



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Estudios de resistencia
a la desecación de *Burkholderia tropica* MTo293
y su capacidad de colonización en maíz amarillo.**

Tesis

presentada como requisito para obtener el título de
Licenciado en Biología

Presenta

Fernando Xicale Nava

Director de Tesis:

D.C. Yolanda Elizabeth Morales Gracia



OCTUBRE 2015

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONACYT 156576, DITCo2015-29, VIEP NAT15-I y Apoyos a CA-262, en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICBUAP.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Graciela Nava Lobato por darme la vida, sembrar en mí un espíritu crítico, inculcarme desde niño la idea de terminar una carrera profesional y hacer de mí un chico con carácter, por protegerme como una fiera cuando más vulnerable fui y mostrarme que tenía mucho camino por recorrer en éste maravillosa ruta de lo que denominamos vida. A mi padre Claudio Xicale Zamora por dejarme volar desde muy joven, permitiéndome tomar mis propias decisiones y ser yo el único responsable de lo que acontece en mi vida y a Dios, ese que tiene mil nombres pero que sólo busca hacer de mí una persona correcta, humilde y dadivosa.

Mi más sincero reconocimiento, respeto y afecto a quien ha sido parte de mi familia en éstos últimos 14 años de mi vida la Dra. Alicia Inés Bernard Menna por ser para mí un referente de dedicación, calidad moral, talento, caridad y muchas otras cualidades, por servirme de apoyo académico, económico y espiritual, siendo imprescindible para lograr mucho de lo que he logrado obtener en mi vida, mil gracias por todo esto y seguro estaremos en muchas experiencias más. A todas las mujeres que me dieron fuerza en distintas etapas de mi vida, mis abuelas, mis tías: Judith, Fabiola y Sonia, a mis profesoras Elena de la Luz Domínguez, Marlene Martínez Cornejal, Dolores Ramos Vera, Tomasa Marroquín Bravo, Marie-Francoise Blanchot (por regalarme momentos maravillosos de alegría y mimos), Dalia Molina Romero (por creer en mí y abrirme la mente para trabajar en microbiología), a quienes me permitieron compartirlas un poco de mí: Emma, Adelaida, Alita, Zaira, Ana Laura, Dianita, Luz, Pao, Úrsula y Hellen, Thalía, Vane (y lamento si olvidé a alguien), a mis madres co-titulares, Amelia, Elva y Pachis (por alimentarme). Todas ellas mujeres entregadas a sus ideales y formas de ser.

A los hombres que fueron parte formación o me brindaron su desinteresado apoyo: el Prof. Pedro Palma, mi tío Sergio Tecaxco, Dr. Dionisio Juárez Ramón, Prof. Ernesto Zárate, mi tío Marco Antonio Nava, al Dr. Miguel Seguí Llinás y al Dr. Jesús Muñoz Rojas por hacerme un espacio en su nutrido grupo de investigación.

A Rene Rivera Bonilla por todas las experiencias de vida tan bonitas que compartimos y que deseo seguir compartiendo, por ser un confidente y amigo, compañero de juega, de aprendizajes y de momentos difíciles, por ser un hermano, cómplice y compinche, gracias.

A mi grupo de laboratorio en especial a Osvaldo por sus múltiples consejos académicos, a Jessie por generarme nuevas metas y formas de conocerme, a Dalia Juárez por ayudarme y a todos en general por nutrirme de nuevas y mejores ideas todos los días.

A mis cuates de vida Federico, Noé (Huesos), Gustavo y demás personas que me han acompañado en el camino.

A mi asesora de tesis D. C. Yolanda Elizabeth Morales García por su paciencia en la revisión de mi trabajo así como por las aportaciones de mis sinodales D. C. Rocío Pérez y Terrón y a la M. C. Dalia Molina Romero.

A mi escuela por proveerme de las herramientas necesarias para construir conocimiento.

A la vida por ser tan benévola conmigo aún cuando en algún momento no lo pudiese ver así y por permitirme intentar comprenderla desde sus partículas hasta sus interacciones, dejándome caminar la sinuosa pero mágica ruta de la Biología.

