



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

---



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**“Estudio de la promoción en la germinación de *Pinus chiapensis* por parte de bacterias aisladas en rodales de esta especie”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA**

**Q.F.B. Bett Carolina Vera Cardoso**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. Ricardo Carreño López**

**Puebla, Pue.**

**Noviembre 2014**



**BUAP**

Puebla, Pue. a 15 de octubre 2014.

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

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **Bett Carolina Vera Cardoso**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

**“Estudio de la promoción en la germinación de *Pinus Chiapensis* por parte de bacterias aisladas en rodales de ésta especie”.**

A nuestro juicio, la alumna Vera Cardoso 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. Ricardo Carreño López

D.C. José Antonio Munive Hernández

D.C. Jesús Muñoz Rojas

D.C. Rebeca Martínez Contreras

*A veces sentimos que lo que hacemos es tan sólo una gota en el mar, pero el mar  
sería menos si le faltara una gota.*

*Madre Teresa de Calcuta.*

*A Dios, mi familia, amigos y a ti,  
por ser los motivos de todo.*

Agradezco a CONACyT por la beca otorgada durante el periodo de Agosto 2012 a Julio 2014 para la realización de mis estudios de maestría.

Del mismo modo agradezco a la VIEP por los recursos otorgados para la terminación de esta tesis y para la presentación de resultados de investigación en foros académicos Proyecto aprobado VIEP 2014: “Estudio de la microflora relacionada con la germinación y establecimiento de *Pinus chiapensis*, pino en amenaza de extinción”

A mis padres Sonia y Luis y a mi hermano José Luis les agradezco por su apoyo en cada nuevo camino emprendido.

Agradezco a mis amigos y compañeros por los momentos felices y de relajación, además por el apoyo y los consejos dados. Sin ellos hubiera enloquecido en mis momentos de frustración en el laboratorio.

De manera muy especial agradezco a Cristina Domínguez Castillo por sus enseñanzas y consejos en biología molecular, sin ella hubiera sido difícilísimo lograr esta parte. Además le doy gracias por su gran apoyo, consejos y compañía durante las horas de trabajo en el laboratorio.

Y te agradezco a ti amor mío, por tu enorme apoyo y consejos, no sólo en relación al trabajo sino también a la vida, por tu tiempo y por siempre tener palabras de aliento, miles de sonrisas, abrazos, besos y un enorme amor y cariño para mí.

**Resumen.**

*Pinus chiapensis* es una especie ubicada en bosques de clima templado que ha visto mermadas sus poblaciones debido quizás a efectos antropogénicos. En la sierra norte del estado de Puebla se pueden ubicar rodales alterados y no alterados de este pino, cuyas características son el tener poblaciones disminuidas y en edades adultas; y poblaciones más densas y en diversas edades, respectivamente. Estos datos sugieren una posible ausencia de germinación en rodales alterados de este pino. Por ello, se tomaron muestras de suelo a diferentes profundidades y de rizósfera, con el propósito de aislar bacterias que pudieran provocar un efecto positivo en la germinación de esta especie, y así dar un primer paso en su restablecimiento. Se obtuvieron 191 aislados bacterianos de los cuales 10 resultaron disminuir los tiempos de germinación, siendo las cepas 24 y 40 las mejores en éste aspecto, sin embargo en cuanto a la longitud y peso de los germinados no se observó una mejora con respecto a los controles no inoculados. A pesar de mostrar una producción de ácido indol-3-acético dentro de los rangos benéficos para la promoción del crecimiento en plantas, no se encontró relación entre dicha producción y las longitudes y pesos frescos de los germinados. Las cepas 24 y 40 se identificaron usando secuencias correspondientes a los genes 16SrDNA y *rpoB*, resultando pertenecer al género *Enterobacter*, el cual incluye especies que promueven el crecimiento de algunas plantas mediante la producción de ácido indol-3-acético y el biocontrol de algunos fitopatógenos.

**Índice general**

1. Introducción.....	1
1.1 El bosque mesófilo de montaña.....	1
1.2 Generalidades de <i>Pinus chiapensis</i> .....	2
1.3 <i>Pinus chiapensis</i> , especie con protección especial.....	3
2. Antecedentes.....	5
3. Justificación.....	7
4. Hipótesis.....	8
5. Objetivo general.....	8
6. Objetivos particulares.....	8
7. Material y métodos.....	9
7.1 Zonas de muestreo.....	9
7.2 Recolección de muestras.....	9
7.3 Aislamientos bacterianos.....	10
7.4 Curvas de crecimiento.....	10
7.5 Estandarización de inóculos bacterianos.....	11
7.6 Selección de semillas de <i>Pinus chiapensis</i> .....	11
7.7 Pruebas de germinación <i>in vitro</i> .....	11
7.8 Determinación de indoles totales.....	12
7.9 Identificación molecular de las cepas promotoras de la germinación de <i>Pinus chiapensis</i> .....	13
7.10 Clonación.....	14
7.11 Análisis de secuencias.....	15
7.12 Árboles filogenéticos.....	16
8. Resultados y discusión.....	17
8.1 Zonas de muestreo y recolección de muestras.....	17
8.2 Aislamientos bacterianos.....	21
8.3 Análisis de la germinación de <i>Pinus chiapensis</i> en semillas inoculadas con bacterias.....	22
8.4 Identificación de cepas aisladas.....	29
8.5 Árboles filogenéticos.....	33
9. Conclusiones.....	36
10. Perspectivas.....	37

11. Bibliografía.....	38
12. Anexos.....	46
12.1 Medios de cultivo.....	46
12.2 Soluciones.....	48
12.3 Procedimientos.....	49

**Índice de figuras.**

Fig. 1. Mapa de ubicación de las zonas de muestreo.....	9
Fig. 2. Representación gráfica de amplicones.....	14
Fig. 3. Condiciones de PCR utilizadas.....	14
Fig. 4. Vector de clonación.....	15
Fig. 5. Rodales de <i>Pinus chiapensis</i> .....	18
Fig. 6. Pinos en rodales muestreados.....	19
Fig. 7. Curvas de crecimiento.....	23
Fig. 8. ANOVA simple para inicio de germinación.....	24
Fig. 9. ANOVA simple para longitud.....	25
Fig. 10. ANOVA simple para peso fresco.....	26
Fig. 11. Gráficos de indoles totales.....	28
Fig. 12. Electroforesis de los amplificadores obtenidos .....	30
Fig. 13. Diagrama de clonación .....	31
Fig. 14. Árboles filogenéticos correspondientes a la cepa 24.....	33
Fig. 15. Árboles filogenéticos correspondientes a la cepa 40.....	34

**Índice de tablas.**

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores del gen 16SrDNA y <i>rpoB</i> .....	13
Tabla 2. Zonas de muestreo y sus características climáticas.....	17
Tabla 3. Ubicación de las muestras microbiológicas de cada rodal.....	19
Tabla 4. Examen fisicoquímico de cada rodal.....	20
Tabla 5. Cepa aisladas y número de muestras por rodal.....	21
Tabla 6. Origen de las cepas aisladas.....	22
Tabla 7. Resultado del alineamiento realizado en BLAST.....	32

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 El bosque mesófilo de montaña.

Se calcula que en el año 2010 el área total de bosques en el mundo sumaba aproximadamente 4 000 millones de hectáreas, no estando distribuidas de manera homogénea entre todos los países del mundo. Además, cerca de 13 millones de hectáreas de este ecosistema se transformaron para usos agrícolas principalmente o se perdieron por causas naturales en la última década (FAO, 2011).

México ocupa uno de los primeros lugares en cuanto a superficie mundial cubierta por bosques, observándose que en el periodo de 2000-2005 hubo una pérdida anual de 235 mil hectáreas de bosques y selvas, mientras que para el periodo de 2005-2010 la cifra disminuyó a 155 mil hectáreas anuales (CONABIO, 2010; FAO, 2011).

El bosque mesófilo de montaña es uno de los ecosistemas más amenazados en nuestro país (López-Pérez *et al.*, 2011), este ecosistema posee una composición de especies muy diversa. A nivel de sotobosque se encuentra conformado por especies tropicales perennifolias, como arbustos de las familias *Acanthaceae*, *Rubiaceae* y *Myrsinaceae*. En las copas de los árboles abundan epífitas de las familias *Orchidaceae*, *Bromeliaceae*, *Piperaceae* y *Araceae*. Además presenta un dosel conformado por especies vegetales tales como árboles de hojas caducifolias de clima templado como lo son liquidámbar (*Liquidambar* sp.), encinos (*Quercus* sp.), hayas (*Fagus* sp.) y pinos (*Pinus* sp.) (Rzedowski, 1996), siendo de especial importancia este último género para el presente estudio.

En México podemos encontrar alrededor de 82 especies de pinos como lo son *P. engelmani*, *P. cooperi*, *P. durangensis*, *P. arizonica*, *P. contorta*, *P. jeffreyi*, *P. chiapensis*, etc., de las cuales 56 son especies endémicas de nuestro país, siendo objeto de estudio para el presente trabajo *Pinus chiapensis*, el cual puede encontrarse sólo en lugares específicos de los estados de Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Guerrero y Puebla, pero además en algunas zonas de Guatemala (Mirov, 1954; Martínez-Carrasco, 1998; del Castillo *et al.*, 2009).

## 1.2 Generalidades de *Pinus chiapensis*.

*Pinus chiapensis* inicialmente fue confundido con *Pinus strobus*, a pesar de que este último es una especie nativa de América del Norte. Pareció habersele encontrado por primera vez en el estado de Chiapas en 1940 sin que se le hubiera visto anteriormente en el norte o centro de México, por lo que se pensó que se trataba de pinos cultivados; sin embargo, contrario a lo que se pensaba se trataba de árboles silvestres, por lo que Martínez (quien describió por primera vez a este pino) realizó una comparación entre los árboles de América del Norte y los ubicados en Chiapas, donde no encontró diferencias significativas, sólo en las hojas, que son más delgadas y finas y en los canales resiníferos que en vez de dos, son tres, por lo que lo designó como variedad *Pinus strobus* L. (Andressen, 1964).

Posteriormente Andressen recomendó que fuera elevado a la variedad *Pinus strobus* var. *chiapensis*, basándose en evidencias obtenidas por estudios de morfología y datos de progenie, además de observaciones de campo, haciéndose evidente de esta manera que debería ser elevado a especie, conociéndosele a partir de ese momento como *Pinus chiapensis* (Martínez) Andressen (Loock, 1950; Dressler, 1954; Andressen, 1964; Martínez- Chávez, 2000).

Éste es un árbol que se encuentra ubicado preferentemente en suelos ácidos (pH: 4.5-5.5), bien drenados y con una profundidad mayor a 1 m, en laderas bajas de las montañas y cañones aislados entre los 1 200 y 1 800 m de altitud. Posee un tronco recto con una altura de 20 a 25 m y un diámetro de 1 m aproximadamente. Su corteza es muy fisurada, pero fuerte en árboles adultos, parecida a la del roble; en árboles jóvenes en la parte superior del tallo y hojas es lisa y de un color que va de verde a gris tenue. Sus ramas son extendidas, largas y más o menos horizontales, con hojas dispuestas en fascículos de cinco aglomerados en los extremos de las ramas, formando especies de penachos que miden de 8 a 12 cm de longitud, siendo de color verde claro. Las piñas son escamosas, midiendo de 13 a 15 cm de longitud, con un color café amarillento, caracterizadas por poseer pedúnculo encorvado con 28 a 35 mm de longitud, a diferencia de los de otras especies de pinos. Sus semillas son de color café oscuro y pequeñas. Este árbol crece en un rango de temperatura entre los 20 y 22 °C, con precipitaciones que van de los 1500 a 2000 mm (Andressen, 1964; Vilela y Acosta, 2001; Sánchez-Vargas y del Castillo-Sánchez, 2001).

En las zonas en las que se ubica *Pinus chiapensis*, se encuentra asociado con *Pinus pseudostrabus*, *Liquidambar styraciflua*, *Ostrya* sp. y *Platanus* sp. (Newton *et al.*, 2002).

*Pinus chiapensis* posee diversos nombres que le han sido conferidos por parte de los pobladores residentes en las regiones adyacentes a su ubicación, entre los que se puede mencionar: pinocote, acalocote, ocote, acahuite, ayacahuite (en lengua náhuatl). Al menos doce grupos étnicos reconocen este pino por sus propiedades tanto medicinales como por su utilidad local, entre los que se encuentran canjobales, chatinos, hinantecas, cuicatecas, mazatecas, mixes, mixtecas, triquis, tzetzales, tzotziles, zapotecas y zoques. La madera de este pino es bastante apreciada por los residentes de las áreas en las que se encuentra, utilizándola para la construcción de casas y muebles debido a su ligereza, suavidad y uniformidad, además es usada para la cocina y su pulpa en la fabricación de papel. También las cualidades de sus semillas y resina son aprovechadas para propósitos medicinales, como aliviar el dolor reumático, además de utilizarse en infusiones para el alivio de la tos, etc. (Rodríguez-Acosta y Arteaga-Martínez, 2005; del Castillo *et al.*, 2009).

### **1.3 *Pinus chiapensis*, especie con protección especial.**

La pérdida de ecosistemas naturales es un problema mundial. El cambio neto en área cubierta por bosque en el período 2000-2010 se estimó en 5.2 millones de hectáreas por año. México ocupa el 12° lugar en cuanto a superficie de bosques y selvas, después de Brasil, Estados Unidos, Canadá, China, Indonesia, Perú, India, Sudán, etc., sin embargo está posicionado en el lugar número 51 según su tasa de cambio, con 0.3% anual en pérdida de superficie cubierta de bosques y selvas en el periodo de 2000-2010 (SEDESOL, 1994; FAO, 2011).

