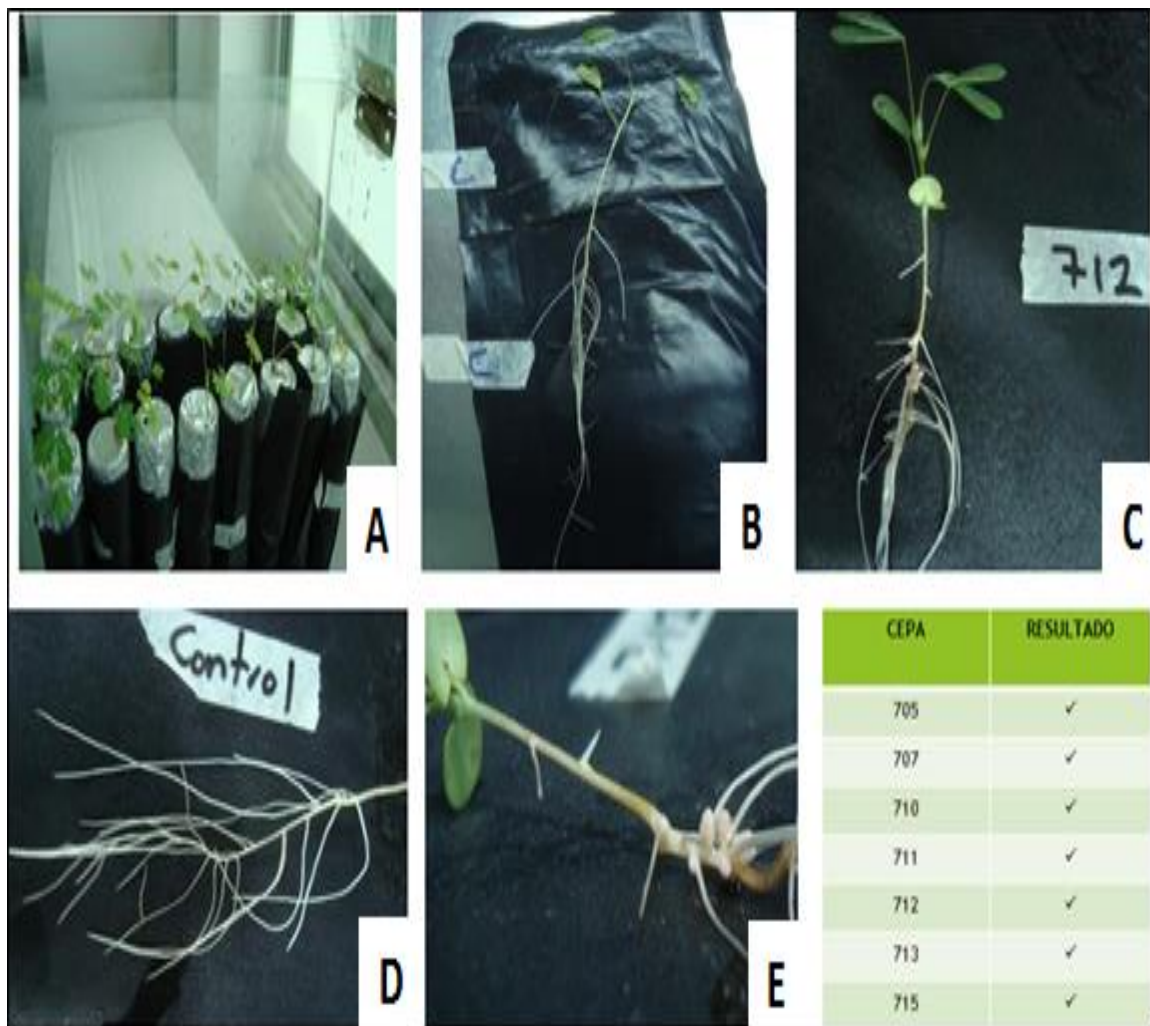


Figura 14. Prueba de nodulación en *M. pudica*. A) apariencia de plantas noduladas no noduladas, y controles negativos. B) control negativo sin nodulos.C) Planta experimental positiva D) raíz sin nodulos E) raíz con nodulos.

## 7.5 Prueba de nodulación en *Phaseolus vulgaris*

Por parte de esta prueba se observó que entre los días 12-15 después de la inoculación, empezaron a surgir nódulos en las raíces de algunos individuos. Todas las cepas obtenidas pertenecientes al género *Cupriavidus* excepto la cepa 707, fueron capaces de nodular *P. vulgaris* en condiciones de laboratorio (Figura 15). Esta falta de capacidad para nodular puede deberse a mutaciones en los genes involucrados en la síntesis de los factores NOD como la presencia de grupos adicionales mayormente en los extremos del oligosacárido de quitina, el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor, y la longitud del esqueleto de oligosacárido (Figura 3). Estas variaciones son los determinantes mayores de la especificidad de hospedador. Un ejemplo bien estudiado de modificación que determina el rango de hospedador es el grupo sulfato de los factores de nodulación de *S. meliloti*. Las cepas mutantes en *nodH*, *nodPQ* de *S. meliloti* que producen factores Nod sin el grupo sulfato ya no son capaces de nodular en alfalfa (Roche *et al.*, 1991).

Los controles negativos de igual manera que en los experimentos de nodulación anteriores no presentaron nódulos, y mostraron coloración amarillenta en las hojas que puede indicar falta de nitrógeno. Estas plantas amarillentas sin nódulos, murieron entre los días 23-25.



Figura 15. Prueba de nodulación en *P. vulgaris*. A) apariencia de plantas. B) individuo experimental positivo. C) Nódulos.

## 7.6 Análisis del gen *gyrB*

Para el análisis del gen *gyrB* se seleccionaron las cepas pertenecientes al género *Cupriavidus* y se obtuvieron las secuencias parciales para este gen, posteriormente se analizaron y finalmente se construyeron arboles filogenéticos con los métodos evolutivos NeighborJoining y MaximumLikelihood para poder inferir las relaciones filogenéticas de las cepas. Se puede observar que en el análisis de la secuencia parcial del gen *gyrB* que las cepas se agrupan en 2 pequeños grupos, uno formado por las cepas LEM 705 y LEM 707 que se asocia lejanamente a otro formado por las especies *C. laharis* y *C. pinatubonensis* (figura 16). El otro clúster está formado por las cepas LEM 710, LEM 711, LEM 712, LEM 713 y LEM 715, que como se aprecia en el análisis, las secuencias parciales del gen *gyrB* revelaron que los aislamientos *Cupriavidus* representan una clara línea de descendencia que se agrupa totalmente independientemente de las demás especies de este género. En el análisis por el método MaximumLikelihood (ML) se siguen manteniendo los 2 grupos formados anteriormente, con la diferencia que al grupo formado por las cepas LEM 710, LEM 711, LEM 712, LEM 713 y LEM 715 las relaciona débilmente a las especies *C. necator* y *C. oxalaticus* (Figura 17). Cabe mencionar que aunque este gen es utilizado ampliamente para inferencia filogenética (Lineda *et al.*, 2007) sobre todo de especies pertenecientes a la familia Burkholderiaceae pesar de eso actualmente no se cuenta con una secuencia de las especies *C. alkaliphilus*, *C. pampae* y *C. numazuensis*.

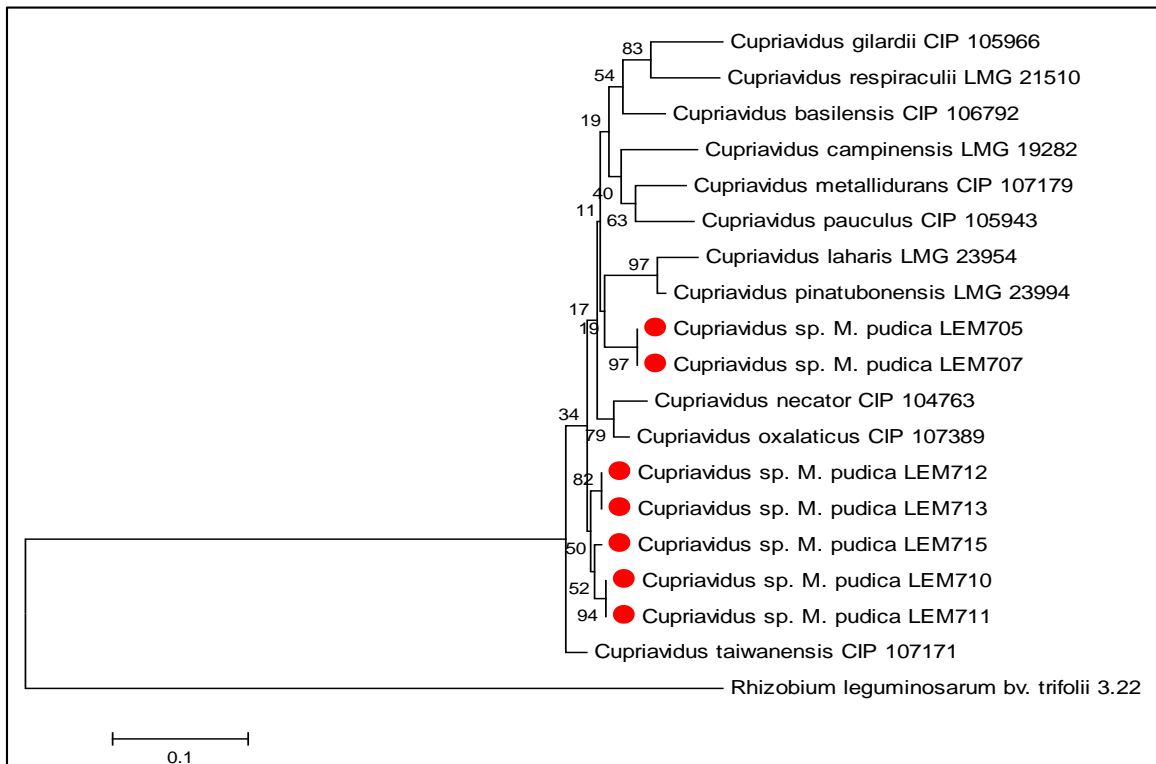


Figura 16. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor joining para secuencias parciales del gen *gyrB* (400 pb) de cepas obtenidas de *M. pudica*. Bootstrap: 2000.