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| RESÚMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)..... | 3 |
| ANTECEDENTES | 6 |
| Efectos de la desecación sobre las bacterias..... | 7 |
| JUSTIFICACIÓN | 10 |
| HIPÓTESIS | 11 |
| OBJETIVO GENERAL | 12 |
| Objetivos particulares..... | 12 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 13 |
| Curva de crecimiento..... | 13 |
| Experimentos de desecación..... | 15 |
| Obtención de semillas axénicas..... | 18 |
| Determinación de adhesión de <i>Burkholderia tropica</i> MTo293 a semillas de maíz amarillo criollo (<i>Zea maiz</i>)..... | 18 |
| Determinación de colonización de <i>B. tropica</i> MTo293 a semillas de maíz amarillo criollo (<i>Zea maiz</i>)..... | 19 |
| Estudios de efectos de la desecación sobre el gen 16S DNAr..... | 19 |
| Análisis estadístico..... | 20 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS | 21 |
| Curva de crecimiento en UFC/ml de <i>Burkholderia tropica</i> MTo293..... | 21 |
| Adhesión de <i>Burkholderia tropica</i> MTo293 a semillas de maíz amarillo..... | 22 |
| Colonización de <i>Burkholderia tropica</i> MTo293 en raíces de plantas de maíz amarillo..... | 23 |
| Pérdida de Agua en Desección..... | 24 |
| Determinación de resistencia a la desecación de <i>B. tropica</i> MTo293..... | 25 |
| Extracción de DNA de <i>B. tropica</i> MTo293 antes y después de la desección..... | 26 |
| Amplificación del gen 16S DNAr por PCR de <i>B. tropica</i> MTo293..... | 27 |
| Comparación entre secuencias del gen 16S DNAr antes y después de la desección..... | 28 |
| DISCUSIÓN | 29 |
| CONCLUSIONES | 31 |
| PERPECTIVAS | 32 |
| BIBLIOGRAFÍA | 33 |
| Anexo 1 | 42 |

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la resistencia a la desecación de *Burkholderia tropica* MTo293, una bacteria con potencial promotor del crecimiento vegetal. Primero se realizó una curva de crecimiento de *B. tropica* MTo293 para determinar el tiempo requerido para alcanzar su fase estacionaria y así realizar los ensayos de desecación en esta etapa. Después se sometieron a desecación alícuotas de 500µl de suspensión bacteriana, a una humedad relativa de 50% y una temperatura alrededor de 35°C. Cada tres días, cinco tubos con muestra desecada fueron rehidratados y se cuantificó por goteo en placa el número de UFC/ml sobrevivientes con una hidratación corta (1h) e hidratación prolongada (24h) observando números mayores en la segunda condición. El siguiente experimento consistió en extraer DNA total de las bacterias antes y después de la desecación, al que se le amplificó el gen 16S DNAr por PCR. Después de cuantificar en Nanodrop y de corroborar por electroforesis en gel de agarosa la presencia del gen 16S DNAr, se mandó a secuenciar. Las secuencias obtenidas se compararon, para explorar posibles cambios ocurridos entre las secuencias del gen 16S DNAr antes de la desecación y aquellos obtenidos después de la desecación. También se exploró la capacidad de *B. tropica* MTo293 de adherirse a las semillas y para colonizar a la raíz en plantas de maíz amarillo, así como su capacidad para promover el crecimiento de la planta.

Introducción

Existe una gran posibilidad de que el primer reverdecimiento del paisaje terrestre se haya dado gracias a la presencia de bacterias y algas verdes aún antes del precámbrico, hace más de 300 millones de años sin embargo, no fue sino hasta que los niveles de oxígeno atmosférico en la tierra aumentaron, que se pudo formar una capa de ozono, misma que proporcionó protección a la tierra contra los efectos dañinos de los rayos ultravioleta y de onda corta, permitiendo la invasión de la Tierra por plantas y animales en grandes cantidades (Scott; en Weber 1989). Visto así, si las bacterias han estado presentes desde millones de años atrás, han tenido que adaptarse a distintas condiciones ambientales, desarrollando mecanismos eficientes para enfrentar las adversidades de su entorno. Se estima que sólo se ha aislado alrededor del 1% de las bacterias existentes (Amann *et al.*, 1995; Curtis *et al.*, 2002; Hughes *et al.*, 2001) no obstante dada la información genética que contienen estos microorganismos se les considera como el más vasto y valioso reservorio de información para ser usado con fines agrobiotecnológicos (Morales García, 2013).

Las bacterias son organismos unicelulares microscópicos sin núcleo definido por una membrana por lo cual se les conoce como procariotas y se ubican en el reino monera. Su reproducción es principalmente asexual por fisión binaria, su morfología puede ser: esférica, cilíndrica, espiral o en forma de coma (vibrión), pudiéndose agrupar en pares, racimos y cadenas, estando presentes en casi todos los ambientes naturales. Tienen un sólo cromosoma ubicado en el nucleóide, con un DNA circular y algunas bacterias llegan a tener plásmidos, que son pequeños lazos de DNA sueltos en el citoplasma (Murray *et al.*, 2009).