El uso indiscriminado de los recursos naturales por parte del hombre ha afectado de manera importante zonas forestales a causa de la tala de árboles, no sólo para aprovechar los beneficios que ofrecen éstos, sino también, para establecer campos de cultivo y para abrir paso a infraestructura necesaria para el desarrollo del hombre, como lo son las carreteras, casas, etc., afectando significativamente a todo lo que comprende este ecosistema, que va desde la pérdida de diversidad biológica (flora, fauna y microbiota), pérdida de productos maderables, disminución de la producción de oxígeno, fijación de carbono, mantenimiento del ciclo del agua, etc., provocando inundaciones, deslaves, menor

disponibilidad de agua, enfermedades y plagas en árboles, así como erosión del suelo con un consecuente drástico cambio climático.

En base a la Norma Oficial Mexicana de Protección Ambiental a Especies Nativas de México de Flora y Fauna (1994), varias especies de *Pinus* se han catalogado como especies con protección especial debido a la disminución de sus poblaciones en las zonas en la que se ubican, dentro de las cuales se encuentran especies endémicas como: *P. catarinae*, *P. culminicola*, *P. johannis*, *P. lagunae*, *P. martinezii*, *P. maximartinezii*, *P. nelsoni*, *P. pinceana*, *P. rzedowskii*, *P. flahautti*, *P. guineri*, *P. macropelis*, y *P. rehderi*; además de especies no endémicas como: *P. chiapensis*, *P. attenuata*, *P. caribaea*, *P. contorta*, *P. coulteri*, *P. edulis*, *P. flexilis*, *P. jaliscana*, *P. jeffreyi*, *P. monophyla*, *P. muricata*, *P. quadrifolia*, y *P. reflexia* (SEDESOL, 2001; Sánchez Vargas y del Castillo Sánchez, 2001).

Ya se han hecho estudios en los que se ha observado que la asociación de diferentes clases de bacterias a pinos varía entre un tipo de suelo y otro dependiendo del grado de perturbación encontrado, el cual se define en base a criterios propios y convenientes a las investigaciones realizadas, siendo identificadas las bacterias con secuencias pertenecientes al gen 16SrDNA (ver Antecedentes). En base a estos estudios previos y con la problemática de encontrar a *Pinus chiapensis* como una especie con protección especial de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de Protección Ambiental a Especies Nativas de México de Flora y Fauna, en el presente estudio se pretende aislar e identificar bacterias que promuevan la germinación de *Pinus chiapensis*, para así lograr el restablecimiento de esta especie en la sierra norte del estado de Puebla.

## 2. ANTECEDENTES.

Para el presente estudio no se cuentan con antecedentes directos, sin embargo otros trabajos se han realizado en cuanto al aislamiento e identificación de bacterias asociadas a pinos, como es el caso de *Pinus contorta*, donde Chow *et al.* (2002) caracterizaron bacterias aisladas de suelos canadienses con diferentes grados de perturbación, esto en base a sus criterios establecidos por la cantidad de materia orgánica presente y por la compactación del suelo. La identificación de las comunidades bacterianas se realizó mediante el análisis de secuencias del gen 16SrDNA, encontrando en mayor proporción  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -Proteobacterias así como *Verrumicrobia*, no observándose variaciones entre los diferentes tipos de suelos muestreados.

Así mismo, Hackl *et al.* (2004) realizaron aislamientos de bacterias en suelos de bosques austriacos, los cuales difieren en sus características químicas, biomasa microbiana y cantidad de nutrientes disponibles. La identificación de bacterias presentes en estos suelos se realizó mediante el análisis de secuencias del gen 16SrDNA. La proporción de bacterias presentes en cada tipo de suelo difieren entre sí, observándose que se encuentran en mayor proporción en bosque de robles,  $\alpha$ -Proteobacteria, *Holophaga* y *Acidobacterium*; en bosque de abetos *Holophaga*, *Acidobacterium*, *Verrumicrobia* y  $\alpha$ -Proteobacteria; y en bosque de pinos bacterias Gram positivas con alto contenido de GC,  $\beta$ -Proteobacteria y *Verrumicrobiales*.

Lau *et al.* (2007) buscaron la presencia de bacterias metanotróficas en suelos forestales de Harvard mediante el análisis de secuencias de genes como el 16SrDNA y *pmoA/amoA* (genes codificantes para las enzimas metano monooxigenasa y amonio monooxigenasa, respectivamente). Los resultados obtenidos indican que la presencia de bacterias del género *Methylocystaceae* es mayor que las del género *Methyloccocaceae*.

Además en Guaira, São Paulo Brasil, se caracterizaron poblaciones bacterianas en dos tipos diferentes de suelos, uno dedicado al cultivo de maíz, frijol y tomate y otro perteneciente a bosque. Pereira *et al.* (2006) empleando secuencias del gen 16SrDNA pudieron identificar phyla como *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*, observando que existe una mayor diversidad de

especies bacterianas presentes en suelos forestales que aquellos dedicados a la agricultura, al menos en Brasil.

Por otro lado, la rizósfera de *Pinus radiata* genéticamente modificados, fue muestreada durante 2 años consecutivos por Lottman *et al.* (2010), quienes caracterizaron las comunidades bacterianas presentes mediante el análisis de secuencias del gen 16SrDNA. Con este estudio se pudo observar que a pesar de lo reportado en cuanto a la variabilidad de especies bacterianas y fúngicas asociadas a plantas de diferentes especies, en el caso de pinos genéticamente modificados pertenecientes a una misma especie, no existe gran variabilidad de bacterias asociadas entre una y otra y además la prevalencia de éstas se mantiene durante las diferentes estaciones del año.

Pirtilâ *et al.* (2000) mediante el análisis de secuencias del gen 16SrDNA, se identificó la presencia de *Methylobacterium extorquens* y *Pseudomonas synxantha* en tejidos meristemáticos de *Pinus sylvestris* L. y se observó que la presencia de una bacteria es mayor que la otra, respectivamente, en tejidos de este pino.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la pérdida de superficie de bosques y selvas que México ha experimentado en la última década, además de la necesaria protección a especies de flora endémica y no endémica como lo es *Pinus chiapensis*, ha surgido la necesidad del desarrollo de estrategias que permitan el restablecimiento de estas especies, siendo una primera opción la búsqueda de bacterias que puedan promover la germinación y desarrollo de este pino a través de mecanismos propios de las mismas bacterias. Por lo que en el presente estudio se pretende el aislamiento de bacterias provenientes de los mismos rodales no alterados de *Pinus chiapensis* ubicados en la sierra norte del estado de Puebla que promuevan su germinación y desarrollo, y por tanto su restablecimiento.

#### **4. HIPÓTESIS.**

Las bacterias presentes en rodales no alterados de *Pinus chiapensis* pueden promover la germinación de éste, no así en el caso de aquellas provenientes de rodales alterados de este pino.

#### **5. OBJETIVO GENERAL.**

Estudiar la promoción en la germinación de *Pinus chiapensis* por parte de bacterias aisladas de rodales de esta especie.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Aislar bacterias asociadas a *Pinus chiapensis* de rodales alterados y no alterados.
2. Estudiar el efecto de las bacterias aisladas en la germinación de *Pinus chiapensis*.
3. Identificar parcialmente aquellas bacterias que muestren un efecto positivo en la germinación de *Pinus chiapensis*.
4. Determinar la producción de índoles totales por parte de las bacterias que muestren un efecto positivo en la germinación de *Pinus chiapensis*.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 7.1 Zonas de muestreo.

Para la selección de las zonas de muestreo e identificación de *Pinus chiapensis*, se contó con la colaboración del D.C. Conrado Parraguirre Lezama y del Ing. Alfredo Gil Garcés (Unidad agroforestal BUAP, Tetela de Ocampo, Puebla). En el proceso de identificación de este pino se observaron las fisuras presentes en su corteza y la asociación de bromelias a su alrededor, además de la apariencia de sus piñas, las cuales son muy alargadas, resinosas y cuentan con la presencia de un pedúnculo encorvado.

Las zonas muestreadas fueron los municipios de Cuautempan cuyas coordenadas son  $19^{\circ} 54' 57.4''$  (N) y  $97^{\circ} 48' 10.9''$  (O); Hueyapan con coordenadas  $19^{\circ} 54' .7''$  (N) y  $97^{\circ} 24' 31.2''$  (O); y Apulco con coordenadas  $19^{\circ} 55' 03.04''$  (N) y  $97^{\circ} 36' 27.00''$  (O). Estos municipios están ubicados en la sierra norte del estado de Puebla (Fig. 1).



Fig. 1. Mapa de ubicación de las zonas de muestreo. A. Cuautempan, B. Hueyapan, C. Apulco.

### 7.2 Recolección de muestras.

Las muestras microbiológicas se obtuvieron de diferentes puntos:

- 1) Rizósfera (parte del suelo inmediato a las raíces)

- 2) Profundidades de 5, 15 y 20 cm, tomando en cuenta la media sombra del pino (aproximadamente se tomó 50 g de suelo para cada profundidad)
- 3) Hojarasca
- 4) Conos

En cuanto a la recolección de muestras destinadas al examen fisicoquímico, se utilizó el criterio de muestreo aleatorio, en donde se toman muestras (aproximadamente 500 g) a la mitad de la distancia de uno y otro pino a muestrear para posteriormente ser homogenizadas (Osorio, 2002).

Cabe señalar que posterior a cada toma de muestra microbiológica, así como para muestras destinadas al examen fisicoquímico, el material utilizado fue lavándose con agua corriente verificando la eliminación de restos de suelo o materia orgánica para luego ser desinfectado con etanol al 100% y fuego. Para la recolección de todas las muestras se utilizaron guantes, bolsas y tubos plásticos estériles.

### **7.3 Aislamientos bacterianos.**

Una vez obtenidas las muestras de trabajo, se tomaron 50 mg de muestra obtenida, se colocaron en tubos Eppendorff estériles que contenían 900  $\mu$ l de agua destilada estéril, para hacerse diluciones seriadas, partiendo de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-10}$ , posteriormente se inocularon 10  $\mu$ l de cada una de las diluciones hechas, en diferentes medios de cultivo sólidos (para éste procedimiento se utilizaron los medios de cultivo descritos en el apartado de Anexos, a excepción del medio King B), incubándose durante una semana a 28 y 37°C.

Durante una semana se revisaron diariamente los crecimientos bacterianos para poder aislar las colonias crecidas en base a su morfología. Las cepas obtenidas se conservaron a -80°C.

### **7.4 Curvas de crecimiento.**

Se puso un pre cultivo de 250 ml en caldo LB durante 16 hrs de las cepas 1, 6, 23A, 23B, 24, 40, 45, 10, 15A y 15B, incubándose en agitación a 28°C. Posterior a esto se tomó 1 ml del pre cultivo y se transfirió a 50 ml de caldo LB, incubándose en agitación a 28°C. A

partir de este punto se comenzó a medir la densidad óptica (600 nm) de los cultivos cada 30 min hasta completar 8 hrs. Cabe señalar que únicamente estas determinaciones se realizaron con las 10 cepas mencionadas (2 repeticiones), en base a los resultados obtenidos en pruebas preliminares de germinación *in vitro* (datos no mostrados), las cuales sirvieron como cribado para esta determinación, pruebas de germinación *in vitro* y determinación de índoles totales. Los resultados obtenidos se graficaron en Microsoft Excel.

### **7.5 Estandarización de inóculos bacterianos.**

Los inóculos bacterianos se definieron con base en los datos arrojados por las curvas de crecimiento. La alícuota para inocular las semillas de *Pinus chiapensis* se tomó a las 16 hrs de crecimiento, donde la densidad óptica de los cultivos va de 1.8 a 2.0, determinada a 600 nm (dato no mostrado; sin embargo, en cada repetición experimental la densidad óptica de los cultivos a utilizar fue determinada, observándose la misma tendencia siempre; donde la densidad óptica de las cepas 1, 45 y 10 oscila en 2.7, fluctuando para el resto de las cepas entre 1.8 y 2.0) que aproximadamente corresponde a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, cantidad que se utiliza en la inoculación de bacterias en algunas semillas para el estudio de los efectos que ejercen las bacterias sobre éstas (Masciarelli *et al.*, 2013).

### **7.6 Selección de semillas de *Pinus chiapensis*.**

Las semillas utilizadas de *Pinus chiapensis* fueron solicitadas y facilitadas por CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). Estas semillas certificadas, se almacenaron inicialmente a 4°C, ya que se sugiere que para una mejor, más rápida y sincronizada germinación, esta temperatura es la adecuada (CATIE, 2000). Durante la selección de éstas se verificó que se encontraran en buen estado, es decir, con una superficie uniforme y sin que presentaran daño mecánico (rotas, huecas o sin la presencia del embrión), además sin la evidencia de manchas que pudieran indicar la presencia de hongos.

### **7.7 Pruebas de germinación *in vitro*.**

Para realizar las pruebas de germinación *in vitro*, a las semillas seleccionadas de *Pinus chiapensis* se les realizó un lavado con Tween 20 al 0.20% enjuagándose con agua destilada estéril 3 veces, posteriormente se aplicó una esterilización superficial utilizando

una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante 10 min, transcurrido este tiempo se realizaron nuevamente 3 lavados con agua destilada estéril, dejándose secar el agua aproximadamente 1 h., todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad (CATIE, 2000). Una vez transcurrido este tiempo, se fueron colocando 10 semillas en cajas Petri con agar/agua al 0.8%, para después ser inoculadas con 10  $\mu$ l de cada uno de los cultivos de las bacterias aisladas con una densidad óptica entre 1.8 y 2.0. Es de notar que en un cribado previo (2 repeticiones, dato no mostrado), se utilizaron todas las bacterias aisladas en un principio, y basándonos en los resultados obtenidos, las posteriores pruebas de germinación *in vitro* se repitieron 4 veces únicamente con las cepas 1, 6, 23A, 23B, 24, 40, 45, 10, 15A y 15B, con los datos obtenidos se realizó un ANOVA simple en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

Estas pruebas se monitorearon durante 30 días, revisándose diariamente las semillas para poder ir verificando los brotes. Una vez que las semillas brotaron, se dejaron crecer durante 10 días más para luego ser medidas en longitud y peso fresco, esto se realizó únicamente con las cepas 24 y 40 que fueron aquellas que mostraron una disminución en los tiempos de germinación de acuerdo a los datos obtenidos en las pruebas de germinación *in vitro* que se repitieron 4 veces. Con estos datos se realizó un ANOVA simple en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### **7.8 Determinación de indoles totales.**

A las cepas 24 y 40 (a las cuales se les determino longitud y peso fresco de los germinados) se les realizó una determinación de indoles totales en base a lo reportado por Glickmann y Dessaux (1995), en donde se utiliza el reactivo PC de Salkowski (ver Anexos) que ofrece una rápida y sencilla determinación de indoles totales mediante una reacción colorimétrica. Además basándose en lo descrito por Manulis *et al.* (1991), Glickmann y Dessaux (1995) y Szkop y Orzechowski (2012) se utilizó para el crecimiento de ambas cepas, caldo de cultivo King B suplementado con triptófano (aminoácido precursor en la síntesis de indoles) (ver Anexos), el cual ofrece una máxima producción de indoles en miembros de las familias *Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*, siendo en este caso también efectivo.