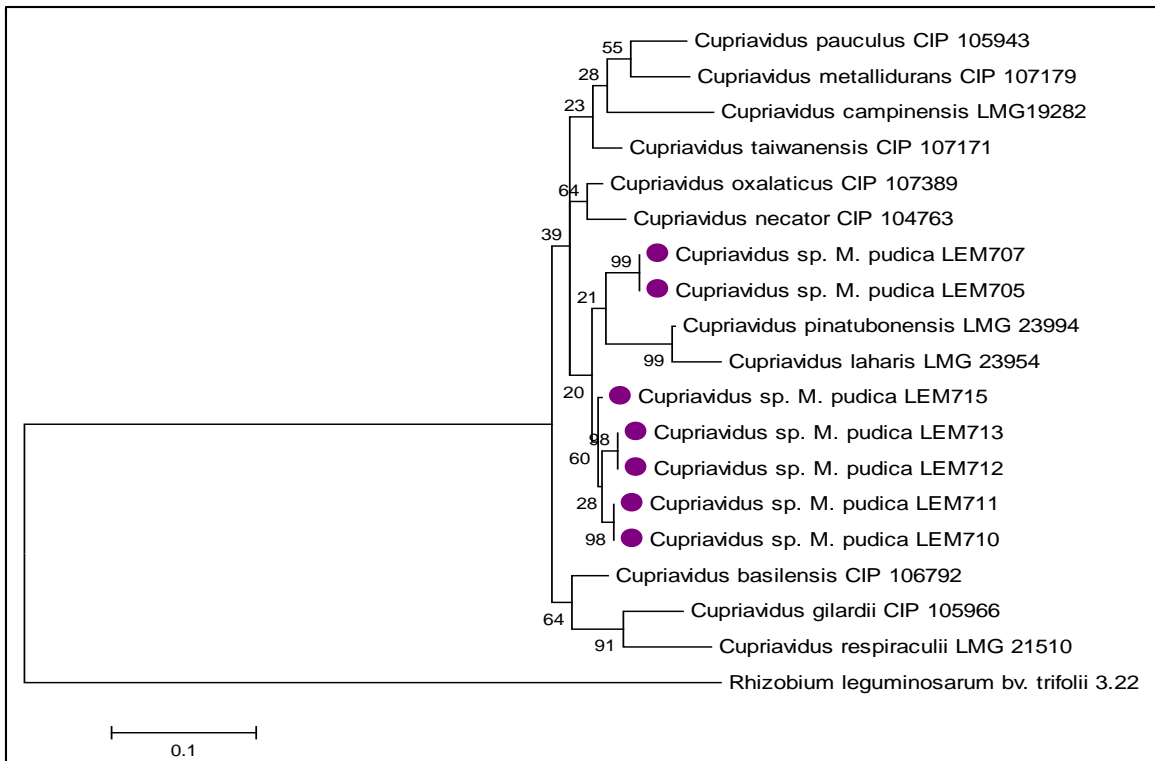


Figura 17. Árbol filogenético obtenido por el método Maximun Likelihood para secuencias parciales del gen *gyrB*(400 pb)de cepas obtenidas de *M. pudica*. Bootstrap: 1000

## 7.7 Árboles concatenados

Como se puede observar en el análisis de las secuencias concatenadas de los genes *rrs* y *gyrB*, las cepas de este estudio se agrupan en un 2 cluster independientes y manteniendo la misma topología en ambos modelos evolutivos (NJ y ML) (Figuras 18 y 19) a excepción que con ML las cepas 705 y 707 las agrupa en un cluster independiente, sin embargo se sigue manteniendo esta agrupación separada de las especies antes descritas del género *Cupriavidus*, aún de las nodulantes, con fuerte valores de bootstrap. Lo anterior indica que es un linaje totalmente diferente de las especies hasta ahora reportadas, un fuerte indicio para la posible descripción de dos nuevas especies de rizobia. Sin embargo estudios al menos de otros genes Housekeeping son requeridos (Gaunt *et al.*, 2001), lo que se vuelve imposible debido a la falta de secuencias de otros genes para este género en los bancos de datos.

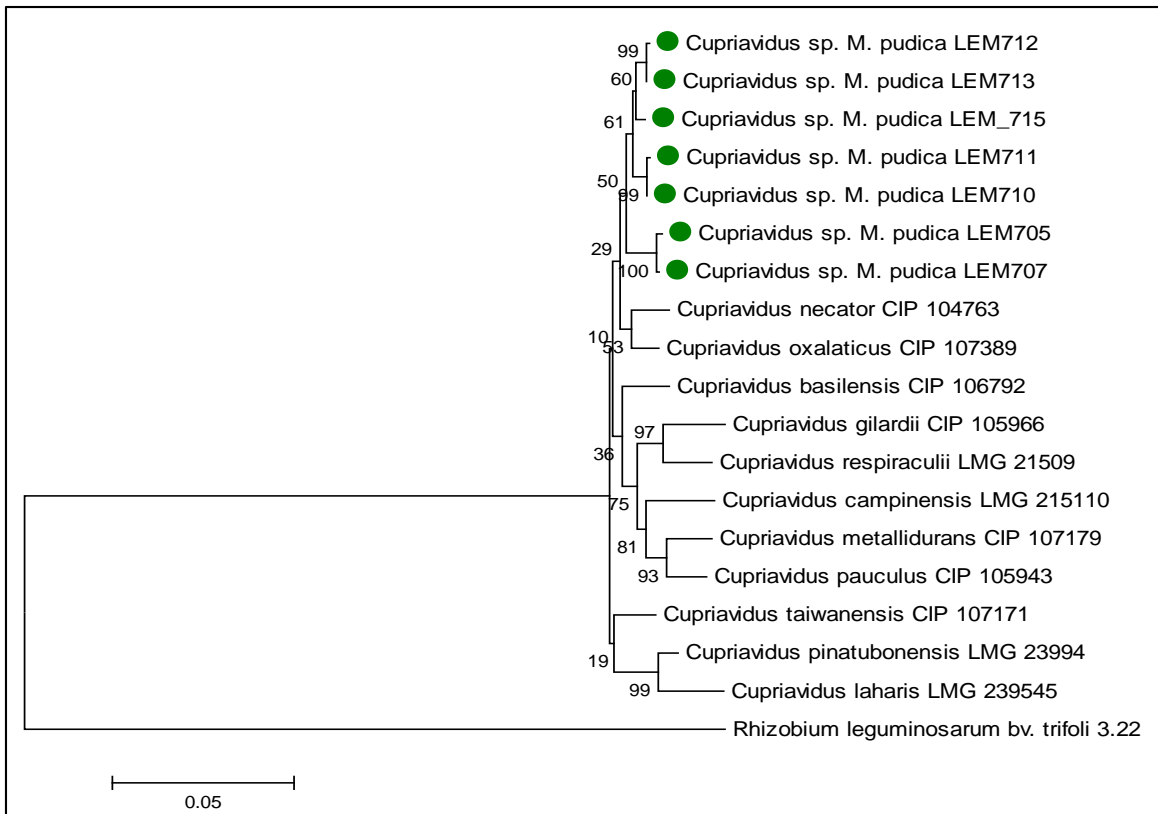


Figura 18. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor joining para secuencias concatenadas *gyrB-rrs* de las cepas obtenidas en este estudio. (1300 pb). Bootstrap: 2000

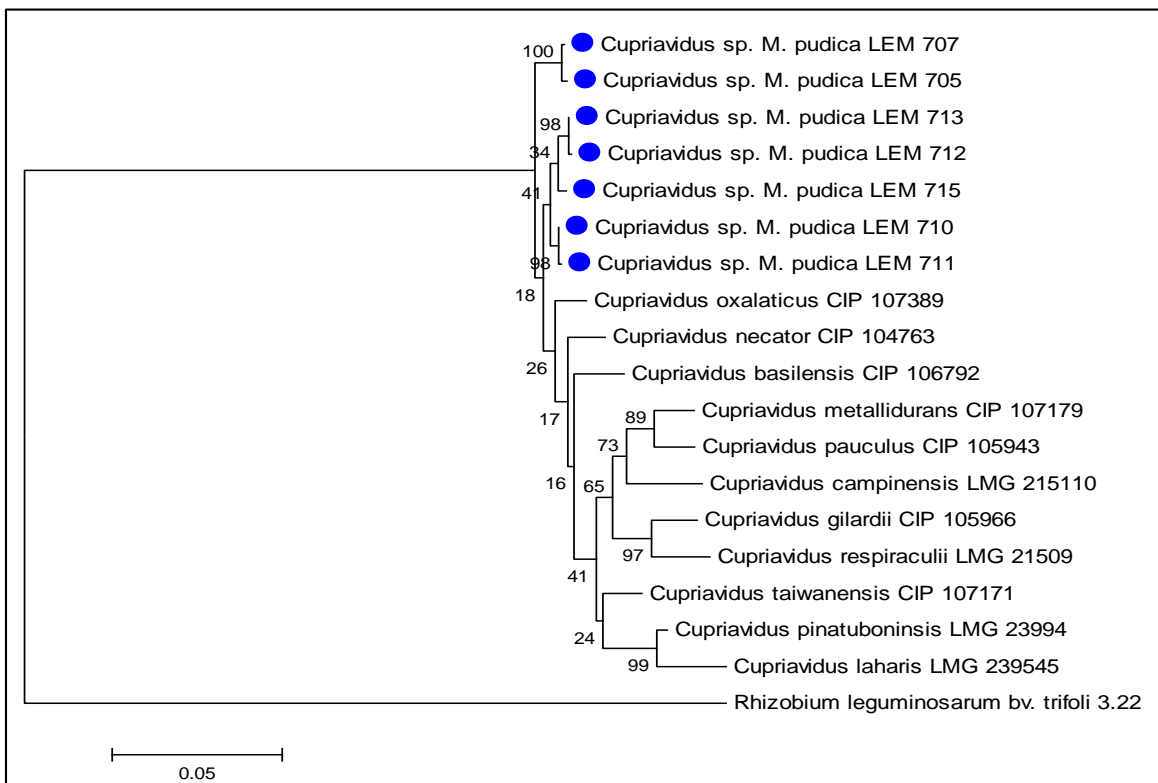


Figura 19. Árbol filogenético obtenido por el método Maximum Likelihood para secuencias concatenadas *gyrB-rrs* de las cepas obtenidas en este estudio. (1300 pb). Bootstrap: 1000

## 8. CONCLUSIONES

A lo largo de este estudio se obtuvo una colección de 20 cepas nodulantes de leguminosas mimosoides de los estados de Puebla y Veracruz. Según el análisis de las secuencias parciales del gen *rrs*, las cepas obtenidas se agrupan dentro de las clases  $\alpha$ - y  $\beta$ -proteobacteria. Dentro del grupo de las  $\alpha$ -rizobia se obtuvieron 11 cepas pertenecientes a 2 géneros: *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Las cepas que pertenecieron al género *Rhizobium* fueron: LEM 701, LEM 706, LEM 708, LEM 716, LEM 719 y LEM 720, que fueron aisladas de las especies: *M. albida*, *M. Luisana* y *A. sheffneri*, que crecen en los climas subtropical, templado y cálido respectivamente excepto las cepas LEM 706 y LEM 708 que fueron aisladas de *M. púdica*. En el caso del género *Bradyrhizobium* se obtuvieron las cepas: LEM 702, LEM 703, LEM 704, LEM 717 y LEM 718) relacionadas cercanamente a las especies *B. japonicum* y *B. lianongense* han sido aisladas en plantas de soya, *Trifolium*, *Crotalaria* y *Mimosa*, que son cultivadas de regiones templadas y subtropicales de China (Liu *et al.*, 2007).