A pesar de lo “simples” que pueden resultar estos microorganismos, según su metabolismo las bacterias ácido lácticas pueden impactar en la industria lechera en la elaboración de quesos y derivados de lácticos (Parra-Huertas, 2010). Las fermentadoras en la producción de vinagre (Ferreyra *et al.*, 2014), las fijadoras de

nitrógeno (diazotróficas) beneficiando el crecimiento de algunas plantas (Sessitsch *et al.*, 2002), las saprófitas como degradadoras de materia orgánica o las antagonistas de patógenos a la raíz y promotoras de crecimiento vegetal (Caballero-Mellado, 2006).

En ecología de suelos se ha observado que la estabilidad de las bacterias edáficas radica en las redes de interacciones con otros microorganismos y su entorno, por lo tanto, la capacidad de autoorganización de los sistemas complejos, puede inducir incluso mecanismos de defensa contra fitopatógenos del suelo en plantas, mostrando la compleja relación microorganismo-planta y su importancia en el sustento alimenticio para el humano y muchos otros seres vivos (Bautista-Calles *et al.*, 2008).

Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR)

Las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR de sus siglas en inglés “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”) son bacterias que habitan la rizósfera de las plantas que es la porción desuelo circundante a la raíz y que se encuentra bajo su influencia; ya que es capaz de exudar una amplia gama de compuestos orgánicos. Por otro lado el rizoplasma es la superficie de la raíz donde también están fuertemente adheridas las partículas del suelo (Kennedy, 2005). Las PGPR tienen la capacidad de incrementar la biomasa vegetal de interés agrícola (Baset-Mia *et al.*, 2010) o influenciar su crecimiento reduciendo el estrés biótico y abiótico (Alizadeh y Parsaeimehr, 2011) aumentando la producción y pueden llegar a generar inmunidad en los vegetales (Porcel *et al.*, 2014). Los mecanismos de promoción se clasifican en directos e indirectos: siendo los primeros, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas como las auxinas (IAA), citoquininas y giberelinas, la inhibición o disminución de síntesis del etileno y el aumento de la permeabilidad de la raíz (Kloepper *et al.*, 1989; Glick *et al.*, 1999) y dentro de los segundos, la resistencia sistémica adquirida y la inducida,

la producción de sideróforos, la hidrólisis de moléculas producidas por patógenos, la producción de enzimas líticas de pared celular fúngica, la competencia por sitios en la raíz, la producción de antibióticos, el agotamiento del hierro de la rizósfera, la síntesis de los metabolitos antifúngicos, y la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) (Glick *et al.*, 1999; Sarabia Ochoa *et al.*, 2010).

Una de las áreas de gran interés para la aplicación de estos organismos, es la agricultura de los alimentos básicos, ya que el incremento en la población mundial ha generado un aumento del requerimiento de los mismos y como consecuencia una gran demanda de fertilizantes químicos que además de ser costosos son perjudiciales para el medio ambiente (Sánchez López *et al.*, 2012).

La primer bacteria perteneciente al género *Burkholderia* sp, se describió en 1942 por Walter H. Burkholder, siendo *Phytomonas caryophylli* y renombrada tiempo después como *Pseudomonas caryophylli*; sin embargo, en un principio se le ubicó de manera errónea en el género *Pseudomonas* y no fue sino hasta principios de la década de los 70's que con análisis de hibridación de rRNA-DNA se encontró una considerable diversidad genética en los miembros de éste grupo, mismos que se situaron en cinco categorías denominadas grupos homólogos de rRNA aunque la creación del género *Burkholderia* tal como hoy se le conoce no se concretó sino hasta 1992, momento en el que se reubicó a *P. caryophylli* en este género (Compant *et al.*, 2008). Actualmente el género comprende alrededor de 70 especies aisladas de nichos muy diversos y de distribución mundial en los que se incluyen: suelos, agua, plantas, hongos e insectos (Gyaneshwar *et al.*, 2011), clasificado principalmente en dos grandes grupos. El primer grupo incluye a las especies patógenas para humanos, animales y plantas como por ejemplo: *Burkholderia glumae*, *Burkholderia pseudomallei*, y *Burkholderia mallei*, así como también a las 17 especies del denominado complejo *B. cepacia*. Por otra parte los estudios más recientes ubican en el segundo grupo a más de 30 especies no patógenas encontradas frecuentemente en asociación con plantas y por lo que se podría considerar tienen un potencial efecto benéfico (Suárez Moreno *et al.*, 2012) a estas

especies se las identifica dentro del denominado grupo de Burkholderias de asociación benéfica-planta-ambiente (PBE) (Suárez-Moreno *et al.*, 2012). El género *Burkholderia* pertenece a la familia Burkholderiaceae del orden Burkholderiales y de la clase Betaproteobacterias. Las bacterias de este género son catalasa positivas, la mayoría móviles (salvo *B. mallei.*), muchas acumulan poli- β -hidroxibutirato (PHB) como fuente de reserva de carbono, son quimioorganótrofas y estrictamente aerobias aunque algunas pueden ser anaerobias en medios con nitratos (Palleroni, 2005).