Inicialmente, se pusieron en 50 ml de caldo King B (ver Anexo) pre cultivos de 16 hrs de cada una de las bacterias mencionadas, incubándose en agitación a 28°C. Posterior a esto se tomó 1 ml de pre cultivo y se transfirió a otros 50 ml de caldo King B incubándose en las mismas condiciones mencionadas. A partir de esto, se tomó 1 ml de cultivo el cual se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min para después tomar 500 µl del sobrenadante, el cual se colocó en una celda plástica de medición para espectrofotómetro en donde se adicionaron 500 µl de reactivo PC de Salkowski, dejándose incubar 30 min en oscuridad. Pasado ese tiempo se procedió a medir la densidad óptica a 540 nm. Estas mediciones se realizaron a las 24, 48 y 74 hrs de crecimiento.

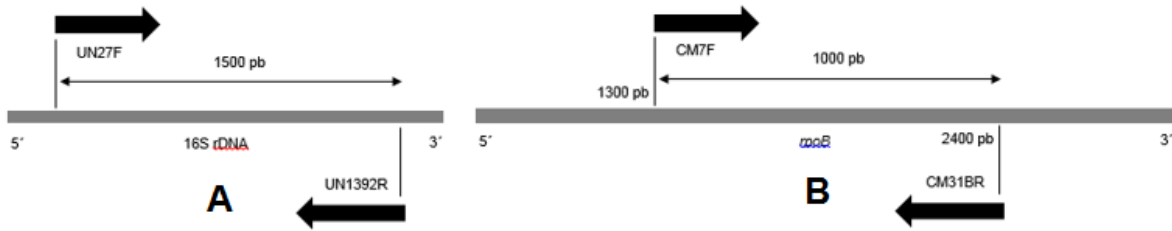
Los resultados obtenidos en esta prueba se expresaron en µg de indol/µg de proteína, para poder lograr esto se utilizó una curva de calibración de proteínas totales, en donde se utilizaron las células provenientes de las alícuotas usadas en la determinación de indoles totales (ver Anexos). Una vez obtenidas las densidades ópticas medidas a 595 nm, los resultados fueron graficados y mediante una regresión lineal se extrapolaron los valores obtenidos en la medición de indoles totales con los obtenidos en la cuantificación de proteínas. Con estos datos se realizó un ANOVA simple en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

### 7.9 Identificación molecular de las cepas promotoras de la germinación de *Pinus chiapensis*.

Para la identificación de las cepas 24 y 40, que fueron seleccionadas por mostrar una disminución en el tiempo de germinación respecto al control no inoculado, se analizaron secuencias correspondientes a los genes 16SrDNA y *rpoB*, para lo que se utilizaron dos pares de iniciadores universales que permiten amplificar una región de aproximadamente 1500 pb del gen 16SrDNA y 1000 pb del gen *rpoB* (Tabla 1, Fig 2).

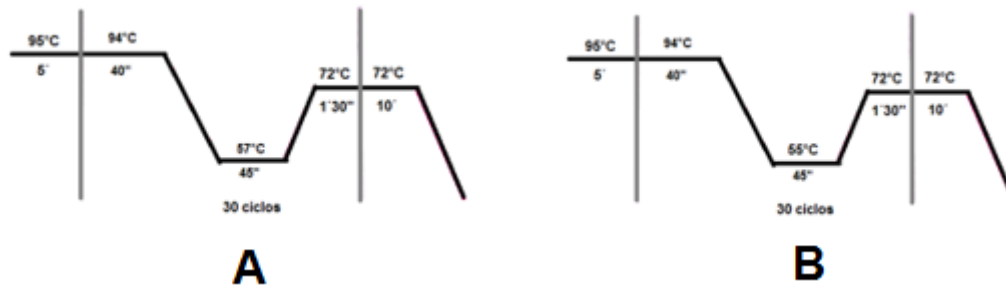
**Tabla 1.** Secuencias de los iniciadores del gen 16SrDNA (Barghouthi, 2011) y del gen *rpoB* (Mollet *et al.*, 1997).

Nombre	Secuencia	Tm
<b>UN27F (16SrDNA)</b>	TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	64.9°C
<b>UN1392R (16SrDNA)</b>	CAG GGG CGG TGT GTA CA	66.3°C
<b>CM7F (<i>rpoB</i>)</b>	AACCAGTTCGCGTTGGCCTGG	68.3°C
<b>CM31BR (<i>rpoB</i>)</b>	CCTGAACAACACGCTCGGA	62.3°C



**Fig. 2.** Representación gráfica de los amplicones correspondientes a los genes 16SrDNA (A) y *rpoB* (B). Se muestran los pares de iniciadores correspondientes a cada gen, así como la longitud de las regiones amplificadas por éstos.

Las reacciones de PCR se realizaron para las cepas 24 y 40, usando las mismas condiciones para ambas (Fig. 3). En estas reacciones de 25  $\mu$ l se mezclaron 7.9  $\mu$ l de agua inyectable, 2.5  $\mu$ l de Buffer (10X), 2.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (10X), 3.0  $\mu$ l de cada iniciador [10 pM] correspondientes a cada gen (Tabla 1), 5.2  $\mu$ l de una mezcla de dNTP's [1.25 mM], 0.5  $\mu$ l de templado de DNA y 0.4  $\mu$ l de Taq Polimerasa (Thermo Scientific).

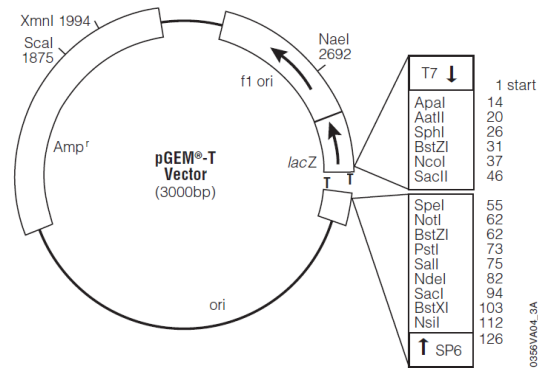


**Fig. 3.** Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación de las secuencias de los genes 16SrDNA (A) y *rpoB* (B). Se muestran las temperaturas, los tiempos y el número de ciclos utilizados.

## 7.10 Clonación

Una vez que se obtuvieron los amplicados de los genes 16SrDNA y *rpoB*, éstos se purificaron mediante precipitación con sílica (ver Anexos), para posteriormente clonarse en el vector pGEM-T (Promega) (Fig. 4).

Las reacciones de ligación se dejaron toda la noche a temperatura ambiente. En esta reacción de 10  $\mu$ l se mezclaron 3  $\mu$ l de Buffer (2X), 0.5  $\mu$ l de vector, 0.5  $\mu$ l de ligasa, 1  $\mu$ l de DNA y 5  $\mu$ l de agua inyectable.



**Fig. 4.** Vector de clonación pGEM-T (Promega). Se muestran las regiones que lo componen, los sitios de corte para enzimas de restricción, así como el sitio de multiclonado.

Posterior a esto, se transformaron 150  $\mu$ l de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con la reacción completa de ligación (ver Anexos). Las células fueron cultivadas en caldo LB durante 1 h a 37°C en agitación, para posteriormente ser transferidas a medio LB sólido suplementado con ampicilina y X-gal como marcadores de selección de las clonas e incubarse nuevamente a 37°C durante 16 h.

Para la verificación de la inserción de las regiones amplificadas del gen 16SrDNA y *rpoB* al vector pGEM-T (Promega) se realizó una PCR con los mismos pares de iniciadores correspondientes a cada gen así como las mismas cantidades y condiciones usadas en las primeras reacciones (Tabla 1, Fig. 3).

### 7.11 Análisis de secuencias.

Una vez obtenidas las clonas de 16SrDNA y *rpoB* (p2416S, p24rpoB, p4016S y p40rpoB) y de haberse verificado, se mandaron a secuenciar los plásmidos correspondientes, utilizando el par de iniciadores universales T7 y SP6 cuyas secuencias están contenidas en el vector pGEM-T (Promega) (Fig. 4).

Ya obtenidas las secuencias de interés se revisó el electroferograma resultante y después se identificaron y removieron las regiones contaminantes del vector con ayuda de VecScreen y EditSeq<sup>TM</sup>. Contando ya con las secuencias del gen de interés, se realizó un empalme de las secuencias delantera y reversa, para ser alineadas e identificadas empleando el programa BLAST, disponible en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 7.12 Árboles filogenéticos.

Se realizaron árboles filogenéticos con las cepas 24 y 40, que como ya se mencionó anteriormente, mostraron una disminución en el tiempo de germinación respecto al control no inoculado y que además fueron a las que se les realizó la amplificación de las secuencias de los genes 16SrDNA y *rpoB*. Para ésto se buscaron secuencias filogenéticamente cercanas de los genes 16SrDNA y *rpoB* según los resultados arrojados por la base de datos NCBI, para después ser alineadas con ClustalX2 (.clustal), posteriormente importándose los archivos en GeneDoc (.aa) en donde fueron editadas, para después importarse los nuevos archivos ya editados en MEGA6 (.meg) donde fueron construidos los árboles filogenéticos de ambas cepas utilizando el método de máxima verosimilitud.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 8.1 Zonas de muestreo y recolección de muestras.

Las regiones muestreadas fueron los municipios de Cuautempan, Hueyapan y Apulco ubicados en la sierra norte del estado de Puebla (Fig. 1), las cuales poseen una humedad de 53.2, 52.3 y 67.3%; en cuanto a presión atmosférica se refiere los valores van de 858.3, 845.5 y 1013; y en altitud se ubican a los 1377, 1500 y 1326 m, respectivamente. Además estos municipios se caracterizan por estar cubiertos de bosque mesófilo montaña, contando con un clima de transición, que va de subtropical a templado frío (Tabla 2). Los datos anteriores coinciden con lo descrito por Rodríguez-Acosta y Arteaga-Martínez (2005), quienes indican que las zonas en las que se ubica *Pinus chiapensis* son los estados de Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Chiapas y Puebla, donde en este último estado, se puede ubicar a esta especie en la sierra norte en los municipios de Yaonáhuac y Tetela de Ocampo. Además CONAFOR en sus fichas técnicas de reforestación (2007) indica que la altitud promedio de ubicación de *Pinus chiapensis* va de los 1500 a 1800 m con un clima de 20 a 22°C, ubicándose las características climatológicas de las zonas muestreadas dentro de éstos valores reportados.

**Tabla 2.** Zonas de muestreo y sus características climáticas.

Lugar	Humedad (%)	P. atm.	Altitud (m)	Latitud (N)	Latitud (O)
<b>Cuautempan</b>	53.2	858.3	1377	19° 54' 57.4"	97° 48' 10.9"
<b>Hueyapan</b>	52.3	845.5	1500	19° 54'.7"	97° 24' 31.2"
<b>Apulco</b>	67.3	1013	1326	19° 55' 03.04"	97° 36' 27.00"
<b>Clima</b>					
Transición (subtropical a templado frío)					

Las regiones seleccionadas para el muestreo se clasificaron de acuerdo a las condiciones silvestres del lugar y en cuanto a los disturbios antropogénicos observados como se describe a continuación.

En cuanto al rodal de Cuautempan, las poblaciones presentes de *Pinus chiapensis* se observaron escasas y dispersas, pero además los individuos ubicados en este sitio

pertenecen únicamente a edades adultas, con ausencia de individuos en edades jóvenes. Aunado a esto, la contaminación humana con basura, la presencia de carreteras, viviendas e inclusive de un panteón, fueron evidentes. Sin embargo en el caso de los rodales de Hueyapan y Apulco las características observadas son contrarias al caso anterior, es decir que las poblaciones presentes de *Pinus chiapensis* son abundantes y los individuos pertenecen a edades que van desde muy jóvenes hasta adultas. En cuanto a la presencia de disturbios antropogénicos, no fueron observados e inclusive la presencia de cercas en dichas áreas fue evidente (Fig. 5). En base a estas observaciones, fue que se definieron dos tipos de rodales, los alterados (Cuautempan) y no alterados (Hueyapan y Apulco), cabe señalar que los criterios de clasificación pueden variar de acuerdo a lo que convenga para cada investigación (Chow *et al.*, 2002; Hackl *et al.*, 2004).



**Fig. 5.** Rodales de *Pinus chiapensis*. **Izquierda**, Cuautempan. Pueden observarse algunos de los disturbios antropogénicos. **Derecha**, Hueyapan. Pueden observarse parte de las poblaciones presentes de *Pinus chiapensis*. Del rodal de Apulco no se cuentan con fotografías.