Por el lado de las  $\beta$ -rizobia se obtuvieron 9 aislados pertenecientes 2 géneros: *Burkholderia* (LEM 709 y LEM 714) y *Cupriavidus* (LEM 705, LEM 707, LEM 710, LEM 711, LEM 712, LEM 713 y LEM 715) todas ellas aisladas de *M. púdica* en Veracruz. Esta preferencia concuerda con lo encontrado en estudios anteriores en la misma planta en climas similares en China (Liu *et al.*, 2012). Las cepas pertenecientes al Género *Cupriavidus* de este estudio fueron capaces de nodular la planta de origen; *Mimosa pudica* además también *Macroptilium atropurpureum* y, *Phaseolus vulgaris* variedad Jamapa, a excepción de la cepa 707, posiblemente debido a alguna mutación en los genes de especificidad como *nodP*, por lo que se recomienda un análisis de genes *nod*.

En cuanto al análisis del gen *gyrB* las cepas del género *Cupriavidus* se presentan dos grupos; uno formado por las cepas LEM 705 y LEM 707 y el otro formado por las cepas LEM 710, LEM 711, LEM 712, LEM 713 y LEM 713 que a su vez mantienen su independencia de las demás especies de este género relacionándolo lejanamente con *C. pinatubonensis* y *C. laharis*. De acuerdo al análisis de las secuencias concatenadas *gyrB-rrs*, la topología se mantiene y las cepas de interés se agrupan de manera totalmente independiente a las especies descritas al momento indicando que se trata de dos especies de este género diferentes a las reportadas hasta el momento.

## 9. BIBLIOGRAFIA

**Andam C.P., Mondo S.J., Parker M.A.** 2007. Monophyly of *nodA* and *nifH* genes across Texan and Costa Rican populations of *Cupriavidus* nodule symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4686–4690.

**Andrus D. A., Andam C. y Parker M. A.** 2012. American origin of *Cupriavidus* bacteria associated with invasive *Mimosa* legumes in the Philippines. *FEMS Microbiol.Ecol.* 80:747–750.

**Barneby R.C.** 1989. *Intermountain Flora.Fabales*, vol. 3, part B. New York Botanical Garden, Bronx, New York.Pp.11279.

**Barneby R.C.** 1991. *Sensitivae Censitae*. A description of the genus *Mimosa* L. (Mimosaceae) in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 65:1-835.

**Barrett C. F., Parker M. A.** 2005. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island. Panama. *Syst. Appl. Microbiol.* 28 57–65.

**Barrett C.F., Parker M.A.** 2006. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. In Costa Rica. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1198–1206.

**Bécquer C.J.** 2004. Descripción y clasificación de rizobios: enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Biol.* 18: 9-29.

**Bergensen F.J.** 1997. Regulation of nitrogen fixation in infected cell of leguminous root nodules in relation to O<sub>2</sub> supply. *Plant Soil.* 191: 189-203.

**Bergman K., Nulty E., Su L.H.** 1991. Mutations in the 2 flagellin genes of *Rhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.* 173, 3716– 3723.

**Bontemps C., Elliott G. N., Simon, M. F., dos Reis F. B., Jr., Gross, E.,Lawton, R. C., Neto, N. E., Loureiro, M. F., de Faria, S. M., Sprent, J. I, James, E. K, and Young, J. P. W.** 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol. Ecol.* 19:44-52.

**Brewin N.J., Downie J.A., y Young, J. P.W.** 1992. Nodule formation in legumes. In: *Encyclopedia of Microbiology.* Academic. Press. Inc. 239-248.

**Camargo-Ricalde, S. L. y R. Grether.** 1998. Germinación, dispersión y establecimiento de plántulas de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae) en México. *Rev. Biol. Trop.* 46:543-554.

**Camargo-Ricalde, S. L. y S. Dhillion.** 2003. Endemic *Mimosa* species can serve as mycorrhizal "resource islands" within a semiarid communities of the Tehuacán-Cuicatlán, México. *Mycorrhiza* 13:129-136.

**Chan K., Jongsun., Kim D.C.,** 1993. The Nitrogenase FeMo—Cofactor and P--Cluster Pair: 2.2 Å Resolution Structures, *Science*, 260, 792-794.

**Chen L.S., Figueredo, A., Pedrosa F.O. y Hungría M.** 2000. Genetic characterization of bean soybean rhizobia in Paraguay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5099-5103

**Chen W.X., Yan G.H. y Li, J.L.** 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:392397.

**Chen W.M., Laevens S., Lee T.M., Coenye T., De Vos P., Mergeay M. y Vandamme P.** 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst. Evol. Microbiol* 51: 1729–1735.

**Chen W.M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G y Boivin-Masson C.** 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J Bacteriol* 185: 7266–7272.

**Chen W.-M., de Faria S. M., Stralioetto R., Pitard R. M., Simões-Araújo J. L., Chou, Y-J., Chou, J-H., Barrios E., Prescott, A. R., Elliott G. N., Sprent, J. I., Young J. P. W., y James E. K.** 2005a. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: A study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7461-7471

**Chen W.-M., Moulin L., Bontemps C., Vandamme P., Béna G., yBoivin-Masson, C.** 2003b. Legume symbiotic nitrogen fixation by betaproteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185:7266-7272.

**Chen W.-M., James E. K., Chou J-H., Sheu S-Y., Yang S-Z., ay Sprent J.I.** 2005b. Beta-rhizobia from *Mimosa pigra*, a newly-discovered invasive plant in Taiwan. *New Phytol.* 168:661-675.

**Colwell R.R.** 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. In *Culture collection of Microorganisms*. Eds Tokyo: University of Tokyo Press. 1:421-436.

**Cooper J.** 2004. Multiple responses of *rhizobia* to flavonoids during legume root infection, in: Callow J.A. (Ed.), *Advances in botanical research: Incorporating advances in plant pathology*, Academic Press, pp. 1–62.

**Cunninham S., Kollmeyer W.D., Stacey.** 1991. Chemical control of interstrain competition for soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1886-1892.

**Da Silva K, Florentino LA, Da Silva KB, De Brandt E, Vandamme P, et al.** 2012 *Cupriavidus necator* isolates are able to fix nitrogen in symbiosis with different legume species. Syst. Appl. Microbiol. 35: 175–182

**De Lajudie P., Laurent F.E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M.D., Kersters K., Dreyfus B. y Gillis, M.** 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Syst. Bacteriol. 48(4):1277-1290.

**De'narie J., Debelle F., Truchet G., Prome J.C.** 1993. Rhizobium and legume nodulation: A molecular dialogue, in: Palacios R., Moira J., Newton W.E. (Eds.), New Horizons in Nitrogen Fixation, Kluwer, Dordrecht, the Netherlands, pp. 19–30.

**Downie J.A.** 1998 Functions of rhizobial nodulation genes; in The Rhizobiaceae (Spaank, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J., eds.) pp. 387-402.

**Elliott G.N., Chen W.M., Chou J.H., Wang H.C., Sheu S.Y., Perin L., Reis V.M., Moulin L., Simon M.F., Bontemps C., Sutherland J.M., Bessi R., de Faria S.M., Trinick M.J., Plant Soil Prescott A.R., Sprent J.I, James E.K.** 2007b *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. New Phytol. 173:168–180

**Escalante A.E.** 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades microbianas Rev. Digital del centro nacional de investigaciones agropecuarias abril-diciembre.

**Ezura, H., Nukui, N., Yuhashi, K.I.** 2000. In Vitro plant regeneration in *Macroptilium atropurpureum*, a Legume with a broad symbiont range for nodulation. Plant Science. Vol. 159, p. 21-27.

**Fassbender, H. & Bornemisza, E.** Química de suelos con énfasis en suelos de América latina. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura 2ª edición. San José, Costa Rica. 1994.

**Fox G.E., Wisotzkey J.D., Jurtshuk P.** 1992. How close is close: 16s rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. Int. Syst. Evol. Bacteriol. 42:166-170.

**Frank B.** 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. Bot Dtsch Bot Ges 7:332–346.

**García-Sánchez, R.** 2005. Restauración de la cubierta vegetal de los matorrales semiáridos del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. [www.dama.gov.com](http://www.dama.gov.com); última consulta: 30.IX.2009.

- Gaunt, M., Turner, S. Rigottier-Gois, L., Macgilp, S. & Young, J.** 2001. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. Journal of Syst. Evol. Microbiol.* 51:2037-2048.
- Graham, P. & Vance, C.** 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131:872-877
- Grether R.** 1978. A general review of the genus *Mimosa* in México. *Bulletin of the International Group for the Study of Mimosoideae* 6: 45-50.
- Grether R.** 1882. Aspectos ecológicos de *Mimosa biuncifera* y *Mimosa monancistra* en el Noroeste del estado de Guanajuato. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.*43:43-60.
- Grether R., Camargo-Ricalde S.L. y Martínez-Bernal A.** 1996. Especies del género *Mimosa* (Leguminosae) presentes en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58: 149-152.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L.** 2011 Legume- nodulatingbetaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol Plant Micro.*24: 1276–1288.
- Hirsch, A.M.** 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122, 211–237.
- Inzé D. y De Veylder L.** 2006. Cell Cycle Regulation in Plant Development. *Annu. Rev. Gen.* 40: 77-105.
- Jordan D.C.** 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slowgrowing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J.I of Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- Kock M., Steyn P.L.** 2004. Determination of the diversity of root-nodulating bacteria associated with *Cyclopia* spp. *Proceedings of the 6th European Nitrogen Fixation Conference; Toulouse, France.. Abstract P4.3, 60.*
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C.,** 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria, *Nature* 411 948–95.
- Laguerre G.K., Allard F.R. y Amarger N.** 1994. Rapid identification of Rhizobia by restriction fragment length polymorphisms analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*.60: 56-63.
- Lavin M., Herendeen P.S., Wojciechowski M.F.** 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst. Biol.*54: 574–594.