Los miembros del género *Burkholderia* son organismos muy versátiles ya que ocupan un amplio rango de nichos ecológicos, siendo de amplia distribución geográfica y ambiental. Pueden habitar desde suelos contaminados hasta el tracto respiratorio de los seres humanos (Paganin *et al.*, 2011). Sin embargo es importante conocer sus características de supervivencia en cada ambiente para explotar mejor sus capacidades. Algunas bacterias con potencial biotecnológico pueden ser resistentes a la desecación, definida como la capacidad que tiene un organismo de perder agua hasta alcanzar el equilibrio con el agua presente en el aire. Cuando la desecación ocurre la célula alcanza un contenido de 0.1 gramos de agua por gramo de peso seco o menos del 10% de agua en el interior del organismo por cada gramo de peso (Potts, 1994; Alpert, 2005;). La desecación es diferente a la tolerancia a la sequía, la tolerancia a la sequía es la baja disponibilidad de agua en el entorno de un organismo en contraste con tolerancia a la desecación que es el bajo contenido de agua en el interior de la célula (Alpert, 2005).

Muchas bacterias del género *Burkholderia* son fijadoras de nitrógeno y se han utilizado en el biocontrol, la bioremediación y la promoción del crecimiento vegetal (Estrada de los Santos *et al.*, 2001; Coenye y Vandamme, 2003; Payne *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

Diversas investigaciones se han enfocado en el aislamiento y caracterización de nuevas PGPR (Guzmán *et al.*, 2012) ya sea por su potencial como agentes de biocontrol o antagonistas (Marín-Cevada *et al.*, 2011; Beneduzi *et al.*, 2012), por sus capacidades de promover el crecimiento de plantas por vía hormonal (Muñoz-Rojas and Caballero-Mellado *et al.*, 2003; Sevilla *et al.*, 2001), la fijación de nitrógeno (Martínez-Aguilar *et al.*, 2013) o la estimulación de crecimiento por mecanismos de respuesta de defensa de plantas (Berendsen *et al.*, 2015).

Para el caso de bacterias del género *Burkholderia* se ha reportado que la cepa TVV75 de *B. vietnamiensis* beneficia el crecimiento de plantas de arroz cultivadas en suelos ácidos sulfatados de baja fertilidad (Trân Van *et al.*, 2000), incrementando el peso seco de raíz y área foliar de las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Poco tiempo después, la cepa *B. tropica* MTo293 se aisló de tallo de plantas de maíz de la variedad *Landrace* en Tlayacapa, Morelos con potencial PGPR (Estrada de los Santos *et al.*, 2001.). Perin y cols.(2006), identificaron 111 cepas del género *Burkholderia* asociadas a maíz y caña de azúcar siendo todas fijadoras de nitrógeno con presencia de genes *nifH* predominando en la asociación de *B. tropica* a maíz. Por otro lado Brämer y cols. (2001) reportaron que la cepa *B. sacchari* IPT101^T aislada del suelo de plantaciones de caña de azúcar en Brasil produce polihidroxicanoatos a partir de sacarosa y otras fuentes de carbono. Caballero-Mellado y cols. (2004) reconocen como nueva especie a *B. unamae* a partir de aislados provenientes de la rizósfera y rizoplano de maíz, caña de azúcar y plantas de café, diferenciándola de otras especies con patrones de restricción de 16S rDNA (ARDRA). Reis y cols. (2004) reportan una nueva cepa denominada *B. tropica* la Ppe8^T con base a un análisis taxonómico, que además de fijar nitrógeno produce hidroxamatos, en un estudio posterior de Serrato y cols. (2006) muestran que la cepa Ppe8 de *B. tropica* tiene la capacidad de producir exopolisacárido como estabilizador de los agregados del suelo y de importancia en la asociación y colonización planta-bacteria además en otro estudio purificaron

Xicale-Nava F., (2015).