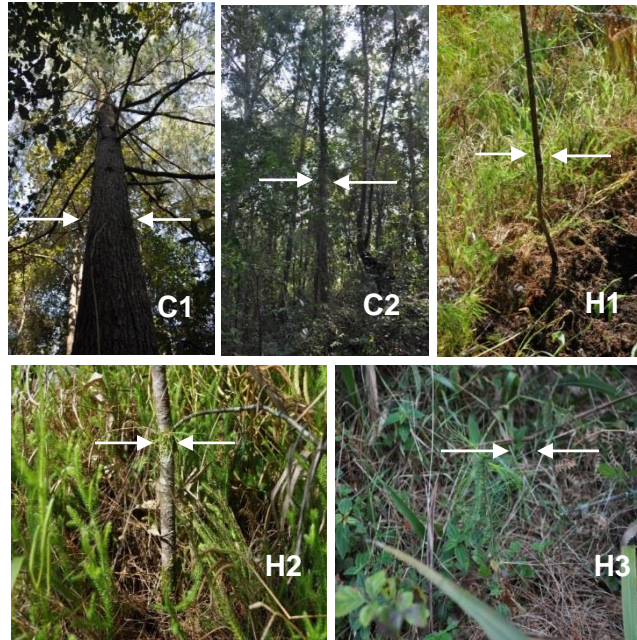
De acuerdo a las fichas técnicas de reforestación de CONAFOR (2007), la maduración de conos de *Pinus chiapensis* comienza de julio a agosto, indicando que la caída de semillas ocurre entre agosto y septiembre, por lo que para este estudio la fecha de muestreo fue el 20 de septiembre de 2012, esperando de esta manera captar a aquellos microorganismos, ya sea que favorezcan o no la germinación, al entrar en primer contacto con las semillas que comienzan a dispersarse (Dvorak *et al.*, 2000).

Una vez ubicadas las zonas de muestreo para la recolección de muestras microbiológicas, el criterio aplicado se basó en el hecho de que las zonas en donde las bacterias más abundantes son la rizósfera, así como las profundidades de suelo que van desde los 5 hasta los 25 cm aproximadamente, además del humus, el cual es rico en materia orgánica y por lo tanto también en microorganismos (Carrillo, 2003). Por lo tanto, la

toma de muestras microbiológicas en los rodales seleccionados se realizó en diferentes pinos y a diferentes profundidades (Tabla 3, Fig. 6).

**Tabla 3.** Ubicación de las muestras microbiológicas de cada rodal.

Rodal	Descripción
Cuautempan	Pino 1 (Profundidad 5 cm)
	Pino 1 (Profundidad 10 cm)
	Pino 2 (Profundidad 10 cm)
Hueyapan	Pino 1 (Rizósfera)
	Pino 1 (Rizósfera)
	Pino 2 (Rizósfera)
	Pino 3 (Rizósfera)
Apulco	Muestra superficial
	Profundidad 10 cm
	Profundidad 20 cm
	Humus, Cono



**Fig. 6.** Pinos en los rodales muestreados. **Pino C1 y C2** en Cuautempan; **Pino H1, H2 y H3** en Hueyapan; para el rodal de Apulco no se cuentan con fotografías.

El examen fisicoquímico fue realizado por la M.C. María Dolores Castañeda Antonio (Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, ICUAP-BUAP, Puebla, Pue)

basándose en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, la cual establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. De acuerdo a los resultados del examen fisicoquímico realizado (Tabla 4), se observa que aunque los valores de cada uno de los parámetros medidos varían entre los rodales, puede decirse que estos números se encuentran dentro de los valores óptimos para el desarrollo de *Pinus chiapensis*. Dichos valores corresponden a un rango de pH de 5 a 7, contenido rico a moderado de materia orgánica y suelos con un alto contenido de nitrógeno (CONAFOR, 2007). Estos datos presentados nos indican un panorama general sobre las condiciones fisicoquímicas de los rodales muestreados, pudiendo asumir presuntivamente que la problemática en la falta de germinación de los rodales en los que las poblaciones de *Pinus chiapensis* son bajas, no se debe quizás a estos parámetros, sino a cuestiones asociadas a la microbiota, ya que se sabe que en suelos en los que existen ciertas perturbaciones antrópicas, las condiciones naturales de éstos cambian, habiendo compactación y erosión (degradación física), degradación química y de materia orgánica, acidificación, pérdida de nutrientes, lo que provoca la inminente pérdida de la biodiversidad de microorganismos presentes en dichos suelos (Girvan *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2006).

**Tabla 4.** Examen fisicoquímico de cada rodal.

<b>Parámetro</b>	Cuatempan	Hueyapan	Apulco
<b>pH</b>	7.05 (Neutro)	7.82 (Moderadamente alcalino)	5.88 (Moderadamente ácido)
<b>Materia orgánica</b>	13.0% (Muy alto)	13.32% (Muy alto)	5.70% (Alto)
<b>Carbón orgánico</b>	7.5% (Muy alto)	7.7% (Muy alto)	3.30% (Alto)
<b>Fósforo</b>	12.229 mg/Kg (Alto)	4.29 mg/Kg (Bajo)	5.86 mg/Kg (Medio)
<b>Conductividad</b>	3.43 ds (Moderadamente salino)	4.91 ds (Salino)	5.2 ds (Salino)
<b>Textura</b>	<b>Tipo de suelo</b>		
<b>Limo</b>	22%	38.2%	20.0%
<b>Arcilla</b>	49.96%	18.32%	49.96%

<b>Arena</b>	28.04%	43.48%	50.04%
<b>Nitrógeno total</b>	0.21%	0.98%	2.10%
	(Alto)	(Muy alto)	(Muy alto)
<b>Fierro</b>	111 mg/Kg	28 mg/Kg	111.0 mg/Kg
<b>Manganeso</b>	170 mg/Kg	36 mg/Kg	382.75 mg/Kg
<b>Zinc</b>	<0.045 mg/Kg	13.3 mg/Kg	< 0.045 mg/Kg
<b>Sodio</b>	1024 mg/Kg	1128.2 mg/Kg	198.0 mg/Kg
<b>Potasio</b>	402 mg/Kg	265 mg/Kg	127.65 mg/Kg
<b>Calcio</b>	10320 mg/Kg	4155 mg/Kg	13120 mg/Kg

## 8.2 Aislamientos bacterianos.

En este proceso se utilizaron medios de cultivo sólidos con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (ver Anexos) incubados a 28 y 37°C durante una semana (ver Material y métodos), éstas condiciones fueron elegidas debido a que tanto el medio de cultivo, el inóculo, así como las temperaturas y tiempos de incubación afectan directamente el crecimiento de unas u otras bacterias que son aisladas del suelo, es decir, algunas pueden crecer en un medio de cultivo, pero no en otro o a una temperatura pero no a otra y en diferentes tiempos y de esta manera puede asegurarse el aislamiento, al menos de un número considerable de bacterias (Smit *et al.*, 1999; Davis, 2005).

El número de bacterias aisladas así como las muestras obtenidas por cada rodal varía entre sí, sin embargo estos números en el caso de este estudio no tienen gran relevancia, ya que el objetivo se centra en la búsqueda de bacterias promotoras de la germinación de *Pinus chiapensis* y no en la caracterización de los cambios temporales en la presencia o ausencia de bacterias y su cantidad (biodiversidad) (Tabla 5) (Magurran, 2010; Magurran y Dornelas, 2010; Dornelas *et al.*, 2012).

Tabla 5. Cepas aisladas y número de muestras por rodal.

<b>Rodal</b>	<b>No. de cepas</b>	<b>No. de muestras</b>
<b>Cuautempan</b>	80	3
<b>Hueyapan</b>	78	5
<b>Apulco</b>	33	5

### 8.3. Análisis de la germinación de *Pinus chiapensis* en semillas inoculadas con bacterias.

Una vez obtenidos los aislamientos bacterianos y como primer cribado en la selección de bacterias benéficas para la germinación de *Pinus chiapensis*, se hicieron pruebas de germinación *in vitro* utilizando todos los aislamientos bacterianos obtenidos de los rodales de Cuautempan, Hueyapan y Apulco (191 cepas). Como resultado de esta prueba, se obtuvo que las cepas 1, 6, 23A, 23B, 24, 40, y 45 (Hueyapan), así como las cepas 10, 15A, y 15B (Apulco) (Tabla 6), disminuyeron los tiempos de germinación con respecto al control no inoculado (dato no mostrado).

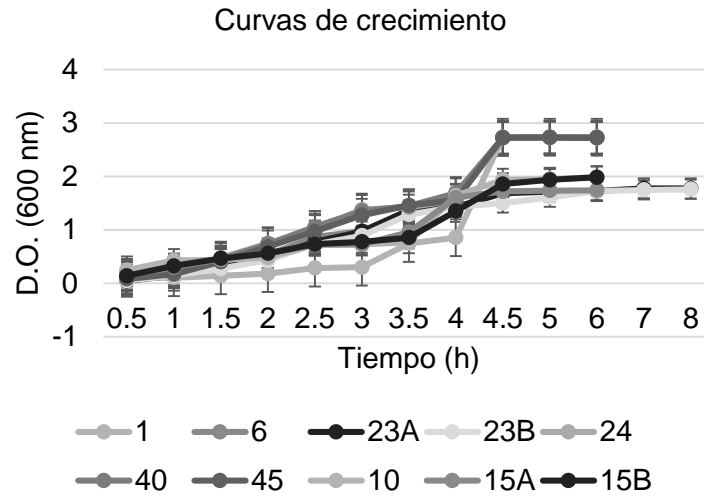
**Tabla 6.** Origen de las cepas aisladas que mostraron disminución en los tiempos de germinación de semillas de *Pinus chiapensis*.

Cepa	Medio de cultivo	Muestra	Rodal
1	LB	Pino 1 (rizósfera)	Hueyapan
6	LB	Pino 3 (rizósfera)	Hueyapan
23A	PY	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan
23B	PY	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan
24	PY	Pino 3 (rizósfera)	Hueyapan
40	TESMA	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan
45	Rojo Congo	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan
10	LB	10 cm	Apulco
15A	Rojo Congo	10 cm	Apulco
15B	Rojo Congo	10 cm	Apulco

Con base en los resultados obtenidos con dicho cribado y para poder repetir las pruebas de germinación *in vitro*, se tuvieron que estandarizar los inóculos bacterianos, para lo cual se realizaron curvas de crecimiento de las cepas 1, 6, 23A, 23B, 24, 40, 45, 10, 15A y 15B.

Los datos arrojados por las curvas de crecimiento indican que las cepas 1 y 24 exhiben un disparo en su crecimiento a las 4 horas para llegar a su fase estacionaria a las 4 horas y media. En cuanto a las cepas 6, 23A, 23B, 40, 45, 10, 15A y 15B comienzan su fase estacionaria de 4.5 a 5 horas (Fig. 7). Todas las cepas a partir de las 6 horas de

crecimiento aproximadamente mantienen su densidad óptica hasta al menos las 72 hrs de cultivo (dato no mostrado).



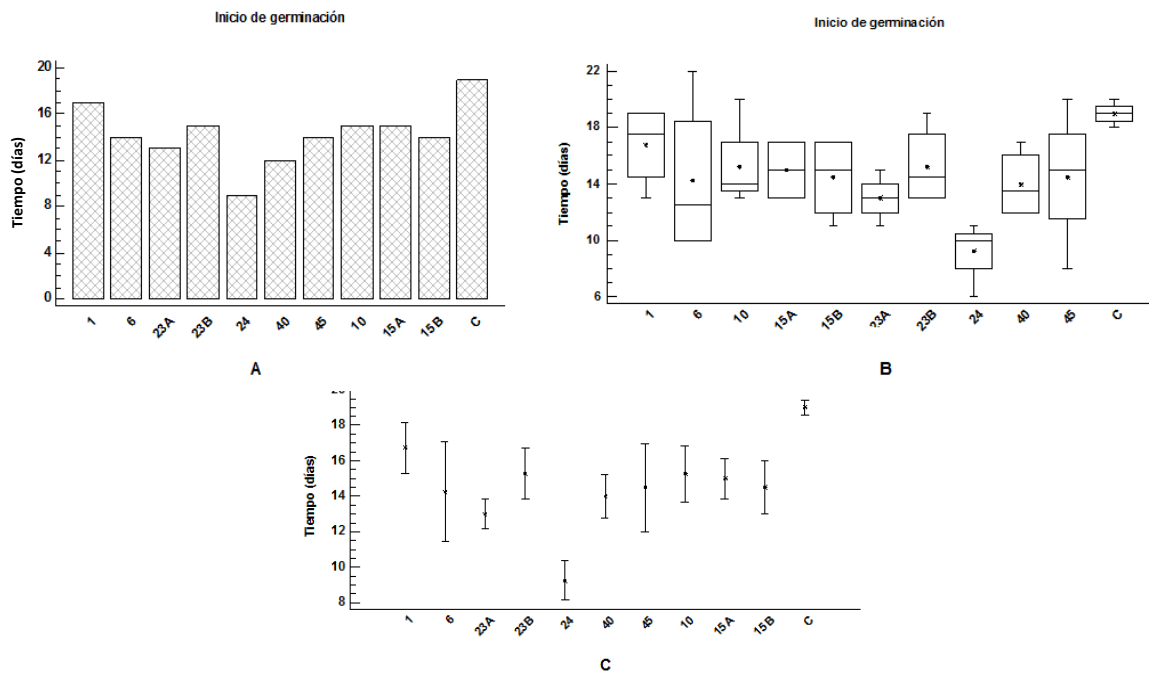
**Fig. 7.** Curvas de crecimiento de las cepas con efecto positivo en la germinación. Gráfico realizado en Microsoft Excel.