**Lewis G., Schrire B., Mackinder B., Lock M.** 2005. Legumes of the world. London: Royal Botanic Gardens Kew.

**Lin X.D., Wang T.E., Tang H., Han X.T., He R.Y., Guan H.S. y Chen X.W.** 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1409-1413.

**Lister R., Gregory B.D., y Ecker J.R.** 2009. Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. Cur.t Op. in Plant Biolog. 12:107-118

**Liu X.Y., Wang E.T., Li Y y Chen W.X.**2007 Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. ArchMicrobiol 188: 1–14.

**Liu X.Y., Wei S., Wang F., James K.E., Guo X., Zagar C., Xia L.G., Dong X. y Wang Y.P.** 2012. *Burkholderia* and *Cupriavidus* spp. are the preferred symbionts of *Mimosa* spp. in Southern China 10.1111/1574-6941 0131.

**Lowe S., Browne M., Boudjelas S., and De Poorter M.** 2000. 100 of the world's worst invasive alien species. Vol. 2010. The Invasive Species Specialist Group, International Union for Conservation of Nature, Gland, Switzerland.

**Ludwig W., Amann R., Martinez-Romero E., Schonhuber W., Bauer S., Neef A., Schliefer K-H.** 1998 rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. Plantsoil, 204, 1-19.

**Luna-Suárez, S., T. J. Frías-Hernández, V. Olalde-Portugal y L. Dendooven.** 2004. Catclaw (*Mimosa biuncifera*): a pest or a means to restore soil fertility in heavily eroded soil from central highlands of México? Biol. Soils 32:109-113.

**Mantelin S., Fischer-Le S.M., Zakhia F., Béna G., Bonneau S., Jeder H., de Lajudie P. y Cleyet M.J.C.** 2006 Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 827-839.

**Makkar N. S., Casida L. E., Jr.** 1987. *Cupriavidus necator* gen. nov., sp. nov.: a nonobligate bacterial predator of bacteria in soil. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:323–326

**Martens M., Dawyndt P., Coopman R., Gillis M., De Vos P. & Willems A.** 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:200-214.

- Martínez-Pérez, G., A. Orozco-Segovia y C. Mantorell.** 2006. Efectividad de algunos tratamientos pre-germinativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta Oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 79:9-20.
- Mergeay M, Monchy S, Vallaeyts T, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, et al.** 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev.*;27 (2–3):385–410. Epub 2003/06/28. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00045-7 pmid:12829276.
- Molouba F.; Lorquin J., Willems A., Hoste B., Giraud E., Dreyfus B., Gillis M., De Lajudie P., Masson B. C.** 1999. Photosynthetic Bradyrhizobia from *Aeschynomene* spp. are specific to stemnodulated species and form a separate 16S ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism group. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3084-3094.
- Munive A.** 2002. Diversité génétique des souches de Bradyrhizobium d'arbres de forêts tropicales humides en Guyane, en Guinée et à Madagascar. PhD thesis, Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Nick, G.** 1998. Polyphasic taxonomy of rhizobia isolated from tropical legumes. Ph. D. Thesis. Department of Applied Chemistry and microbiology. University of Helsinki, Finland. *Dissertationes Biocentri Viikki Universitatis Helsingiensis.* 17,1998.
- Oldroyd G.E.D. y Downie J.A.** 2008. Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-546.
- Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., zechowski T., Geigenberger P., Udvardi M.K.** 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol* 15:531–535.
- Parker M. A., Wurtz A. K., y Paynter Q.** 2007. Nodule symbiosis of invasive *Mimosa pigra* in Australia and in ancestral habitats: A comparative analysis. *Biol. Inv.* 9:127-138.
- Pérez-Giménez J., Mongiardini E.J., Althabegoiti M.J., Covelli J., Quelas J.I., López-García S.L., Lodeiro A.R.** 2009. Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants. *Int J. Microbiol.* doi:10.1155/2009/719367.
- Polhill R.M., Raven P.H. y Stirton C.H.** 1981. Evolution and Systematics of the Leguminosae. En: Polhill, R.M; Raven, P.H., eds, 1981. *Advances in Legume Systematics. Part 1:* 1-26. Royal Botanic Gardens, Kew, England.
- Rademaker J.L.W., Hoste B., Louws F.J., Kersters K., Swing J., Vauterin L., Vauterium P., De Bruijn F.J.** 2000. Comparison of AFLP and REP-PCR genomic

fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 50: 665-677

**Rivas R., Velázquez E., Willems A., Viscaíno N., SubbaRao N.S., Mateos P.F., Gillis M, Dazzo F.B. y Martínez M.E.** 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:52175222

**Robinson J.B., Bauer W.D.** 1993. Relationships between C-4 dicarboxylic acid transport and chemotaxis in *Rhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.* 175, 2284–2291.

**Roche P., Debelle F., F. Maillet et al.,** 1991. "Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals," *Cell*, vol. 67, no. 6, pp. 1131–1143.

**Rzedowski J. y G. Rzedowski.** 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. Limusa, México, D.F. 1406 p.

**Sarita S.A., Sharma P.K., Priefer U.B., Prell J.** 2005. Direct amplification of rhizobia *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of nodule isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54:1-11.

**Schneider M. y de Bruijn F.J.** 1996. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia y computer-assisted phylogenetic pattern analysis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 12:163-174.

**Selenska P. S. y Evguenieva H. E.** 1995. Fragmentation of the large-subunit rRNA in the family Rhizobiaceae. *J. Bacteriol.* 177: 6993-6998.

**Sosa V. y Davila P.** 1994. Una evaluación del conocimiento florístico de México. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 749-757.

**Sousa M. y Delgado A.** Mexican Leguminosae: phytogeography, endemism, and origins. En: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y Fa J., eds, 1993. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*: 459-511. Oxford University Press.

**Sy A., Giraud E. y Jourand P.** 2001. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J Bacteriol.* 183: 214-220.

**Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., and Grimont, P. A. D.** 2008. Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Res. Microbiol.* 159, 169–177. doi: 10.1016/j.resmic.2007.12.005

**Valiente-Banuet, A. y E. Ezcurra.** 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisana* in the Tehuacán Valley, México. *J. Ecol.* 79:961-971.

**Valverde A., Velazquez E., Gutierrez, C., Cervantes E., Ventosa A., Igual M. J.** 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.* 53: 1979-1983.

**Vandamme P., Goris J., Chen WM., de Vos P., Willems A.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 25:507–512

**Vandamme P, Coenye T.** Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. 2004. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 54 (Pt 6):2285–9. Epub 2004/11/17. doi: 10.1099/ijs.0.63247–0 pmid:15545472.

**Vanechoute M., Rossay R., De Vos P., Gillis M., Janssens D., Paepe M., De Rouck A. Fiers T., Claeys G. y Kersters K.** 1992. Rapid identification of bacteria of the commandaceae with amplified ribosomal-DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol. Lett.* 93: 227-234

**Verma S.C., Chowdhury S.P. y Tripathi AK.** 2004 Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica* in India. *C. J. Microbiol.* 50: 313–322.

**Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. y Lupski J.R.** 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.

**Vinuesa P., Silva C., Lorite M., Izaguirre-Mayoral M., Bedmar E. y Martínez-Romero E.** (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:702-716.

**Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. & Martínez-Romero, E.** 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet Evol* 34, 29–54.

**Wais R. J., Keating D. H y Long S. R.** 2002. Structure-function analysis of Nod factor-induced calcium spiking in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 129: 211-224.

**Weir B.S.,** 2008. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: 16th November, 2008

**Willems A. y Collins M.D.** 1992. Evidence for a close genealogical relationship between *Afipia* (the causal organism of cat scratch disease), *Bradyrhizobium japonicum* and *Blastobacter denitrificans*. FEMS Microbiol. Lett. 96:241-246.

**Willems A., Doignon-Bourcier F., Goris, J., Coopman R., de Lajudie P., De Vos P., Gillis, M.** 2001. DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1315–1322.

**Young J.P.W.** 1996. Phylogeny and taxonomy of the rhizobia. Plant Soil. 184: 45-52.  
Zahran

**Zhang X.X., Guo X.W., Terefework Z., Paulin L., Cao Y. Z., Hu F. R., Lindstrom K.y Li, F. D.** 1999. Genetic Diversity Among Rhizobial Isolates from Field-grown *Astragalus sinicus* of Southern China. Syst. Appl. Microbiol. 22: 312-320.

**Zurdo P.J.L, Rivas R, Trujillo ME, Vizcaíno N, Carrasco JA, Chamber M, Palomares A, Mateos PF, Martínez-Molina E, Velázquez E.** 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 784-788.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo 1. Medio agar levadura manitol (YMA)

Para un litro de medio:

10 g de manitol.

0.66 g de fosfato ácido de potasio.

0.5 g de glutamato de sodio.

0.05 g de NaCl.

10 ml de solución "T" o 0.1g de sulfato de magnesio.

1 ml de solución "U" o 0.04g de cloruro de calcio.

1 ml de solución "V" o 0.004g de cloruro férrico.

1 g de extracto de levadura. 18 g de agar bacteriológico.

998 ml de agua destilada.

Ajustar a pH= 6.8

### 10.2 Anexo 2. Solución nutritiva Jensen

Para un litro de solución:

10 ml de solución "P" o 0.2 g de sulfato de magnesio heptahidratado.

10 ml de solución "Q" o 0.2 g de cloruro de sodio.

20 ml de solución "R" o 0.2 g de fosfato dicálcico.