moléculas señal participantes en el proceso de “quorum sensing” denominadas acilhomoserín lactonas (HLS) y HLS-like producidas por cepas del género *Burkholderia*, responsables de la adhesión y colonización a semillas y raíz respectivamente (Poonguzhali *et al.*, 2007). En el estudio realizado por Guo y cols. (2011) se mostró que *Burkholderia* sp D54 produce ácido-indol-acético (IAA), sideróforos, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, solubiliza fosfatos inorgánicos y metales insolubles potenciando significativamente la producción de biomasa y el incremento de las raíces de *Sedum alfredii* en suelos contaminados por concentraciones altas de Cd, Pb, Zn promoviendo una fitoextracción de los mismos, además se ha reportado que *Burkholderia* sp. BS3702 (pBS1143) es capaz de degradar fenantreno (Puntus *et al.*, 2008). *B. caballeronis* aislada de raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum*) fue capaz de nodular plantas de frijol y por ende fijar nitrógeno (Martínez-Aguiar *et al.*, 2013). Las cepas de *Burkholderia* tienen un elevado potencial para fijar nitrógeno y hay varios reportes de la presencia de estos genes en cepas del género (Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2004). Las secuencias de los genes *nifH* de *Burkholderia* aisladas del sur de África mostraron un porcentaje de similitud de 88-92% con una gama de especies fijadoras de nitrógeno de *Burkholderia* (por ejemplo, *B. unamae*, *B. xenovorans* y *B. tropica*) (Beukes *et al.*, 2014).

En *B. tropica* MTo293 aún no hay mucho conocimiento de su interacción con plantas y sus posibles efectos promotores del crecimiento, menos aún sobre su tolerancia a estrés abiótico o sus cambios en el material genético durante estos estreses. No obstante, es concebible que algunas funciones son afectadas durante la desecación (Potts, 1994).

Efectos de la desecación sobre las bacterias.

Las bacterias han tenido que soportar innumerables eventos de desecación desde su existencia en la Tierra (Alpert, 2005), por lo que han diseñado estrategias para enfrentar este fenómeno (Dose, 1992; Potts, 1994; Leslie *et al.*, 1995). La

pérdida de agua que ocurre en la desecación de bacterias provoca cambios diversos en la estructura celular (Potts, 1994), por ejemplo las células se retraen hasta el colapso, donde las membranas pueden sufrir rupturas, hay pérdida de función de proteínas que ya no pueden recuperar sus estructuras adecuadas durante la rehidratación, ocurren reacciones de Maillard y hay daños a nivel de DNA. En particular los daños al DNA se han medido a través ensayos de hibridación DNA-DNA y espectrofotometría; observando que las curvas de hibridación están modificadas en las bacterias que han sido desecadas (Potts, 1994). Sin embargo aún no hay muchas evidencias de los cambios en secuencias de los genes que soportan la vida de una bacteria. Un gen interesante para ser estudiado en estos cambios es el gen 16S DNAr ya que es un gen que codifica para RNA estructural importante para el desempeño de las funciones de los ribosomas (Baker *et al.*, 2003; Morales-García *et al.*, 2007). El gen 16S DNAr es un gen altamente conservado entre las especies y pocas mutaciones son permisibles, si este gen tuviese demasiadas mutaciones, la estructura de los ribosomas podría perderse y en consecuencia la función de síntesis de proteínas estaría comprometida (Morales-García *et al.*, 2007), sin embargo algunos cambios podrían ser permisibles, sobre todo cambios coordinados en la secuencia que no afecte la estructura tridimensional del 16S RNAr (Baker *et al.*, 2003; Amman *et al.*, 1995). Otros genes que sostienen el funcionamiento celular o metabólicos también podrían ser abordados, por ejemplo el gen *recA* es un marcador filogenético altamente resuelto y ha demostrado ser una herramienta valiosa para discriminar especies dentro del género *Burkholderia* (Bournaud *et al.*, 2013). Los genes específicos de funciones para *Burkholderia* como *nif+*, *acdS*, *bral/R*, *nif+*, *bral/R* (Suárez-Morenos, 2012), están más lejos de ser estudiados en los eventos de estrés.