A partir de los datos obtenidos, los inóculos bacterianos para las posteriores pruebas de germinación *in vitro* se tomaron a las 16 hrs de crecimiento, en cuyo tiempo todas las cepas mencionadas mantienen una densidad óptica entre 1.8 y 2.0 (dato no mostrado como se indica en Material y métodos). En estas densidades ópticas se ha observado que el número de UFC/ml es de  $1 \times 10^8$ , y se ha estandarizado éste número de bacterias para pruebas en donde se evalúa el efecto que ejercen éstas sobre la germinación de semillas, además se ha observado que el aumentar el número de bacterias inoculadas puede afectar de manera negativa la germinación de semillas, citando como ejemplo la producción de ácido indol acético, el cual puede funcionar como una fitohormona promotora del crecimiento, pero fuera de concentraciones fisiológicas normales ( $0.7-30 \mu\text{g/ml}$ ) puede afectar de manera negativa el crecimiento de una planta e incluso funcionar como factor de virulencia, caso contrario si el número de bacterias inoculadas es menor, ya que el efecto esperado puede ser muy bajo (Malhotra y Srivastava, 2008; Masciarelli *et al.*, 2013).

Cabe señalar que aunque en las primeras pruebas de germinación que sirvieron como cribado, se usaron todas las cepas aisladas de todos los rodales muestreados, únicamente las que mostraron efectos positivos en la germinación provienen de Hueyapan y Apulco, considerados como no alterados, que aunado a los datos arrojados por el examen fisicoquímico en donde se observa que los tres rodales tienen las características para la germinación y desarrollo de *Pinus chiapensis*, se apoya el hecho de que las cuestiones

fisicoquímicas posiblemente no están involucradas en el problema de la falta de germinación, sino quizás la microbiota.

Una vez realizado el primer cribado en las pruebas de germinación *in vitro* y la consecuente estandarización de inóculos bacterianos, se procedió a la repetición de las pruebas de germinación únicamente con las bacterias resultantes como benéficas en la disminución de los tiempos de germinación (cepas 1, 6, 23A, 23B, 24, 40, 45, 10, 15A y 15B) (Fig. 8), además de determinarse los pesos frescos y longitudes de los germinados de las cepas 24 y 40 (Fig. 9 y 10), las cuales mostraron una disminución en el tiempo de germinación respecto al control no inoculado (2, 12 y 19 días respectivamente).

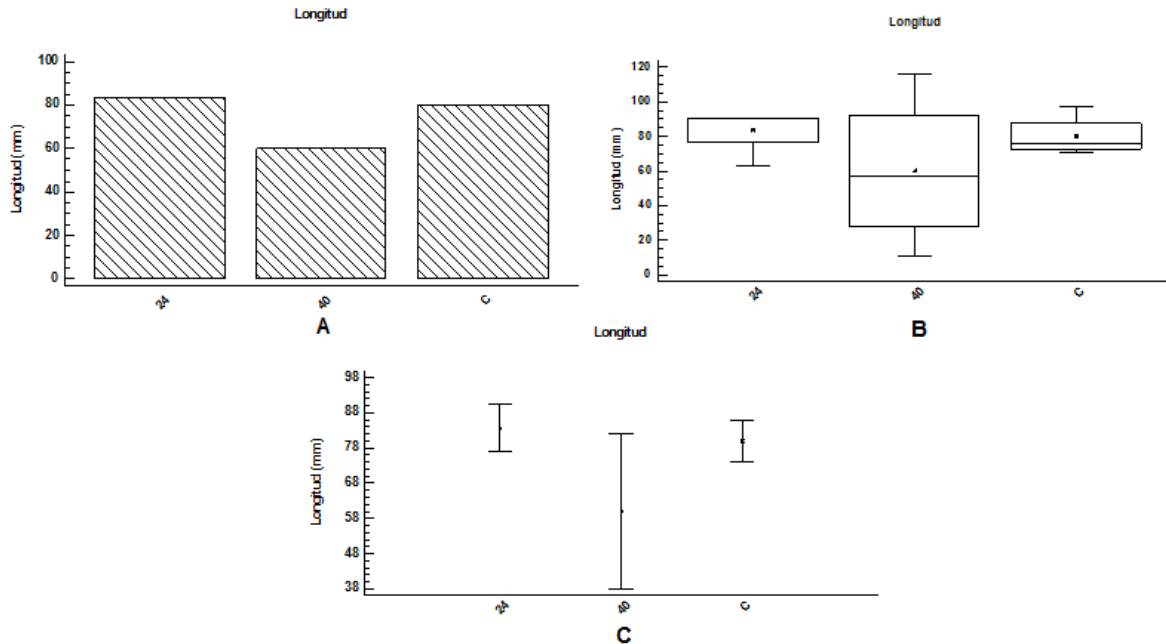


**Fig. 8.** ANOVA simple para inicio de germinación. **A**, gráfico de barras que indica los días de disminución en los tiempos de germinación de semillas inoculadas con cada una de las cepas obtenidas en el cribado realizado con respecto al control no inoculado; **B**, gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la dispersión de los valores máximos y mínimos, así como sus concentraciones para cada cepa ( $P=0.04$ ); **C**, gráfico de medianas indicándose las desviaciones estándar para las semillas inoculadas con cada una de las cepas obtenidas en el cribado realizado con respecto al control no inoculado ( $P=0.04$ ).

Prueba realizada en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

Puede observarse que las mejores cepas en la disminución de los tiempos de germinación con respecto al control no inoculado son la 24 y 40 (9 y 12 días respectivamente) (Fig. 8-A), además después de haberse realizado la prueba ANOVA simple, se concluye en base a los gráficos presentados, que los datos obtenidos para las cepas 1, 6, 23B, 24, 40, 45, 10 y 15B varían en su distribución y en concentración para

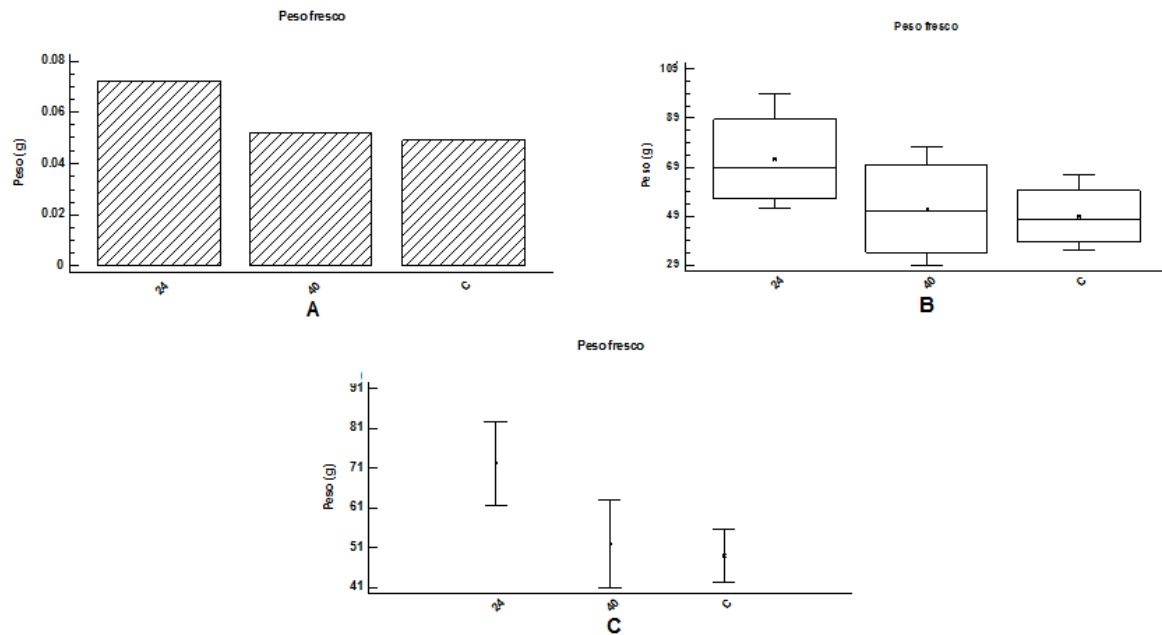
valores mínimos y máximos, no así en el caso de la cepa 15A, 23A y el control no inoculado, que muestran una distribución y concentración uniforme en los valores máximos y mínimos obtenidos, por lo que la mediana en estos datos se encuentra a la mitad de las cajas respectivas (Fig. 8-B). Además es de notar que en base al valor  $P$  obtenido ( $P=0.04$ ), las medianas y desviaciones estándares obtenidas de todas las cepas y el control no inoculado son significativamente diferentes, indicando de manera estadística que las cepas influyen directamente en los valores de tiempo obtenidos (Fig. 8-C).



**Fig. 9.** ANOVA simple para longitud. **A**, gráfico de barras que indica las longitudes obtenidas en los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 con respecto al control no inoculado. **B**, gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la dispersión de los valores máximos y mínimos, así como sus concentraciones para las cepas 24 y 40 ( $P=0.4$ ); **C**, gráfico de medianas indicándose las desviaciones estándar para las longitudes obtenidos en los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 respecto al control no inoculado ( $P=0.4$ ). Prueba realizada en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

En cuanto los resultados obtenidos en la determinación de longitud de los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 respecto al control no inoculado se observa que las longitudes obtenidas son muy cercanas, resultando de 83.68, 60.01 y 79.99 mm respectivamente (Fig. 9-A). Así que después de haberse realizado un ANOVA simple, puede concluirse que la distribución y concentración de los valores mínimos y máximos obtenidos para ambas cepas y el control no inoculado son muy similares, encontrándose las medianas cercanas a la mitad de las cajas en todos los casos (Fig. 9-B). Además en base al valor  $P$  obtenido ( $P=0.4$ ), las medianas y desviaciones estándar de

ambas cepas y el control no inoculado no presentan diferencias significativas, indicando de manera estadística que las cepas no influyen en la longitud de la raíz al menos en los momentos cercanos al brote (Fig. 9-B, C).



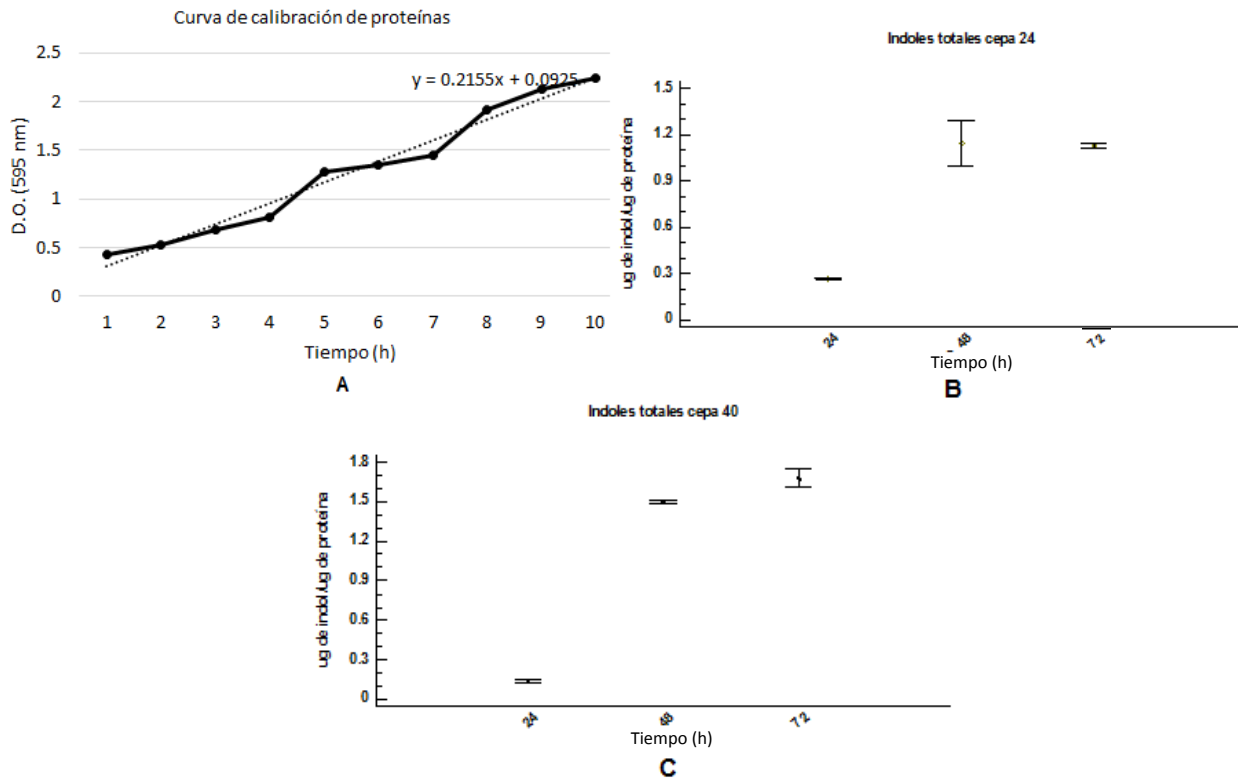
**Fig. 10.** ANOVA simple para peso fresco. **A**, gráfico de barras que indica los pesos frescos obtenidos en los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 con respecto al control no inoculado. **B**, gráfico de cajas y bigotes donde se muestra la dispersión de los valores máximos y mínimos, así como sus concentraciones para las cepas 24 y 40 ( $P=0.2$ ); **C**, gráfico de medianas indicándose las desviaciones estándar para las longitudes obtenidos en los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 respecto al control no inoculado ( $P=0.2$ ). Prueba realizada en el programa estadístico Statgraphics Centurion.

Haciendo referencia a los resultados obtenidos en la determinación de peso fresco de los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40 respecto al control no inoculado se observa que los pesos frescos obtenidos son muy cercanos, resultando de 0.072, 0.052 y 0.049 g respectivamente (Fig. 9-A). Así que después de haberse realizado un ANOVA simple, puede observarse que la distribución y concentración de los valores mínimos y máximos obtenidos para ambas cepas y el control no inoculado son muy similares, encontrándose las medianas cercanas a la mitad de las cajas en todos los casos (Fig. 10-B). Además en base al valor  $P$  obtenido ( $P=0.2$ ), las medianas y desviaciones estándar de ambas cepas y el control no inoculado no presentan diferencias significativas, indicando de manera estadística que las cepas no influyen en el peso fresco de los germinados al menos en los momentos cercanos al brote (Fig. 10-C).