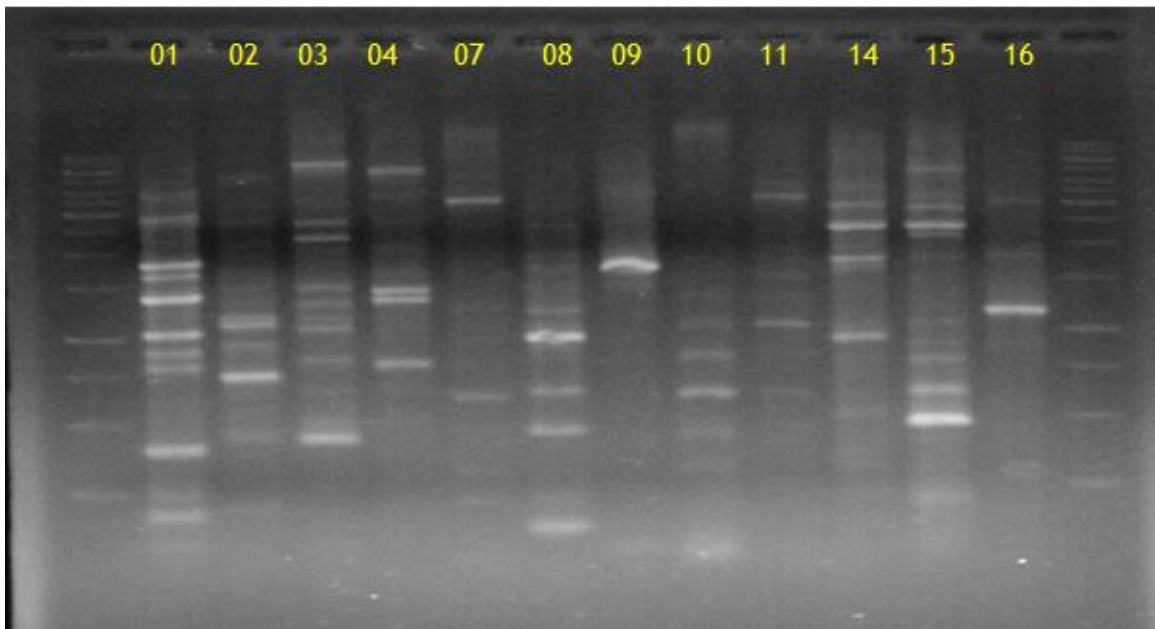
10 ml de solución "D" o 0.04 g de cloruro férrico.

1 ml de oligoelementos de Jensen:

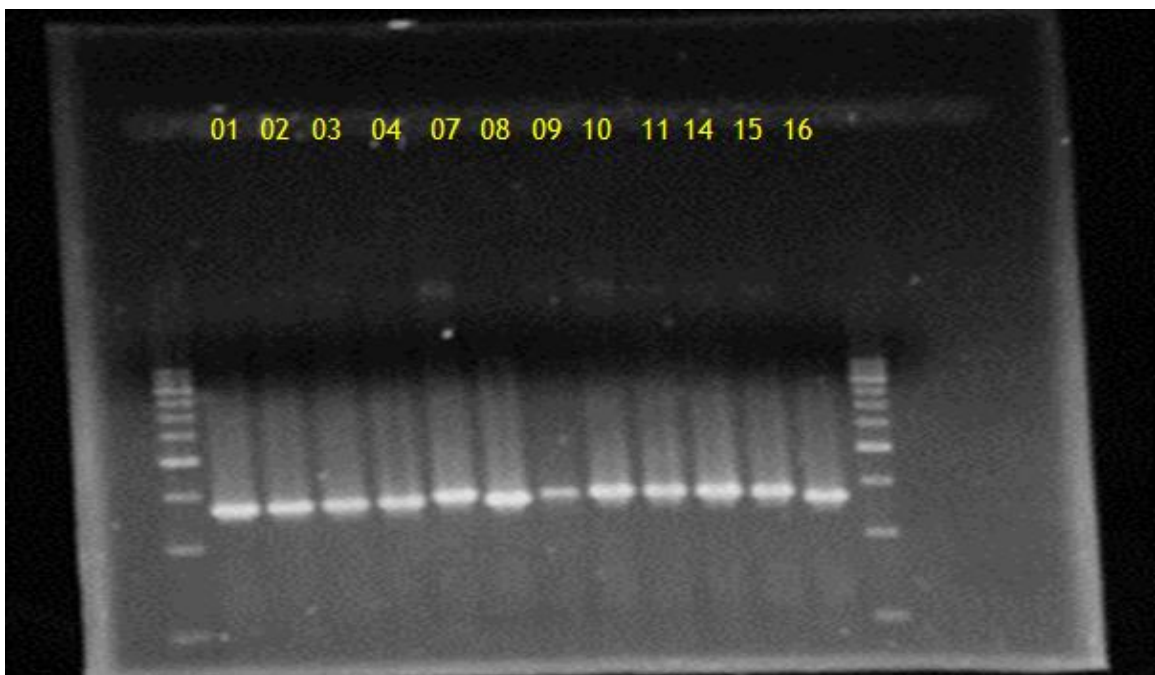
2.26 g de  $H_3BO_3$  2.03 g de  $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$  0.22 g de  $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$  0.08 g de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  0.09 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$

949 ml de agua destilada.

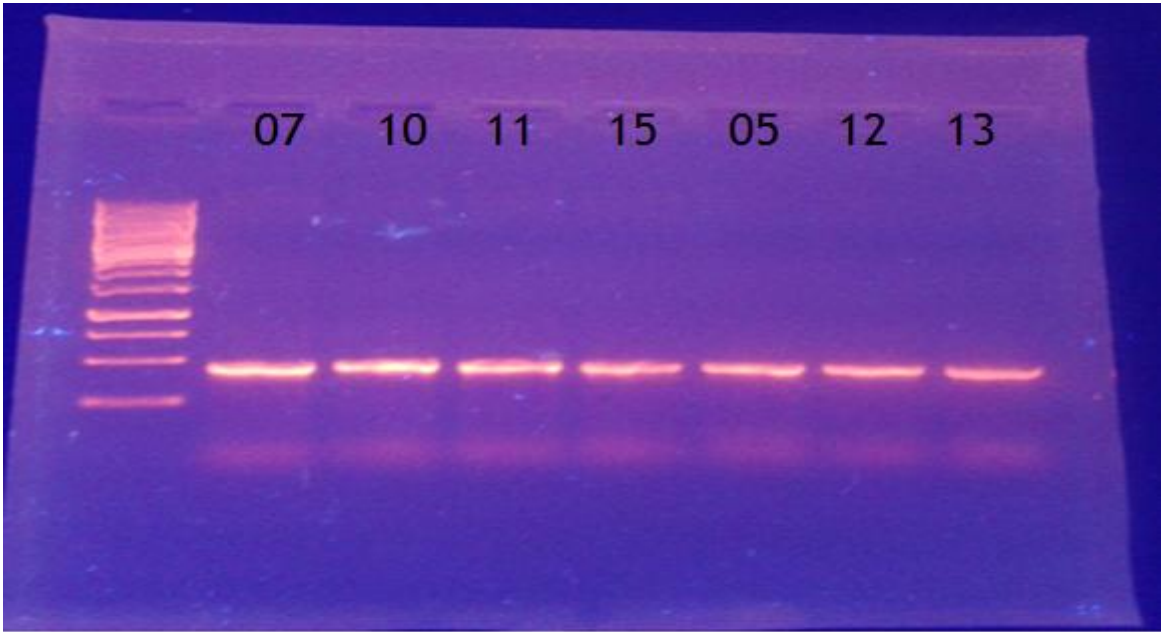
### 10.3 Anexo 3. Geles



Anexo 3. 1. Corrimiento electroforético del amplificación de los repetidos palindromicos extragénicos de algunas cepas de este estudio.



Anexo 3.2. Corrimiento electroforético del amplicón obtenido para el gen *rrs* de algunas cepas obtenidas de este estudio(1400 pb).

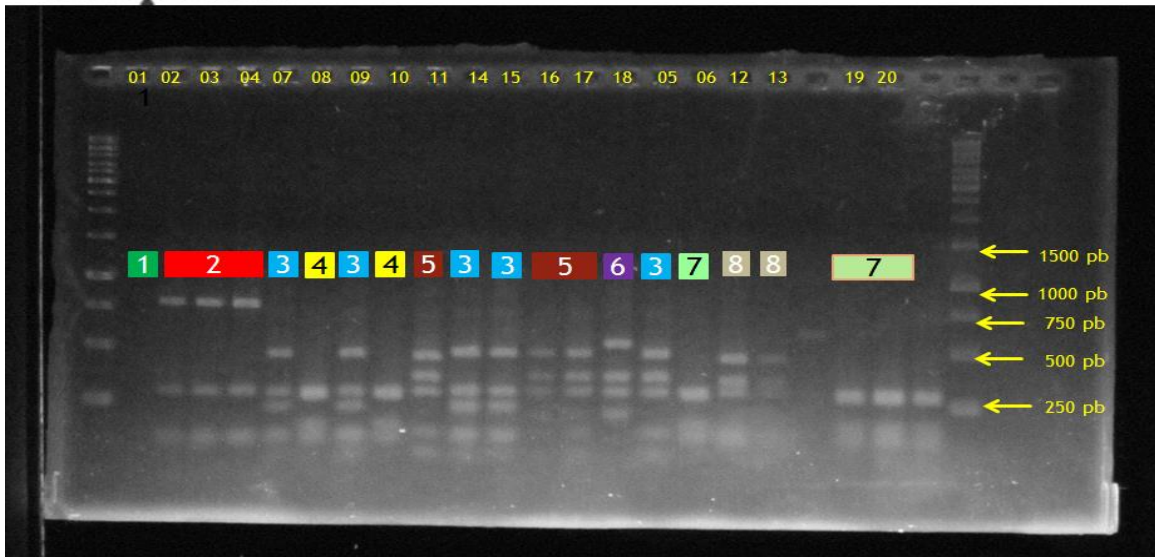


Anexo 3.3. Corrimiento electroforético del amplicon obtenido para el gen *gyrB* (400 pb) de las cepas pertenecientes al genero *Cupriavidus* aisladas de *M. pudica*.