En resumen muchas bacterias del género *Burkholderia* tienen potencial como promotoras del crecimiento vegetal (Reis *et al.*, 2004; Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Caballero-Mellado *et al.*, 2007), gran parte de ellas son simbiotes de leguminosas (Bournaud *et al.*, 2013), además de que en algunas especies se ha encontrado actividad antagónica contra patógenos (Tenorio-Salgado *et al.*, 2013) así como

actividad de degradación de compuestos xenobióticos (Paganin *et al.*, 2011; Chiarini *et al.*, 2006). Dada la versatilidad de especies de este género y sus potenciales PGPR, en este trabajo se eligió a la cepa *B. tropica* MTo293 para estudiar su capacidad de adherencia y colonización en maíz amarillo, además de determinar su nivel de resistencia a la desecación, las bacterias más resistentes a la desecación podrían tener mejor éxito cuando se asocian a semillas si es que hay escasez de agua, las bacterias podrían hidratarse en el momento oportuno y permitir una interacción eficiente cuando las semillas germinen en condiciones de campo (Muñoz-Rojas, 2013). Para contribuir con el conocimiento de posibles cambios que se generen durante la desecación de las bacterias es necesario calcular la Tasa de Supervivencia Bacteriana (BSR por sus siglas en inglés "Bacterial Survival Rate") y que es la relación del número de células bacterianas presentes en una suspensión después de algún estrés en referencia con el número observado antes del estrés: $BSR = (\log A_e / \log B_e) \times 100$, (A_e Antes de un estrés B_e después de un estrés) (Muñoz-Rojas *et al.*, 2006). Además se analizaron los cambios que ocurren en el gen 16S DNAr como consecuencia de éste estrés.

JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que *B. tropica* MTo293 es una buena colonizadora de la rizósfera de algunas plantas, con potencialidad de PGPR (Poonguzhali *et al.*, 2007); sin embargo aún no se encuentra bien estudiada su capacidad de interacción con plantas de maíz. Las capacidades de *B. tropica* MTo293 para tolerar a la desecación no se han abordado y tampoco los posibles cambios durante este evento, no obstante este conocimiento es importante para valorar su posible utilización en el futuro como inoculante estable en semillas de cultivo agrícola. El uso de inoculantes estables a la desecación podría incrementar el éxito del efecto promotor del crecimiento beneficiando al campo al disminuir la utilización de fertilizantes sintéticos y al bajar los costos de producción.

HIPÓTESIS

Burkholderia tropica MTo293 colonizará la raíz de plantas de maíz criollo amarillo y se mostrará resistente al proceso de desecación, pudiéndose cuantificar aún después de ser sometida a este estrés.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de *B. tropica* MTo293 para colonizar la raíz de plantas de maíz amarillo criollo y su capacidad de resistir a la desecación.

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad de adhesión de *B. tropica* MTo293 a semillas de maíz amarillo.
- Evaluar la capacidad de *B. tropica* MTo293 para colonizar las raíces de maíz amarillo.
- Evaluar la capacidad de *B. tropica* MTo293 para resistir la desecación.
- Evaluar la integridad del gen 16S del DNA ribosomal (DNAr) de células antes y después de la desecación.

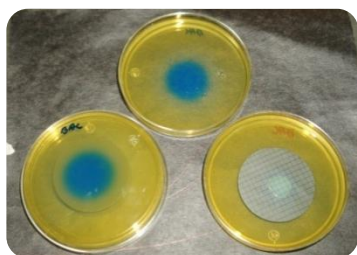
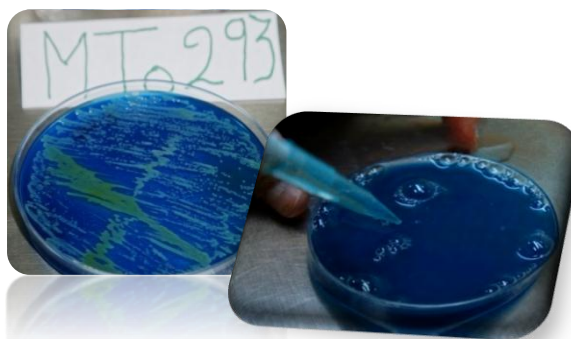
MATERIAL Y MÉTODOS