En base a los resultados presentados para longitud y peso fresco de los germinados de semillas inoculadas con las cepas 24 y 40, puede pensarse en la posibilidad de que los germinados de este pino necesiten la presencia de algún hongo ectomicorrízico que pueda proporcionar una mayor captación de nutrientes como el nitrógeno y fósforo o la misma adición de éstos, lo que puede llegar a mejorar los pesos y longitudes de los germinados. Se sabe que hongos ectomicorrízicos como *tricoloma matsutake*, que se encuentra asociado a *Pinus sylvestris* en bosques de coníferas, donde en estudios *in vitro* se ha observado la mejora en la captación de elementos como aluminio, fierro, sodio, fósforo y zinc, aumentando tanto la biomasa como la densidad de raíces (Vaario *et al.*, 2014). Además en ambientes con elevadas concentraciones de dióxido de carbono la biomasa de raíces de pinos puede aumentar en un 24% así como la demanda de nitrógeno, además pueden verse aumentadas en un 176% la concentraciones de cationes divalentes como el calcio además de acidificarse el suelo (Taylor *et al.*, 2014).

Se sabe que existen bacterias que poseen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas, las cuales reciben el nombre de Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), ya sea de manera directa o indirecta, es decir, mediante la producción de giberelinas, citoquininas, auxinas y por la fijación de nitrógeno; o mediante el biocontrol de fitopatógenos. El mecanismo más y mejor estudiado en cuanto a la promoción del crecimiento en plantas es la producción de auxinas, específicamente de ácido indol acético en bacterias, ya que se ha visto que éste compuesto tiene la capacidad de elongar los germinados y promover la formación de pelos radiculares, de ésta manera beneficiando a la planta en su crecimiento. Se ha visto que algunas especies de los géneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Enterobacter*, por mencionar algunos, tienen la capacidad de producir ácido indol acético y por lo tanto son consideradas como PGPR (Cassán *et al.*, 2011; Jha *et al.*, 2011; Dimkpa *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior con las cepas 24 y 40, las cuales mostraron disminución en los tiempos de germinación de *Pinus chiapensis* (9 y 12 días respecto al control no inoculado, 19 días) se realizó una determinación de indoles totales, lo que sirvió como un panorama general en cuanto al posible mecanismo empleado para lograr el efecto ya mencionado en la germinación de este pino (Fig. 11).



**Fig. 11.** Gráficos de indoles totales. **A**, se muestra una regresión lineal con los valores obtenidos en la cuantificación de proteínas a 595 nm. **B**, se muestra la producción de indoles totales de la cepa 24 a diferentes tiempos ( $P=0.0$ ). **C**, se muestra la producción de indoles totales de la cepa 40 a diferentes tiempos ( $P=0.0$ ). Gráfico A, realizado en Microsoft Excel, B y C en Statgraphics Centurion.

Como resultado de esta prueba, se tiene que la producción de indoles totales de la cepa 24 a las 24 h es de 0.269, a las 48 h de 1.14 y a las 72 h de 1.131  $\mu\text{g}$  de indol/ $\mu\text{g}$  de proteína; y de la cepa 40 a las 24 h es de 0.139, a las 48 h de 1.50 y a las 72 h de 1.68  $\mu\text{g}$  de indol/ $\mu\text{g}$  de proteína. Puede inferirse con estos resultados que la cepa 24 alcanza una mayor producción a partir de las 48 h y la cepa 40 a las 72 h, datos que se validan con las desviaciones estándar que indican que hay diferencias significativas entre los valores obtenidos para cada cepa y en los diferentes tiempos ( $P=0.0$ ).

Se ha observado que la producción de indoles en diferentes especies de *Azospirillum* es  $>30 \mu\text{g/ml}$  en cultivos de maíz, en *Pseudomonas fluorescens* de 0.7-153  $\mu\text{g/ml}$  en cultivos de pepino y en *Pseudomonas putida* de 26  $\mu\text{g/ml}$  en cultivos de canola (Crozier *et. al.*, 1998; Dimkpa *et. al.*, 2011), y según los resultados obtenidos en esta determinación de indoles totales la producción de la cepa 24 es de 0.588, 2.28 y 2.26  $\mu\text{g/ml}$

de indoles totales a las 24, 48 y 72 h respectivamente; y de la cepa 40 es de 0.278, 3.0 y 3.36  $\mu\text{g/ml}$  de indoles totales a las 24, 48 y 72 h respectivamente. Estos resultados indican que los valores obtenidos para ambas cepas se encuentran dentro de las concentraciones benéficas para el desarrollo de plantas como ya se mencionó anteriormente. Sin embargo puede que no exista una correlación entre los tiempos de inicio de la germinación, las longitudes y los pesos frescos obtenidos con estas cepas y las cantidades de indoles totales producidas por las mismas, esto en base a los valores obtenidos en las pruebas de ANOVA para longitud y peso fresco (Fig. 9 y 10), indicando tal vez que estas cepas están relacionadas en el inicio de la germinación, pero no en la elongación del germinado.

#### 8.4 Identificación de las cepas aisladas.

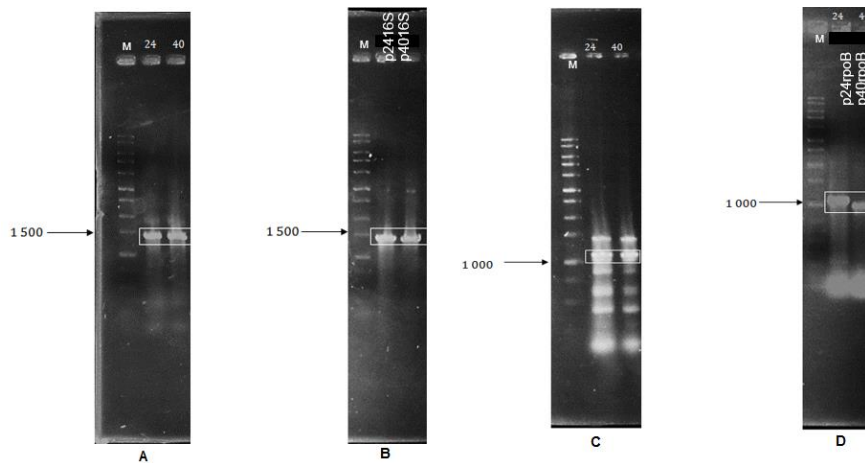
A las cepas 24 y 40, las cuales mostraron una disminución en el inicio de la germinación de 9 y 12 días respectivamente, se identificaron utilizando la secuencia del gen 16SrDNA y *rpoB*.

La elección en el uso de la secuencia del gen 16SrDNA fue en base a que universalmente es utilizado en estudios filogenéticos, ya que posee regiones conservadas pero también otras variables, las cuáles permiten distinguir entre géneros e inclusive algunas veces entre especies. Sin embargo no puede asegurarse una total y correcta identificación de una bacteria con este sólo gen ya que en un mismo género puede haber variabilidad en el número de copias dentro del genoma. Es por esto que se propone el uso de un conjunto de genes de mantenimiento para una mejor identificación, como lo es *rpoB* (gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa), el cual en los últimos años se ha comparado con *cpn60* (protéina de choque térmico) e inclusive se ha propuesto su uso en lugar de 16S rDNA, porque ofrece una mayor fidelidad incluso que *rpoB* en la identificación, sin embargo tiene como desventaja la falta de secuencias en bases de datos (Rastogi *et al.*, 2009; Pei *et al.*, 2010; Vetrovsky *et al.*, 2013).

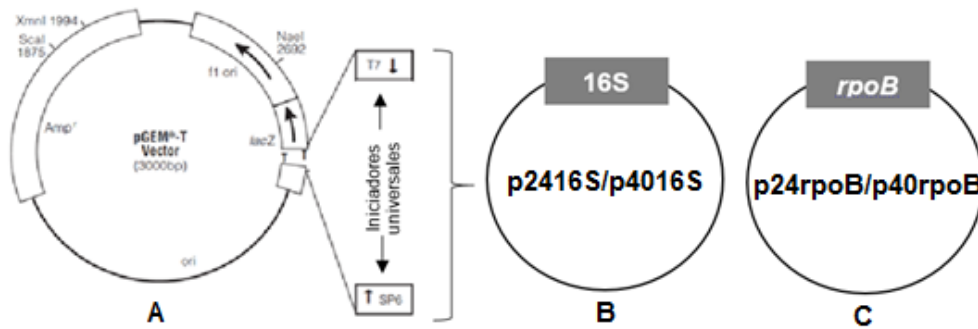
En cuanto a la elección en el uso de la secuencia del gen *rpoB* fue en base a que este gen ofrece una mayor fidelidad en la identificación de bacterias debido a la existencia de una única copia de éste y además se ha demostrado que al ser comparado con el gen 16SrDNA, *rpoB* ofrece una mejor identificación al menos de *Firmicutes* y *Proteobacterias* (Case *et al.*, 2007). Además se ha utilizado en estudios de diversidad de bacterias aisladas

de suelo (Dahllof *et al.*, 2000; Vos *et al.*, 2012) y en estudios de expresión o represión de genes de virulencia en bacterias patógenas (Higgins *et al.*, 2011).

Utilizando los pares de iniciadores correspondientes a cada gen (UN27F y UN1392R para el gen 16SrDNA; CM7F y CM31BR para el gen *rpoB*) pudieron amplificarse los fragmentos de interés, con longitudes de 1450 y 1000 pb para los genes 16SrDNA y *rpoB* respectivamente (Fig. 12). Dichos amplificados fueron clonados en el vector pGEM-T (Promega) de los que fue verificada su correcta inserción mediante reacciones de PCR utilizando los pares de iniciadores ya mencionados para cada gen. Posterior a esto, se enviaron a secuenciar usando los iniciadores T7 y SP6, cuya secuencia se encuentra en el vector utilizado (Fig. 13).



**Fig. 12.** Electroforesis de los amplificados obtenidos. **A**, amplificados del gen 16SrDNA utilizando como template en DNA genómico de las cepas 24 y 40. Carril 2, amplificado correspondiente a la cepa 24; carril 3, amplificado correspondiente a la cepa 40. **B**, amplificados obtenidos en la verificación de los fragmentos insertados correspondientes al gen 16SrDNA de las cepas 24 y 40. Carril 2, amplificado correspondiente a la cepa 24 (p2416S); carril 3, amplificado correspondiente a la cepa 40 (p4016S). **C**, amplificados del gen *rpoB* utilizando como template en DNA genómico de las cepas 24 y 40. Carril 2, amplificado correspondiente a la cepa 24; carril 3, amplificado correspondiente a la cepa 40. **D**, amplificados obtenidos en la verificación de los fragmentos insertados correspondientes al gen *rpoB* de las cepas 24 y 40. Carril 2, amplificado correspondiente a la cepa 24 (p24rpoB); carril 3, amplificado correspondiente a la cepa 40 (p40rpoB). En todos los casos el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular.



**Fig. 13.** Diagrama de clonación. **A**, se muestra el vector pGEM-T (Promega) así como el sitio de clonación y de los iniciadores universales T7 y SP6. **B**, construcciones generadas para las secuencias del gen 16SrDNA de las cepas 24 y 40. **C**, construcciones generadas para las secuencias del gen *rpoB* de las cepas 24 y 40.

Cabe señalar que durante la reacción de PCR para amplificar el fragmento de 1000 pb del gen *rpoB*, se obtuvieron diversos amplificados, sin embargo el fragmento esperado se purificó para posteriormente ser clonado en el vector ya mencionado. La autenticidad de éste fragmento pudo corroborarse mediante la secuenciación y el alineamiento realizado en BLAST, siendo de ésta manera innecesaria la modificación de las condiciones de PCR utilizadas (Fig. 12).

Una vez que se contó con los fragmentos correctamente insertados en el vector, correspondientes a cada gen de ambas cepas, éstos se enviaron a secuenciar para después alinearse en BLAST y poder identificar las cepas mencionadas. Mediante los alineamientos realizados se pudieron determinar los géneros correspondientes a las cepas 24 y 40, no así para su especie, ya que para determinarlas es necesario realizar una búsqueda más específica con el uso de secuencias pertenecientes a genes de mantenimiento. Dentro de estos genes se ha propuesto que el uso de secuencias codificantes para enzimas como oxidorreductas, transferasas, hidrolasas, etc son de gran valor en la identificación de especies, debido a que comparten secuencias conservadas entre ellas, además del posible uso de la totalidad del genoma (Bishop *et al.*, 2009; Slabbinck *et al.*, 2010; Gao y Zhang, 2011).