## 10.4 Anexo 4. ARDRAS

### Ardra Cfo I

5'...GCGC...3'  
3'...CGCG...5'



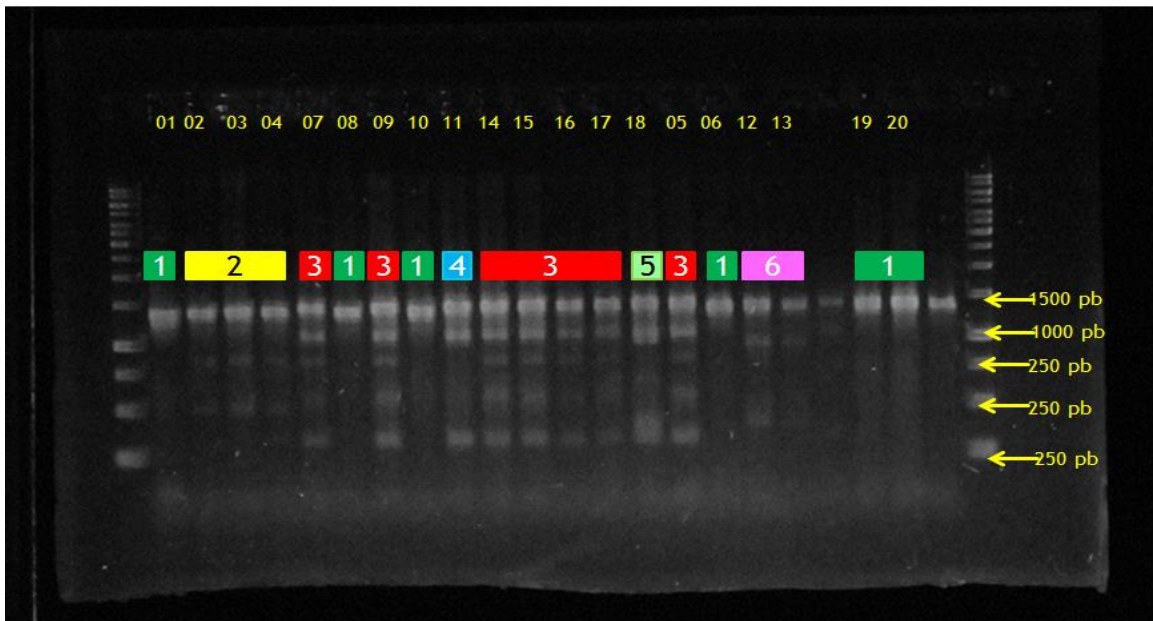
Anexo 4.1. Corrimiento electroforético de las digestiones de las cepas obtenidas en este estudio

# ARDRA Nde II



Anexo 4.2. Corrimiento electroforético de las digestiones de las cepas obtenidas en este estudio

# Ardra Hinf I



Anexo 4. 3. Corrimiento electroforético de las digestiones de las cepas obtenidas en este estudio



>LEM707

GGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAACCACGACACGACCTGAGGGTGAAGCGGG  
GGACCGCAAGGCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCGGATGCTGATAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATACGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGCAACCTGATCCAGCAATGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTGTAAAGACTTTTGTCCG  
GAAAGAAATGGCGCTGTTAATACCCGGCTCGATGACGGTACCGGAAGAAATAAGCCCGCTACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGCAGGCTTAACTCGGAATTACTGG  
CGTAAAGCGTGGCGGCGGTTTGAAGACAGCGTGAAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCCCTGTGACTGTGACGGTATGTCAGAGGGGGTGAATTCACCGTGTAGC  
AGTGAATTCGCTGAGAGATGGAGGAATCCGATGGCGAAAGCAGCCCTGGGACGTCACGTGCCACTAACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGTATGCCAGCC  
CTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGATTCATTTTTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAAGTACCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGAAATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGCAC  
AAGCGGTGGATGATGTTGGAATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTTGACATGCCACTAACGAAAGCAGAGATGCAATTAGGTGCCGAAAGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCA  
GGCTGCTGTCAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTAGTTGGTACGAAAGGGCAGCTAGAGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTG  
GGGATGACGTCAAGTCCATGTCGCTTATGGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTGCCAACCCCGGAGGGGGAGCTAAATCCAGAAACCGCATGATGCCGGA  
TCGTAGTGTCAACTCGACTACGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAACTCGCGGATCAGCATGCCCGCTCATATGAGGGGCGTTGACGCCCCA

>LEM708

AGGGGAGCGGCGAGCGGGTGAATAACCGGTGGGAACCTACCCCTTGTACGGAAATACCCAGGGAAACTGGACTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTACGGCAAAGGATCG  
GCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGACAGCCACTTCACGGGAAAGGCA  
GCAGTGGGGAATTTGGACAATGGCGCAAGCTGATCCAGCCATGCCCGTGTAGTGAAGGCCCTACGGTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGAATAAGCGGTAACCGGAAGAA  
CCCGGCTAACTTCGCGCAGCCCGCGGTAATACGAAGGGGGTACGGTGTTCGGAATTTACGGGGTAAAGCGCACGTAGGGGATCGATGATGAGGGTGAATCCCAAGCTCAAC  
CTCTGGAACCTGCTTTGATCTGCTGATGGAGTGAAGAGGTTGAGTGAATTCGAGTGTAGGGTGAATTCGTAAGATTTCCGAGGAACAACCGGCTACTGGCTC  
ATTACTGACGCTGAGGTGCGAAACGCTGGGAGCAACAGGATTAATACCTGCTGAGTCCACGCCGTAACAGTGAATGTTAGCCGTCGGGCGAGTACTGTTCCGTCGGCAGCTAACGC  
ATTAACATTCCTCCGCTGGGAGTACGGTGCAGAAATTAACACTCAAAGGAAATGACGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCAAGTGGTAAATTCGAAACAGCCGCGCAGAACCTTACCGCCCT  
TGACATCCTCGGACAGCTCGAGAGATGCACTCCACTTCGGTGGCCGAGAGCAGGTGCTGCAATGGCTGTCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCACAGGCGCAAC  
CTCGCCCTAGTTGCCAGCAATTAATGTTGGGCACCTTAAGGGGACTGCCGGTGAATAGCGGAGAGGAAAGTGGGGATGACGTCAGTCTCCTAGTCCCTTACCGGGCTGGGCTACACAGCTGT  
ACAATGGTGTGACAGTGGCGAGCAGCCGCGAGGTCGAGCTAATCTCCAAAAGCATCTCAGTTCCGATTCGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGT

>LEM709

CGCGGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGACATCGGAACGTGCTGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCGCATACGCTCTGTGGAGGAAAG  
CGGGGATCGAAAGACTCGCTCGCTCAAGGGGCGGCGATGGCAAAATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACTGG  
GACTGAGACACCGCCCAACCTCCTACGGGAGGACGAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGGCACTTTGT  
TCCGGAAAGAAACTTTCCGCTAAATCCGGCGGGGAGGATGACGGTACCGGAAGAAATAAGCACCGGCTAAGTACCTGACAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTCCAGCGCTTAACTCGGAATTA  
CTGGCGGTAAAGCGTGGCAGCGGCTGCTGTAAGACCGATGTAAGTCCCGGGCTTAACTCGGAACTGCAATTTGGTACTGCAAGCGCTGGAATGAGTGGCAGAGGGGGTGAATTCACGCT  
GTAGCACTGAACCTGAGATGAGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCGCCCTGGGCGCAATGACGCTCATGCAACAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGATGCTC  
CGCCCTAAACGATGCTCAACTGGTTCGCGCCCTTACCTGGCTTGGTAACTGATGCTAACCGCTGAAATGACCGCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACCGGGAC  
CGCACAAAGCGGTGGATGTTGGAATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTGACATGCCACTGACCTGACATGGATGGAATGGAAGCTTCTGAGAGCGGAGGGTCCCGAAAGGAGCCATCAACAGGTG  
CTGCAATGGCTGCTGCTGAGTGTGCTGAGATGTTGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTTGCTACGCAAGAGCCTCCAGGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGG  
AAGTGGGGATGACGCTCAAGTCTCATGCCCCATTAAGGGTGGGCTTACACGCTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGGTTCGCAAGCCCGGAGGTGGAGGCCAATCCAGAAACCGCATGTA  
TCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA

>LEM710

TTCCGGCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAGCGGGGGAC  
CGCAAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGCTGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACTGGGACTGAGA  
CACCGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAA  
GAAATGGCGCTGGTAAATACCCGCGCTGATGACGCTACCGGAAGAAATAAGCACCGGCTAAGTACCTGACAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTCCAGCGCTTAACTCGGAATTTACTGGCGT  
AAAGCTGGCGCAGGCGGTTTGAAGACAGCGGTGAAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTGACGGTATGATGTCAGAGGGGGGTGAATTCACCGTGTAGCAGT  
AAATGCTGAGATGTTGGAGAAATACCGATGGCGAAGGCGCCCTGGGAGCTACGCTGACGCTCATGCAACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGATGCTCACCGCCCTAA  
ACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAGTTCAGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGCACAA  
CGTGGATGATGTTGATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTGACATGCCACTAACGAAAGCAGAGATGCAATGAGTCCCGAAAGGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCAATGGC  
TGTCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTTGGTACGAAAGGGCAGCTAGAGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAGTCTCATGCCCCATTAAGGGTGGGCTTACACGCTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTCGCAACCCCGGAGGGGGAGCTAATCCAGAAACCGCATGCTAGTCCGGATCG  
TAGTCTGCA

>LEM711

CTTCGGCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAGCGGGGGGA  
CGCAAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGCTGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACTGGGACTGAG  
ACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAA  
GAAATGGCGCTGGTAAATACCCGCGCTGATGACGCTACCGGAAGAAATAAGCACCGGCTAAGTACCTGACAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTCCAGCGCTTAACTCGGAATTTACTGGCG  
TAAAGCGTGGCAGGCGGTTTGAAGACAGCGGTGAAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTGACGGTATGATGTCAGAGGGGGGTGAATTCACCGTGTAGCAGT  
GAAATGCTGAGATGTTGGAGAAATACCGATGGCGAAGGCGCCCTGGGAGCTACGCTGACGCTCATGCAACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGATGCTCACCGCCCTAA  
AACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAGTTCAGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGCACAA  
CGTGGATGATGTTGATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTGACATGCCACTAACGAAAGCAGAGATGCAATGAGTCCCGAAAGGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCAATGGC  
TGTCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTTGGTACGAAAGGGCAGCTAGAGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAGTCTCATGCCCCATTAAGGGTGGGCTTACACGCTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTCGCAACCCCGGAGGGGGAGCTAATCCAGAAACCGCATGCTAGTCCGGATCG