Curva de crecimiento

Las curva de crecimiento se realizó en placas Petri con medio sólido BAc (Estrada de los Santos *et al.*, 2001), para ello la cepa *B. tropica* MTo293 fue crecida en medio sólido BAc, en estriado masivo, durante toda la noche, el tapete celular se recogió y se colectó en 15 ml de agua destilada estéril (ver esquema 1). Veinte microlitros (μ l) de la suspensión bacteriana fueron colocados sobre membranas de nitrocelulosa (Membranas de filtración Sartorius de 45 mm de diámetro y 0.22 micrómetros de tamaño de poro) que a su vez estaban colocadas sobre el medio sólido BAc de la caja Petri. Se prepararon 33 placas para su evaluación. Cabe aclarar que *B. tropica* MTo293 no pasa a través de las membranas propuestas. Una vez colocadas las gotas de suspensión bacteriana, las cajas Petri se colocaron a 30 °C para permitir el crecimiento de bacterias. En el tiempo 0 y cada 3 horas se sacaron 3 placas para contabilizar el número de bacterias presentes sobre las membranas. Para esto a cada placa se le retiró la membrana con las células, cada una de ellas se depositó en un tubo Falcón de 15 ml de capacidad, que contenía 3 ml de agua destilada estéril. Los sistemas se agitaron vigorosamente por un minuto con la finalidad de homogeneizar la suspensión de bacterias, posteriormente un ml de la suspensión se usó para medir la densidad óptica (620nm) y otro para realizar diluciones seriadas en factor 1:10 P/V, que se utilizaron para realizar el conteo celular mediante la técnica de goteo en placa (Herigstad *et al.*, 2001).

Curva de crecimiento

1.- Sembrado por estriado masivo en placa de medio sólido BAc y colecta del tapete celular en 15ml de agua para generar la suspensión bacteriana inicial.

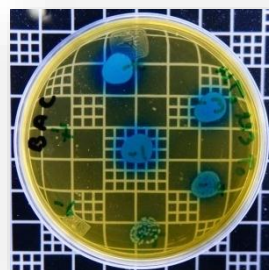


2.- Se sembraron 20µl de suspensión bacteriana en el centro de la membrana previamente colocada en la placa Petri con medio BAc.

3.- En cada monitoreo con pinzas estériles se retiraron las membranas y se colocaron en tubos Falcón con 3 ml de agua destilada estéril y se agitaron vigorosamente para cuantificar por diluciones seriadas y determinación de absorbancia.



4.- Cuantificación de UFC/ml por la técnica de goteo en placa.






Esquema 1: Procedimiento seguido para la realización de la curva de crecimiento y mediciones de turbidez.

Experimentos de desecación

Para evaluar la tolerancia a la desecación, se cosechó el tapete celular de placas con bacterias previamente crecidas de forma masiva (25 horas de crecimiento), como se describió anteriormente. Con ayuda de una micropipeta y puntas estériles, se depositó la suspensión bacteriana (de tres placas) en tubos Falcón estériles de 50 ml de capacidad. Se colectaron 45 ml de suspensión bacteriana, la cual fue lavada por centrifugación a 5000rpm durante 10 minutos (dos veces), se procedió a decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular en el mismo volumen inicial con agua destilada estéril, la suspensión fue homogenizada por agitación vigorosa a velocidad máxima. La suspensión obtenida se distribuyó en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, dispensando 500µl en cada uno, los cuales se cubrieron con tapones de algodón estériles y finalmente todas las muestras se colocaron en cámaras de desecación con temperatura mayor a 30 °C y humedad relativa (H. R.) ambiente menor al 50% (Ver esquema 2).

En el tiempo cero (T0) y cada 3 días posteriores al inicio de la desecación se tomaron tres muestras, para evaluar el número de células por goteo en placa. Las muestras antes de la desecación fueron inmediatamente diluidas en factor 1:10 para su cuantificación. En el día tres después del inicio de la desecación, el agua no había sido totalmente perdida, por lo que las muestras fueron aforadas con agua destilada estéril a 500 µl antes de realizar las diluciones seriadas para su cuantificación. En este experimento en particular se adicionaron 350µl de agua destilada estéril para hidratar a los microorganismos, dejándolos en hidratación por una hora (hidratación corta) y por 24 horas (hidratación prolongada). A partir del monitoreo 6 la cantidad de agua agregada fue de 500µl y las rehidrataciones se realizaron tanto a tiempos cortos como prolongados. La cuantificación de las bacterias se realizó mediante el método de goteo en placa usando el medio de

selección BAc. Con los datos del número de bacterias antes de la desecación y después de la desecación se calculó la tasa de supervivencia bacteriana.