Las cepas 24 y 40 provienen del mismo rodal (Hueyapan) aunque de diferentes muestras (rizósfera del pino 3 y 2, respectivamente) y medios de cultivo (PY y TESMA respectivamente). El género al que pertenecen las dos cepas corresponde a *Enterobacter* de acuerdo a los resultados obtenidos en el alineamiento realizado en BLAST (Tabla 7), y

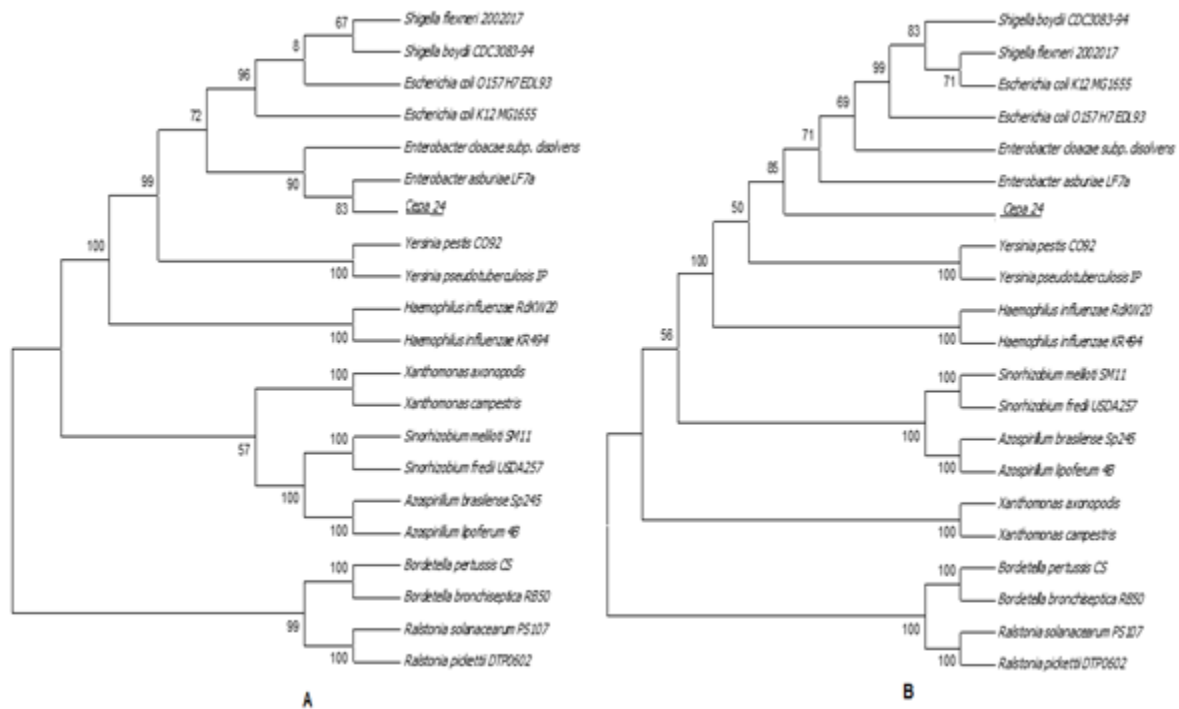
en este género se han realizado estudios de filogenia con el intento de clasificar a diversas cepas basándose en el uso de genes como *rpoB*, *Hsp60*, *HemB*, *HemBu*, *AmpC*, *AmpCu*, obteniendo que las especies de *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. dissolvens*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, y *E. nimipressuralis* pertenecen al complejo de *Enterobacter cloacae* (Hoffman y Roggenkamp, 2003). Además se ha observado que durante la germinación de semillas al menos de maíz y chícharo *Enterobacter cloacae* controla la infección por parte de *Pythium ultimum* (hongo causante de la pudrición de semillas) mediante la metabolización de ácidos grasos de cadena larga (principalmente ácido linoleico) que son liberados durante la germinación (Kageyama y Nelson, 2003). *Enterobacter cloacae* es capaz de sintetizar ácido indol acético utilizando como precursor al triptófano, mediante la vía de indol-3-piruvato, por lo que se ha determinado que ésta bacteria posee los genes necesarios para ésta vía de síntesis, contribuyendo a la germinación de semillas y desarrollo de pelos radiculares en plantas, estos últimos datos concuerdan con los obtenidos durante la prueba cualitativa de índoles que se realizó en éste estudio (Ryu y Patten, 2008).

**Tabla 7.** Resultados del alineamiento realizado en BLAST de las secuencias obtenidas para las cepas 24 y 40 con los genes 16SrDNA y *rpoB*.

Cepa	Nombre	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Medio de cultivo	Muestra	Rodal	pb
<b>16SrDNA</b>										
<b>24</b>	<i>Enterobacter</i> sp.	1166	1166	82%	0.0	98%	PY	Pino 3 (rizósfera)	Hueyapan	1000
<b>40</b>	<i>Enterobacter</i> sp.	1943	1943	99%	0.0	99%	TESMA	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan	1097
<b><i>rpoB</i></b>										
<b>24</b>	<i>Enterobacter</i> sp.	1740	1740	96%	0.0	96%	PY	Pino 3 (rizósfera)	Hueyapan	1113
<b>40</b>	<i>Enterobacter</i> sp.	815	815	64%	0.0	94%	TESMA	Pino 2 (rizósfera)	Hueyapan	1038

## 8.5 Árboles filogenéticos.

Con las secuencias obtenidas de los genes 16SrDNA y *rpoB* correspondientes a las cepas 24 y 40, se construyeron árboles filogenéticos a partir de las secuencias relacionadas filogenéticamente según los datos arrojados durante los alineamientos en BLAST (Fig. 15 y 16).



**Fig. 14.** Árboles filogenéticos correspondientes a la cepa 24 construidos con el método de máxima verosimilitud. **A**, árbol filogenético construido con secuencias del gen 16SrDNA, donde puede ubicarse a la cepa 24 en el clado del género *Enterobacter*. **B**, árbol filogenético construido con secuencias del gen *rpoB*, donde puede ubicarse a la cepa 24 en el clado del género *Enterobacter*. La cepa 24 se muestra como *Enterobacter* sp. de acuerdo al resultado obtenido en el alineamiento de las secuencias correspondientes en BLAST (subrayado).

En los árboles filogenéticos correspondientes a la cepa 24 (Fig. 14), puede observarse que ésta se ubica dentro del clado del género *Enterobacter* tanto con la secuencia del gen 16SrDNA como con la secuencia del gen *rpoB*, teniéndose valores de bootstrap de 83 y 85 respectivamente. Estos datos de complementan con los valores de identidad y score obtenidos en el alineamiento de secuencias en BLAST (Tabla 7), que en el caso del gen 16SrDNA fueron de 98% y 1166 respectivamente; y en el caso del gen *rpoB* fueron de 96% y 1740 respectivamente. Con los datos presentados puede concluirse que la cepa 24 pertenece al género *Enterobacter*.



deben utilizarse secuencias concatenadas de genes que sean ortólogos en los microorganismos en cuestión, sin embargo existen limitantes en el contenido de genes ortólogos entre uno y otro de los organismos utilizados, además de que los resultados obtenidos dependerán de la metodología utilizada en la construcción (Guo y Peddada, 2008; Huson y Scornavaca, 2010; Matthews y Williams, 2011; Satoh *et al.*, 2013). En cuanto a los valores de bootstraps, éstos se asocian a la monofilia de un clado, es decir; durante las repeticiones que sean requeridas en la construcción de un árbol, ese clado debe estar conformado por las mismas secuencias en cierto número de esas mismas repeticiones, con lo que se propone que valores de bootstrap del 70% corresponden a una probabilidad del 95% de que ese árbol sea cierto; sin embargo, puede ser que inclusive valores de bootstrap del 50% sean correctos, ya que todo depende de las condiciones en la construcción de un árbol filogenético (Baxevanis y Ouellette, 2001).

## 9. Conclusiones.

1. Las características climatológicas y fisicoquímicas encontradas en rodales alterados y no alterados de *Pinus chiapensis* presentan valores dentro de los rangos reportados para el desarrollo de esta especie.
2. Se observó que únicamente las bacterias aisladas de rodales no alterados de *Pinus chiapensis* mostraron un efecto en la disminución de los tiempos de germinación, a pesar de haberse probado en la germinación todas las cepas aisladas de ambos rodales.
3. Las cepas 24 y 40 mostraron una disminución significativa en el inicio de germinación de *Pinus chiapensis* respecto al control no inoculado.
4. Los valores obtenidos en cuanto a longitud y peso fresco de los germinados correspondientes a las cepas 24 y 40, no muestran diferencias significativas respecto a los obtenidos con el control no inoculado.
5. Aunque las cepas 24 y 40 mostraron producir cantidades fisiológicas de ácido indol-3-acético, estos valores parecen no relacionarse con los obtenidos en longitud y peso fresco para dichas cepas.
6. Las cepas 24 y 40 se ubicaron dentro del clado del género *Enterobacter*, de acuerdo a los alineamientos realizados y en cuanto a los árboles filogenéticos construidos bajo el método de máxima verosimilitud.

## **10. Perspectivas.**

1. Realizar un ensayo multilocus para las cepas 24 y 40 y así poder identificarlas hasta especie.
2. Analizar otros probables mecanismos de las cepas 24 y 40 para la promoción del crecimiento como: solubilización de fosfatos, producción de fitohormonas, producción de sideróforos y biocontrol.

## 11. Bibliografía.

**Andressen J. L.** 1964. The taxonomic status of *Pinus chiapensis*. Phyt. 10(6): 417-421

**Barghouthi S. A.** 2011. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. Ind. J. Microbiol. 51 (4): 430-444.

**Baxevanis A. D., Ouellette B. F. F.** 2001. Chapter 14: Phylogenetic Analysis. Bioinformatics: a practical guide to the analysis of genes and proteins. John Wiley & Sons. Inc.

**Bishop C. J., Aanensen D. M., Jordan G. E., Kilian M., Hanage W. P., Spratt B. G.** 2009. Assigning strains to bacterial species via the internet. BioMed. 7 (3): 1741.

**Carrillo L.** 2003. Capítulo 3: Actividad microbiana. Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta. Salta, Argentina.

**Case R. J., Boucher Y., Dahllof I., Holmstrom C., Dolittle W. F., Kjelleberg S.** 2007. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers of microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 73 (1): 278.

**Cassán F., Perrig D., Sgroy V., Luna V.** 2011. Chapter 7: Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria. Bacteria in agrobiología: Plant nutrient management. 141-182.

**Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE).** 2000. Técnicas para la Germinación de Semillas Forestales. Manual Técnico No. 9. Turrialba, Costa Rica.

**Chow M. L., Radomski C. C., McDermott J. M., Davies J., Axelrood P. E.** 2002. Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. FEMS Microbiol. Ecol. 42: 347-357.

**CONABIO.** 2010. El bosque mesófilo de montaña en México: amenazas y oportunidades para su conservación y manejo sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

**CONAFOR.** 2007. Ficha Técnica de Reforestación. *Pinus chiapensis*.

**Crozier A., Arruda P., Jasmim J. M., Monteiro A. M., Sandberg G.** 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 54 (11): 2833.

**Dahllof I., Baillie H., Kjelleberg S.** 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. Appl. Environ. Microbiol. 66 (8): 3376.

**Davis K. E. R., Joseph S. J., Janssen P. H.** 2005. Effects of growth Medium inoculum size and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 71 (2): 826-834.

**Del Castillo R. F., Argueta S. T., Sáenz-Romero C. D.** 2009. *Pinus chiapensis*: genetics, ecology and conservation. For. Ecol. And Man. 257: 2201-2208.

**Devorak W. S., Gutiérrez E. A., Osorio L. F., Vandermerwe P. L., Donahue K.** 2000. *Pinus chiapensis* conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE cooperative. College of natural resources. North Carolina State University. Raleigh NC. USA.

**Dimkpa C. O., Zeng J., McLean J. E., Britt D. W., Zhan J., Anderson A. J.** 2011. Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-beneficial bacterium *Pseudomonas chlororaphis* O6 is Inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles. Appl. Environ. Microbiol. 78 (5): 1404-1410.

**Dornelas M., Magurran A. E., Buckland S. T., Chao A., Chazdon R. L., Colwell R. K., Curtis T., Gaston K. J., Gotelli N. J., Rosnik m. A., McGill B., McCuneJ. L., Morlon H.,**

**Mumby P. J., Ovreas L., Studeny A., Vellend M.** 2012. Quantifying temporal change in biodiversity: challenges and opportunities. *Proc. R. Soc. B.* 280.

**Dressler R. L.** 1954. Some floristic relationships between Mexico and the United States. *Rodhora.* 56: 81-96.

**FAO.** 2011. Situación de los bosques del mundo 2011. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.

**Gao F., Zhang R.R.** 2011. Enzymes are enriched in bacterial essential genes. *PloS ONE.* 6 (6): 21683.

**Girvan M. S., Bullimore J., Pretty J. N., Osborn A. M., Ball A. S.** 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. and Environ. Microbiol.* 69 (3): 1800-1809.

**Glickmann E., Dessaux Y.** 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *APEM.* 61 (2): 793-796.

**Guo W., Peddada S.** 2008. Adaptive choice of the number of bootstraps samples in large scale multiple testing. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 7 (1): 13.

**Hackl E., Zechmeister-Boltenstern S., Bodrossy L., Sessitsch A.** 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *AEM.* 70 (9): 5057-5065.

**Higgins J., Camp P., Farrell D., Bravo D., Pate M., Robbe-Austerman S.** 2011. Identification of *Mycobacterium* spp. of veterinary importance using *rpoB* gene sequencing. *BMC Vet. Research.* 7: 77.

**Hoffman H., Roggenkamp A.** 2003. Population genetics nomenspecies *Enterobacter cloacace.* *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (9): 5306-5318.

**Huson D. H., Scornavaca C.** 2010. A survey of combined methods for phylogenetic networks. *Genome Biol.* 3: 23-35.

**Jha C.K., Aeron A., Patel b. V., Maheshwari D. K., Saraf M.** 2011. Chapter 8: *Enterobacter*: role in plant growth promotion. *Bacteria in agrobiolgy: plant growth responses.* 159-183.

**Kageyama K., Nelson E. B.** 2003. Differential inactivation of seed exudate stimulation of *Pythium ultimum* sporangium germination by *Enterobacter cloacae* influences beneficial control efficacy on different plant species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 1114-1120.

**Lau E., Ahmad A., Steudler P.A., Cavanaugh C.M.** 2007. Molecular characterization of methanotrophic communities in forest soils that consume atmospheric methane. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 60: 409-500.

**Loock E. E.** 1950. The pines of Mexico and British Honduras. Union South Africa. Dept. Forestry Bull. 35: 244.

**López-Pérez Y., Tejedo-Díez J. D., Torres-Díaz A. N., Luna-Vega I.** 2011. Flora del bosque mesófilo de montaña y vegetación adyacente en Avándaro, Valle de Bravo, Estado de México, México. *SciELO.* 88: 35-53.

**Lottmann J., O'Callaghan M., Baird D., Walter C.** 2010. Bacterial and fungal communities in the rhizosphere of field-grown genetically modified Pine Trees (*Pinus radiata* D.). *Environ. Biosafety. Res.* 9: 25-40.

**Magurran A. E.** 2010. Q&A: What is biodiversity? *BMC Biol.* 8: 145-148.

**Magurran A. E., Dornelas M.** 2010. Biological diversity in a changing world. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 3593-3597.