>LEM712

GACGGCAGCGCGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAGCGGGGGAC  
AAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGCTGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACTGGGACTGAGACAC  
GCCCGAGCTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAA  
ATGGCTGGGCTAAATACCCCGGCTGATGACGCTACCGGAAGAAATAAGCACCGGCTAAGTACCTGACAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGGCAGCGCTTAACTCGGAATTTACTGGCGTAA  
CGCTGGCAGGCGGTTTGAAGACAGCGGTGAAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTGACGGTATGATGTCAGAGGGGGGTGAATTCACCGTGTAGCAGTGA  
GCTGAGAGATGTTGGAGAAATCCGATGGCGAAGGCGCCCTGGGAGCTACGCTGACGCTCATGCAACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGATGCTCACCGCCCTAA  
ACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAGTTCAGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGCACAA  
CGTGGATGATGTTGATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTGACATGCCACTAACGAAAGCAGAGATGCAATGAGTCCCGAAAGGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCAATGGC  
TGTCTGACGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTTGGTACGAAAGGGCAGCTAGAGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGG  
ATGACGTCAAGTCTCATGCCCCATTAAGGGTGGGCTTACACGCTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTCGCAACCCCGGAGGGGGAGCTAATCCAGAAACCGCATGCTAGTCCGGATCG  
GGTGTGATGCTGCTGCTGCTGAG

>LEM713

GGCCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAGCGGGGGACCGC  
AAGGCCCTCGCGCAGCAGGAGCGGCCGATGCTGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACTGGGACTGAGACAC  
GCCCGAGCTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCGTATCCAGCAATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCCGAAAGAA  
ATGGCTGGGCTAAATACCCCGGCTGATGACGCTACCGGAAGAAATAAGCACCGGCTAAGTACCTGACAGCAGCCCGGTAATACGTAGGGTGGCAGCGCTTAACTCGGAATTTACTGGCGTAA  
CGCTGGCAGGCGGTTTGAAGACAGCGGTGAAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTGACGGTATGATGTCAGAGGGGGGTGAATTCACCGTGTAGCAGTGA  
GCTGAGAGATGTTGGAGAAATCCGATGGCGAAGGCGCCCTGGGAGCTACGCTGACGCTCATGCAACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAATACCCCTGGATGCTCACCGCCCTAAACG  
ATGTAACACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAGTTCAGCCCTGGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACAACTCAAAGGAAATTGACGGGGACCCCGCACAAAGCG  
TGATGATGTTGATTAATTCGATGCAACCGCAAAACCTTACCTACCCCTGACATGCCACTAACGAAAGCAGAGATGCAATGAGTCCCGAAAGGGGAAAGTGGACACAGGTGCTGCAATGGC  
GGGACCCCGCACAGCGGTGATGATGTTGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTTGGTACGAAAGGGCAGCTAGAGAGACTGCCGGTGAACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG  
ACGTCAAGTCTCATGCCCCATTAAGGGTGGGCTTACACGCTCATACAATGGTGCCTACAGAGGGTTCGCAACCCCGGAGGGGGAGCTAATCCAGAAACCGCATGCTAGTCCGGATCG

>LEM714

GGGCAACCCCTGGTGGCGTAGTGGCGAACGGGTGAGTAAATACATCGGAACGTGCTCTGGAGTGGGGGATAGCCCGCGAAAGCCGGATTAATACCCGATACGCTCTGTGGAGGAAAGCGGGG  
GATCTTCGGACCTCGCGCTCAAGGGGCGGCCGATGGCAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCAAGGGCGACGATCTGTAGCTGGTGTGAGGAGGACGACAGCCACCTGGGACTG  
AGACACGGCCAGACTCTTACGGGAGGCACAGTGGGGAATTTTGGACAAATGGGGGCAACCTGATCCAGCAATGCCCGGTGTGTAAGAAGGGCTTCGGGTGTAAAGCACTTTTGTCCGG  
AAAGAAAACATCCCTTAATATGGTGGTGGGATGACGGTACCCGGAAGAAATAGCACCCGGCTAATCGTGCCACGACGCCGCGGTAATACGTAGGGTGGGAGCTTAATCGGAAATTAAGTGG  
CGTAAAGCGGTGCGCAGGGGTTCCGCTAAGACCGATGTGAATATCCCGGGCTTAACCTGGGAAGTGCATTTGGTACTGGCGGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTGAAGATCCACGTTGAGCA  
GTGAAATGCGTAGAGATGGGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTTGGCCCAATACGACGCTATGACGCTACACGAAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATTAAGTACCCCTGGTAGTCCACGCC  
TAAACGATGTCAACTAGTTGTGGGCTTCACTTACTGGTAACTGACGTAACCGCTGAAGTGGACCGCTGGGGAGTACCGTCCGCAAGATTAATACTAAAGGAAATTAAGCGGGGACCCGCCAC  
AAGCGGTGAGATGATGGGATTAATTCGATGCAACGGGAAACCTTACCTACCTTTGACATGATGACGCTGAGTACCGCTGAGAGGTGGGAGTGGCCGAAAGGGGAGTAAACAGGATGCTGCATG  
GCTGTGCTACGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGGGAGACTGCCGGTGCACAAACCGGAGGAAAGTGG  
GATGACGCTCAAGTCCCTATGCGCCCTATGGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGGTTCGCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAAATCCCA

>LEM\_715

AGCGGGGGCTTCGGCTGGCGGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAATACATCGGAACGTGCCCCGTCTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAAATACCCGATACGACCTGAGGGTGA  
CGGGGGAGCCGTAAGCCCTCGCGCAGAGGAGCGGCCGATGCTGATAGTACTAGTTGGTGGGTAAAGGCCATACCAAGGCGACGATCAGTACTGGTCTGAGAGGAGCAATACGCCACACTG  
GGACTAAGACACCGCCAGACTCTTACGGCAGCGCCGATGAGGGGAATTTTGGACAAATGGGGGCAACCCCTGATCCAGCAATGCCCGGTGTGTGAAAGAGCCCTTCGGGTGTAAAGCACTTTT  
GTCCGGAAGCAAGTGGCTGGCTTAATCCCGGGTGTGATGACGATACCGGAAATTAAGCCGCTAATCGTACGCAAGCGCCGCTAATACGTGACGAGCGCCGCTAATACGAGGGGTAACCGGAAAT  
ACTGGGCTAAAGCGTGGCAGCGGGTTGATAAGACAGCGCTGAATCCCGAGCTCAACTTGGGAATGGCGCTTGTGACTGTACGGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGTGAATTCACAGT  
GTACAGTGAATGCTAGAGATGGGGAATACCGATGGCGAAGCGACCCCTGGGAGTACTGACGCTATGCAAGAAAGCGTGGGGCAACCAAGGATTAATGATCCCTGGTACTC  
AGCCCTAAACGATGCTACTAGTTGGGATTCATTTTTCAGTAACTGACTAAGCGGTGAAAGTGGAGGCTGGGGAGTACCGCCCTGGGGAGTACGGGAGTACGGGAGTACGGGAGTACGGGAGT  
CGCACAAGCGTGGATGATGGGATTAATTCGATGCAACCGGAAACCTTACTACCTTGTGACATGCCACTAAGCAAGCAGAGATGCACTAGGTCGCCGAAAGGGGAAAGTGGACACAGGTGTC  
TGATGGCTGTGCTGACTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGCACAAACCGGAGGAA  
GGTGGGGATGACGCAAGTCCCTATGCGCCCTTATGGGTAGGGCTTACACGCTCATACAATGGTTCGCTACAGAGGGTTCGCAACCCGCGAGGGGAGCTAATCCCGAAACCGCATCTGATGCT  
CGGATCGTAGTCTGCAACTGCACTACGTAAGCTGGAATCGTAGTAA

>LEM\_716

CCCCGAAAGGGGAGCGCAGCGGGTGAATACGCTGGGAACGTACCCCTTACTACGGAATAACGCGAGGAAACTTGTGCTAAATACCGTATGTGCCCTTGGGGGAAAGATTTATCGGTAA  
AGGATCGGCCCGCTGGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAAACTCTACG  
GGAGGCGCAGTGGGGAATATGGACAATGGCGCAAGCAATGATCCAGCCATGCCCCGTGAGTGAAGAGCCCTAGGGTGTGAAAGCTCTTTCACCGGAGAAAGTAAATGACGGTATCCGGA  
GAAGAAGACCGCCGCTTACTTTCGCGCAGCGCGGTAATACGAAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGCCGCTAAGCGCAGCAGTACGGGCTGATCACTGAGGAGTGAATCCGAAATCCCA  
GGCTCAACCTGGAACTGCTTTGATCTGCTGATCTGGAGTATGGAAGGAGTGAAGTGAATCCGAGGTGATGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCCAGTGGCGAAGGGCGCT  
TGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTTGATCTGCTGATCTGGAGTATGGAAGGAGTGAAGTGAATCCGAGGTGATGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCCAGTGGCGAAGGGCGCT  
GCTAACGCTAAACATTCGCCCTGGGGAGTACGGTCCGAAGATTAACCTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGCAAGCAACCGCCAGAACCTTA  
CCAGCCCTGACATGCCCGGCGACTGCAGAGATGACGGTTCCTTTCGGGACCGGGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG  
AGCGCAACCCCTGCCCTTAGTTGGCCAGCTTATGTTGGCCACTTAAGTGGGAGTCCGCGGTGATAAGCCGAGAGGAAAGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTATGGCCCTACGGGCTGGGGTAC  
ACAGCTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAGGCATCTCAGTTCCGATGTCGCACTCGAACCTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA  
TC

>LEM\_717

GGCGTAGCAATACGTCAGCGGACAGCGGGTGAATACCGCTGGGAACGTACATTTTGGTTCGGAACAACACAGGAAACTTGTGCTAAATACCGGATAAGCCCTTACGGGAAAGATTTATCGC  
CGAAAGATCGGCCCGCTGATAGTACTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTACTGGTCTGAGAGGATGATCAAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAAACTCTCT  
ACGGGAGGACAGTGGGGAATAATGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCCCCGTGAGTGAAGAGCCCTAGGGTGTGAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAAGTAAATGACGGTACCG  
CAAGAAATAGCCCGCGCTAATCTGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAAGGGGGCTACGCTTGTCCGAAATCACTGGCGTAAAGGGTGGCTAGGGCGGCTTTAAGTACGGGGTGAATCC  
TGGAGCTCAACTCCAGAACTGCCCTTTGATCTGCTGATCTGGAGTATGGAAGGAGTGAAGTGAATCCGAGGTGATGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCCAGTGGCGAAGGGCG  
TCACTGGCCGATACGACTGAGGCGCAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATAGATAGTCCCTGGTGTCCAGCCGCTAAACGATGAAATGCCAGCCGTTAGTGGGTTACTCACTAGTGGGG  
CAGTAAACCTTTAGCAATTCGCCCTGGGAGTACGGTCCGAAGTAAACCTGAAGAAATGACGGGGGCCGCAAGCCGTTGAGGATGTTAATTCGCAAGCAACCGCGCAAGCA  
TTACAGCCCTTTCAGATTCGCCCTGCGGACTCCAGAGAGGAGTTCCTCAGTTCGGCTGGAACGAGCAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
GCAACGAGCGCAACCCCGCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCAGCTTAAGGAGACTGCCGGTATAAGCCGCGAGGAAAGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTATGGCCCTACGGGCTGGGCT  
GGCTACACAGCTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGATGCTAAGGGGCGACCCCTTCGAAATCTCAAAAAGCCGCTCAGTTCCGATGTTGGGCTGCAACTCGAGCCATGAAGTTGGAATCGC  
TAGTAA