**Malhotra M., Srivastava S.** 2008. An *ipdC* gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. *An. Van Lee.* 93: 425-433.

**Manulis S., Walinski L., Gafni Y., Hershenhorn J.** 1991. Indole 3 acetic acid biosynthetic pathways in *Erwinia herbicola* in relation to pathogenicity on *Gypsophila paniculata*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 39: 161-171.

**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. Jour. Of Syst. And Evol. Microbiol.* 58: 200-214.

**Martínez-Carrasco N.** 1998. Atributos poblacionales y reproductivos de *Pinus chiapensis* en Chiapas, México. *An. Ins. Biol. UNAM. Ser. Bot.* 69 (2): 119-134.

**Martínez-Chávez M.** 2000. Edad de transición de la madera juvenil a la madera madura de *Pinus chiapensis* (Martínez) Andresen de Tanetze de Zaragoza, Oaxaca. UAC. Div. de Cienc. For.

**Masciarelli O., Urbani L., Reinoso H., Luna V.** 2013. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. *J. of Microbiol.* 51 (5): 590-597.

**Matthews S. J., Williams T. L.** 2011. An efficient and extensible approach for compressing phylogenetic trees. *BMC Bio.* 12 (10): S10-S16.

**Mirov N. T.** 1954. Composición de las trementinas de los pinos mexicanos. *Rev. De Silv. y Pro. For.* 8 (4).

**Mithani A., Preston G. M., Hein J.** 2010. A bayesian approach to the evolution of metabolic networks on a phylogeny. *PLoS Comput Biol.* 6 (8): e1000868.

**Mollet C., Drnacourt M., Didier R.** 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* 26 (5)1005-1011.

**Newton A. C., Allnutt T. R., Dvorak W. S., del Castillo R. F., Ennos R. A.** 2002. Patterns of genetic variation in *Pinus chiapensis*, a threatened mexican pine, detected by RAPD and mitochondrial DNA RFLP marker. *Heredity*. 89: 191-198.

**Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, la cual establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.** 2002. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de La Nación.

**Osorio N. W.** 2002. Muestreo de Suelos. Universidad Nacional de Colombia. Medellin, Colombia.

**Pei A. Y., Oberdorf W. E., Nossa C. W., Agarwal A., Chokshi P., Gerz E. A., Jin Z., Lee P. Yang L., Poles M., Brown S. M., Sotero S., deSantis T., Brodei E., Nelson K., Pei Z.** 2010. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (12): 3886.

**Pereira R. M., da Silveira E. L., Scaquitto D.C., Predrinho E. A. N., Val-Moraes S. P., Wickert E., Carareto-Alves L. M., Lemos E. G. M.** 2006. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Braz. J. Microbiol.* 37 (4): 439-447.

**Pirttilä A. M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A.** 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridation. *APPL.* 66 (7): 3073-3077.

**Rastogi R., Wu M., DasGupta I., Fox G. E.** 2009. Visualization of ribosomal RNA operon copy number distribution. *BMC Microbiol.* 9 (208).

**Rodríguez-Acosta M., Arteaga-Martínez B.** 2005. Índice de sitio para *Pinus chiapensis* (Martínez) Andressen, en los estados de Veracruz y Puebla, México. *Rev. Chapingo. Cienc. For. y del Amb.* 11 (1) 39-44.

**Ryu R. J., Patten C. L.** 2008. Aromatic aminoacid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacace* UW5. *J. of Bacteriol.* 190 (21): 7200-7208.

**Rzedowski J.** 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Ac. Bot. Mex.* 35: 25-44.

**Sánchez Vargas N.M., del Castillo Sánchez R.** 2001. Calidad de estación para *Pinus chiapensis* (Mart.) Andressen en El Rincón, Oaxaca, México. *For. Ver.* 3 (2): 9-12.

**Satoh S., Mimuro M., Tanaka A.** 2013. Construction of a phylogenetic tree of photosynthetic prokaryotes based on average similarities of whole genome sequences. *PLoS ONE.* 8 (7): e70290.

**SEDESOL.** 1994. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL794. Secretaria de Desarrollo Social. Diario Oficial de la Federación, México, D.F.

**SEDESOL.** 2001. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

**Slabbinck B., Waegeman W., Dawyndt P., De Vos P., De Baets B.** 2010. From learning taxonomies to phylogenetic learning: integration of 16S rRNA gene data into FAME-based bacterial classification. *BMC.* 11 (69): 1471.

**Smit E., Leeflang P., Glandorf B., Elsas J. D., Wernars K.** 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *APEM.* 65 (6): 2614-2621.

**Szkop M., Sikora P., Orzechowski S.** 2012. A novel, simple and sensitive colorimetric method to determine aromatic amino acid aminotransferase activity using the Salkowski Reagent. *Folia. Microbiol.* 57: 1-4.

**Taylor B. N., Strand A. E., Cooper E. R., Beidler K. V., Schonholz M., Pritchard S. G.** 2014. Root length, biomass, tissue chemistry and mycorrhizal colonization following 14 years of CO<sub>2</sub> enrichment and 6 years of N fertilization in a warm temperate forest. *Tree Phys.* 34 (9): 955-965.

**Vaario L. M., Lu J., Koistinen A., Tervahauta A., Aronen T.** 2014. Variation among matsutake ectomycorrhizae in four clones of *Pinus sylvestris*. *Myc.* 6 (6): 793-798.

**Vetrovsky T., Baldrian P.** 2013. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS ONE.* 8 (2): 57923.

**Vilela A. E., Acosta C. S.** 2001. *Pinus chiapensis* un enfoque ecológico de su anatomía foliar. *Pol.* 11: 111-120.

**Vos M., Quince C., Pijil A. S., de Hollander M., Kowalchuk G. A.** 2012. A comparison of *rpoB* and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS ONE.* 7 (2): 30600.

## 12. Anexos.

### 12.1 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo aquí descritos fueron utilizados en forma sólida a excepción del medio King B.

#### **TESMA** (fórmula para 1l).

Extracto de levadura	2.7 g
Dextrosa anhidra	2.7 g
Manitol	1.8 g
Buffer TES o MES	4.4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.65 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4.8 g
Azul de bromotimol	4.0 g
Agar	16.0 g
pH: 6.7	

#### **PY** (fórmula para 1l).

Bactotripton	5 g
Extracto de levadura	3 g
$\text{CaCl}_2$	0.7 g
Agar	15 g

#### **Medio mínimo M9** (fórmula para 1l).

Solución 10X M9	3 ml
$\text{MgSO}_4$ (1M)	30 ml
Fe-Cit	30 ml
Solución goodies	75 ml
Fuente de carbono (20%)	0.75 ml

\*La fuente de carbono puede variar de acuerdo a los requerimientos.

\* En éste estudio se utilizó glucosa como fuente de carbono.

**Solución 10X M9** (fórmula para 1l).

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g
NaCl	5 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g

**Solución goodies** (fórmula para 1l).

ZnCl <sub>2</sub>	50 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	30 mg
Bo <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	300 mg
CoCl <sub>2</sub>	200 mg
C <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	20 mg

**Rojo Congo** (fórmula para 1l).

Ácido málico o succínico	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%)	5 ml
MgSO <sub>4</sub> (10%)	2 ml
NaCl (10%)	1 ml
Extracto de levadura	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> (0.1g/10ml)	1.5 ml
KOH	4.8 g
Rojo congo (1g/400ml)	15 ml
Agar	10 g
pH: 6.8-7.0	

**LGI** (fórmula para 1l).

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10%)	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10%)	6 ml
MgSO <sub>4</sub> (10%)	2 ml
CaCl <sub>2</sub> (10%)	2 ml
Glucosa	100 g
FeCl <sub>3</sub> (1%)	1 ml
Extracto de levadura	50 mg
Azul de bromotimol	6 ml

---

Verde de bromotimol	2 ml
NaMo <sub>4</sub> (1%)	200 µl
Agar	16 g

**LB** (fórmula para 1l).

Bactotripton	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15g

**King B** (fórmula para 1l).

Peptona	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
MgSO <sub>4</sub>	1.5 g
Glicerol	1.5% (v/v)
Triptófano	0.1 g

**12.2 Soluciones.****Reactivo PC para índoles** (fórmula para 25 ml).

FeCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.5 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10.8 ml
Agua	14.2 ml

**New wash 10X** (fórmula para 100 ml).

Tris base	2.42 g
NaCl	0.58 g

\*Ajustar pH: 7.6-8.0 con ácido acético glacial

**New wash 1X.**

New wash 10X	1 ml
Agua	9 ml
Etanol (100%)	10 ml

**CaCl<sub>2</sub> [0.15 M] y glicerol al 15%**

A 5 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> [0.15 M] adicionar 90 µl de glicerol al 100%.

**12.3 Procedimientos.****Esterilización de semillas con hipoclorito de sodio (0.5%).**

1. Lavar las semillas con agua corriente (hasta que la suciedad sea eliminada).
2. Colocar las semillas en un vaso de precipitados estéril. Adicionar aproximadamente 30 ml de agua destilada estéril y tween 20 al 0.20%. Agitar durante 10 min.
3. Enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril.
4. Colocar aproximadamente 30 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y agitar durante 10 min.
5. Enjuagar las semillas 3 veces con agua destilada estéril.
6. Dejar secar.

Nota: todo debe hacerse en condiciones estériles a partir del paso 2.

**Obtención del lisado celular.**

1. Centrifugar a 13 000 rpm 1 ml de cultivo de 16 hrs (o de toda la noche) en un tubo eppendorff.
2. Lavar 2 veces con TE 50/20, retirando el sobrenadante.
3. Después del último lavado y de retirar el sobrenadante, agregar 100 µl de agua inyectable estéril y someter a 95°C durante 10 min.
4. Posteriormente dejar enfriar y centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min.
5. Recuperar el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo eppendorff.
6. Alicuotar la muestra en volúmenes de 20 µl, para evitar descongelaciones innecesarias.

**Purificación de banda mediante precipitación con sílica.**

1. Después de cortar la banda de interés y colocarla en un tubo eppendorff, agregar 3 volúmenes de NaI [6 M] de acuerdo al peso de la banda cortada, derretir a 65°C durante aproximadamente 10 min.

2. Agregar 10  $\mu\text{l}$  de sílica y homogenizar por inversión suavemente, e incubar durante 10 min.
3. Centrifugar durante 1 min a 13 000 rpm y decantar el sobrenadante.
4. Realizar 3 lavados con 500  $\mu\text{l}$  de New Wash 1X, retirando entre cada lavado el sobrenadante.
5. Dejar secar la pastilla de sílica a 37°C y después resuspenderla en 30  $\mu\text{l}$  de agua inyectable.
6. Centrifugar 2 min a 13 000 rpm y recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorff.

### **Células competentes con $\text{CaCl}_2$ .**

1. Inocular 5 ml de caldo LB e incubar a 37°C toda la noche (pre cultivo).
2. Inocular 500  $\mu\text{l}$  de cultivo en 50 ml de caldo LB en un matraz de 500 ml con caldo LB a 37°C, hasta obtener una D.O. de 0.450 a 600 nm (2-3 hrs de cultivo, no debe rebasarse esa D.O.).
3. Colocar el matraz en hielo por 30 min y en refrigeración una vez alcanzada la D.O.
4. Transferir el cultivo a tubos de centrifuga de 250 ml y centrifugar a 8 000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender suavemente la pastilla en 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  [0.15 M] e incubar en hielo durante 60 min en refrigeración, pasado el tiempo centrifugar a 8 000 rpm durante 10 min a 4°C (repetir 1 vez más el paso 5).
6. Decantar el sobrenadante y resuspender cuidadosamente la pastilla con 600  $\mu\text{l}$  de solución fría de  $\text{CaCl}_2$  [0.15 M] y con una concentración final de glicerol al 15%.
7. Alicuotar 150  $\mu\text{l}$  en tubos eppendorff y almacenar a -80°C.

**Nota: todo debe hacerse estrictamente en condiciones de esterilidad y a las temperaturas señaladas, además las soluciones deben estar a 4°C al momento de utilizarse.**

### **Transformación.**

1. Sacar las células competentes de -80°C (150  $\mu\text{l}$ ) y dejar el hielo durante 5 min.
2. Adicionar la ligación (el total de la reacción, 10  $\mu\text{l}$ ).
3. Incubar 5 min en hielo.
4. Someter las células a 42°C durante 45 s.

5. Pasar inmediatamente a caldo LB e incubar a 37°C durante 2 hrs.
6. Centrifugar y decantar el sobrenadante, adicionando 100 µl de caldo LB.
7. Plaquear las células con el antibiótico de selección.

#### **Preparación de sílica.**

1. Pesar 5 g de sílica en un tubo estéril de 5ml.
2. Agregar 50 ml de agua inyectable estéril, resuspender y dejar reposar toda la noche.
3. Decantar el sobrenadante, agregar nuevamente 50 ml de agua inyectable estéril y dejar reposar 2 hrs.
4. Decantar el sobrenadante, agregar 25 ml de agua inyectable estéril y dejar reposar 2 hrs.
5. Decantar el sobrenadante y agregar 1 volumen de agua inyectable estéril. Homogenizar.
6. Alicuotar en tubos eppendorff y esterilizar a 10 lb durante 10 min.

#### **Cuantificación de proteínas.**

1. Centrifugar el un tubo eppendorff 1 ml de cultivo a 13 000 rpm y decantar el sobrenadante.
2. Lavar con solución salina (NaCl 0.8%) y retirar el sobrenadante con un pipeta.
3. Resuspender en 1 ml de agua.
3. Tomar 25 µl de muestra y agregar en otro tubo 475 µl de agua. Mezclar bien.
4. Tomar 400 µl de muestra y agregar 400 µl de reactivo Bradford en una celda de medición.
5. Dejar incubar 5 min a temperatura ambiente y leer a 595 nm.

**Nota: Antes de leer homogenizar bien la muestra, la cual es viable durante 45 min.**