>LEM\_718

AGCGGGCGTAGCAATACGTCAGCGGACAGCGGGTGAATACCGCTGGGAACGTACCTTTTGGTTCGGAACAACCCAGGAAACTTGGGCTAATACCGGATAAGCCCTTACGGGAAAGATTT  
ATCCCGAAAGATCGGCCCGCTGATAGTACTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCAGTACTGGTCTGAGAGGATGATCAAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAAACTCTCT  
CTCCAGCGGAGCAGTGGGGAATAATGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCCCCGTGAGTGAAGAGCCCTAGGGTGTGAAAGCTCTTTTGTCCGGGAAAGTAAATGACGGTACCG  
TACCAGAAATAAGCCCGCGCTAATCTGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAAGGGGGCTACGCTTGTCCGAAATCACTGGCGTAAAGGGTGGCTAGGGCGGCTTTAAGTACGGGGTGA  
AAATCTGAGGACTCACTCCAGAACTGCCCTTTGATCTGACTGAAGATCTTGAATTCGGGAGAGGTGAGTGGAACTGCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCCAGTGGCG  
GGCGGCTCACTGGCCGATACTGAGCTGAGGCGCAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATAGATAGTCCCTGGTGTCCAGCCGCTAAACGATGAAATGCCAGCCGTTAGTGGGTTACTCACTA  
GTGGCGGAGCTAACGCTTTAGCAATTCGCCCTGGGAGTACGGTCCGAAGTAAACCTGAAGAAATGACGGGGGCCGCAAGCCGTTGAGGATGTTAATTCGCAAGCAACCGCGCAAGCA  
AGAACCTTACAGCCCTTGCATCCCGGCTGCGGACTCCAGAGACGAGTTCCTCAGTTCGGCTGGACCGGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG  
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGCTTAGTTGCTACCATTTAGTTGAGCAGCTTAAGGAGACTGCCGGTATAAGCCGCGAGGAAAGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTATGGCCCTACGGGCTGGGCT  
GGCTAGGGCTACACAGCTGCTACAATGGCGGTGACAATGGGATGCTAAGGGGCGACCCCTTCGAAATCTCAAAAAGCCGCTCAGTTCCGATGTTGGGCTGCAACTCGAGCCATGAAGTTGGAATCGC  
TAGTAA

>LEM\_719

CCCCGAAAGGGGAGCGGACAGCGGGTGAATACCGCTGGGAACGTACCCCTTACTACGGAATAACGCGAGGAAACTTGTGCTAAATACCGTATGTGCCCTTGGGGGAAAGATTTATCGGTAA  
AGGATCGGCCCGCTGGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAAACTCTCTACG  
GGAGGCGCAGTGGGGAATAATGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCCCCGTGAGTGAAGAGCCCTAGGGTGTGAAAGCTCTTTCACCGGAGAAAGTAAATGACGGTATCCGGA  
GAAGAAGCCCGCGCTAATCTGCTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAAGGGGGTACGCTTGTTCGAAATTAAGCCGCTAAGCGCAGCAGTACGGGCTGATCACTGAGGAGTGAATCCCA  
GGCTCAACCCGGAATGCCCTTTGATCTGCTGATGAGTGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGAACCCAGTGGCGAAGGGCGCTCA  
CTGGTCCATTTACTGAGCTGAGGTGGCAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATAGATACCCCTGGTGTCCAGCCGCTAAACGATGAAATGTTAGCCCTGGGCAAGTACTGTTCCGGTGGGCGAG  
CTAACACATTAACATTCGCCCTGGGAGTACGGTCCGCAAGATTAACCTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAAGCAACCGCGAGAACCTTAC  
CAGCCCTTGCATCCCGCGCTACCTGCAAGAGATGCAAGGTTCCCTTTCGGGAGCCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAAGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACCGGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAGGCATCTCAGTTCCGATGTCGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAAT

>LEM\_720

CCCCGAAAGGGGAGCGGACAGCGGGTGAATACCGCTGGGAACGTACCCCTTACTACGGAATAACGCGAGGAAACTTGTGCTAAATACCGTATGTGCCCTTGGGGGAAAGATTTATCGGTAA  
GATCGGCCCGCTGGATAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCATACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAAACTCTCTACGG  
GAGGACGAGTGGGGAATAATGGACAATGGCGCAAGCCGATCCAGCCATGCCCCGTGAGTGAAGAGCCCTAGGGTGTGAAAGCTCTTTCACCGGAGAAAGTAAATGACGGTATCCGGA  
AAGAAGCCCGCGCTAATCTGCTGCCAGCAGCCGCTAATACGAAAGGGGGTACGCTTGTTCGGAATTAAGCCGCTAAGCGCAGCAGTACGGGCTAAGCGGAGTACGGGATGAAATCCCG  
GGCTCAACCCGGAATGCCCTTGTGATGCTGCTGAGTATGGAAGGTTGAGTGGAAATTCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGCAAGCAACCGCGAGAACCGGCGCTCA  
CTGGTCCATTTACTGAGCTGAGGTGGCAAGCGGTGGGGAGCAACAGGATAGATACCCCTGGTGTCCAGCCGCTAAACGATGAAATGTTAGCCCTGGGCGAGTACTGTTCCGGTGGGCGAG  
CTAACGATTAACATTCGCCCTGGGAGTACGGTCCGCAAGTAAACCTCAAAGGAATGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAAGCAACCGCGAGAACCTTAC  
CAGCCCTTGCATCCCGCGCTACCTGCAAGAGATGCAAGGTTCCCTTTCGGGAGCCGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTATAAGCCGAGAGGAAAGTGGGATGAGCTCAAGTCCCTATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGTGGTACAGTGGGCGAGGACCGGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAGGCATCTCAGTTCCGATGTCGCACTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAAT

CGCAACCCCTGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGGGACTGCCGGTATAAGTCTAGAGAGAGTGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACAC  
ACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGACGCGAGCAGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCAATGAAGTT

## 10.6 Anexo 6. Secuencias gen *gyrB*

>LEM707

CACGCCGAGTTTGACGACAAGCAGCAACCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTATCCGGCGCCTGCA  
CGGCGTGGGCGTCTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGATGGCCAGGTGCACCTGATCGAATTCGCCAAGGGCGACGTACAGAACCAGCCTCGTGG  
AGACCGTGGCCGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCGCCGATGAAGATCATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGATGAGGAAATCTTCAACAC  
GTTGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCAAGCGCATCGCGAGCTCTCGTT

>LEM710

CCGAGCGCAGCGCGCCGAAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACAGAACAGCTACAAGTCTCGGGCGCCTGCACGGCGTGGGCGTCTCTGCTGAACGC  
ACTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGACGGCCAGGTCCACCTGATCGAGTTCCGCAAGGGCGATGTGCAGAACCCGATCATCGAGACCGTGGCCGGCCCCGACGGCCAGC  
CCGTTGAAGTCTCCCCGATGAAGTCTATCGGCCACCACAAAGCGCGCCACCGAAGTCCACTTCTGGCCGACGAAAGAAATCTTCAACACGTCGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCA  
AGCGCATTGCGGAGCTCTCGTTCTGAAACA

>LEM711

TCAAGTTGACGACAAGCAGCAACCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTCTCGGGCGCCTGCACGG  
CGTGGGCGTGTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGACGGCCAGGTCCACCTGATCGAGTTCCGCAAGGGCGATGTGCAGAACCCGATCATCGAGA  
CCGTGCCCGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCCCCGATGAAGTCTATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGACGAAAGAAATCTTCAACACGTC  
GAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCAAGCGCATTGCGGAGCTCTCGTTCTGA

>LEM715

CCCCTGCTCAAGTTGACGACAAGCAGCAACCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTCTCGGGCGCCT  
GCACGGCGTGGGCGTGTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGACGGCCAGGTCCACCTGATCGAATTCGCCAAGGGCGATGTGCAGAACCCGATCA  
TCGAGACCGTGGCCGGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCGCCGATGAAGATCATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGACGAAAGAAATCTTCAAC  
AACGTCGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCAAGCGCATTGCGGAGCTCTCGTTCC

>LEM705

ATTCGCCCCGTGTTCAAGTTGACGACAAGCAGCAGCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTATCCGGCG  
GCCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGATGGCCAGGTGCACCTGATCGAATTCGCCAAGGGCGACGTACAGAACCAGC  
ATCGTGCAGACCGTGGCCGGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCGCCGATGAAGATCATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGATGAGGAAATCTT  
CACCAACGTTGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCAAGCGCATTGCGGAGCTCTCGTTCT

>LEM712

ATTCGCCCCGTGTTCAAGTTGACGACAAGCAGCAGCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTCTCGGG  
CGGCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGACGGCCAGGTCCACCTGATCGAATTCGCCAAGGGCGATGTGCAGAACCC  
GCATCGTGCAGACCGTGGCCGGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCCCCGATGAAGATCATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGACGAAAGATC  
TTCACCAAGTCGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCAAGCGCATTGCGGAGCTCTCGTTCC

>LEM713

ATTCGCCCCGTGTTCAAGTTGACGACAAGCAGCAGCCAAAGCGCAGCGCGGCGAATCGCCATGACCGAGCTGCACGCCGGCGCAAGTTCAACCAAGACAGCTACAAGGTCTCGGG  
CGGCTGCACGGCGTGGGCGTGTCTGCTGAACCGCTCTCCAAAGTGGCTGCGCTGACCGTGCGCCGCGACGGCCAGGTCCACCTGATCGAATTCGCCAAGGGCGATGTGCAGAACCC  
GCATCGTGCAGACCGTGGCCGGCCCCGACGGCCAGCCGTTGAAGTCTCCCCGATGAAGATCATCGGCCACCACAAAGCGCGCCTGAAGTGCACCTTCTGGCCGACGAAAGATC  
TTCACCAAGTCGAGTTCCACTACGAGATCCTCTCCAAGCGCATTGCGGAGCTCTCGT