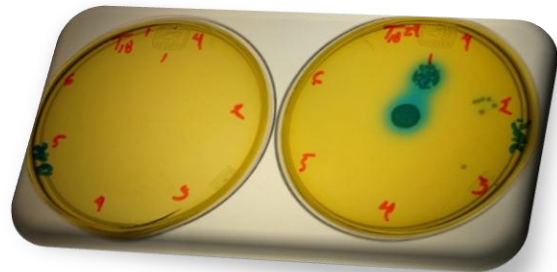
| Determinación de resistencia a la desecación | |
|---|---|
| <p>1.- Se cosechó el tapete celular de tres placas previamente sembradas de forma masiva y con 25 h. de crecimiento.</p> |  |
|   | <p>2.- Se procedió a el lavado celular (dos veces) que consistió en: centrifugar a 5000rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 45 ml de agua estéril.</p> |

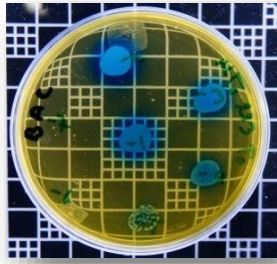
3.- De la suspensión obtenida, se hicieron alícuotas con 500µl de suspensión bacteriana en tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se cubrieron con tapones de algodón estériles



4.- Los tubos se colocaron en la cámara de desecación con una $t^{\circ} \geq 30^{\circ} \text{C}$ y una humedad relativa ambiente menor al 50% después de los tres primeros días

5.- Se cuantificó el número de bacterias que resiste a la desecación en UFC/ml, para cada monitoreo (T0, T3, T6... T18) con 1 y 24h de rehidratación (corta y prolongada respectivamente).





Cuantificación de UFC/ml por la técnica de goteo en placa.

Esquema 2: Procedimiento del ensayo de resistencia a desecación de *B. tropica* MTo293.

La pérdida de agua, de cada muestra sometida a desecación, fue evaluada, calculándose con la diferencia entre el peso inicial y el peso final (en cada tiempo de evaluación) registrado para cada muestra. Estos datos se graficaron y se evaluó su desviación estándar. Con éste experimento se logró conocer el día en el que las muestras dejaron de perder agua (equilibrio con el agua presente en el entorno).

Obtención de semillas axénicas

Las semillas de maíz fueron desinfectadas con alcohol al 70% y esterilizadas usando hipoclorito de sodio al 6% y lavados suficientes con agua destilada estéril (Morales-García *et al.*, 2011).

Determinación de adhesión de *Burkholderia tropica* MTo293 a semillas de maíz amarillo criollo (*Zea mays*)

Para las pruebas de adhesión a maíz amarillo se obtuvieron 15 ml de una suspensión bacteriana de *B. tropica* MTo293 como se describió anteriormente y las células se lavaron por centrifugación con agua destilada estéril. A la suspensión bacteriana obtenida se le determinó el número de UFC/ml mediante el método de goteo en placa. La suspensión bacteriana se dispensó en 5 tubos Falcón de 15 ml de capacidad, adicionando 3 ml de suspensión. A cada tubo se le colocaron 10

semillas de maíz amarillo axénico durante una hora. Se incluyeron controles sin inocular, que consistieron en semillas axénicas sumergidas en agua destilada estéril. Cinco semillas inoculadas y 5 no inoculadas se sacaron con pinzas estériles y se colocaron de forma independiente en tubos Falcón de 15ml de capacidad, que contenían 3ml de agua destilada estéril, se dejaron reposar durante 5 minutos y después se agitaron vigorosamente con ayuda de un vortex por 30 segundos. Se determinó el número de bacterias por ml contenidas en la suspensión y el resultado se multiplicó por tres para obtener el número de bacterias adheridas al maíz.

Determinación de colonización de *B. tropica* MTo293 a semillas de maíz amarillo criollo (*Zea mays*)

De las semillas sobrantes (del paso anterior) se procedió a sembrarlas de forma independiente en tubos Falcón de 50ml de capacidad, conteniendo 30 ml de vermiculita estéril. Después las semillas fueron adicionadas con 15ml de solución nutritiva MS (Murashige and Skoog, 1962) y 5 ml de agua destilada estéril y los sistemas se taparon con algodón estéril, todo esto en campana de flujo laminar para disminuir la tasa de infección por microorganismos propios del medio ambiente. Diez semillas se sembraron en suelo no estéril. A los 10 días posteriores a la siembra se retiraron las plántulas de maíz, se colocaron las raíces en tubos Falcón de 15ml con tres mililitros de agua estéril, se agitaron vigorosamente por 30 segundos, se dejaron reposar por 15 minutos y se procedió a realizar diluciones seriadas para su cuantificación por goteo en placa.

Estudios de efectos de la desecación sobre el gen 16S DNAr

A partir de bacterias cosechadas del tapete celular crecido en placas con medio BAc se purificó DNA genómico con el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega) (cuatro muestras independientes). A partir de 4 muestras desecadas durante 18 días y rehidratadas durante 1 hora, también se extrajo DNAm genómico. El DNA recuperado fue usado como molde para amplificar el gen 16S DNAr mediante la reacción de PCR usando los oligonucleótidos universales: UN27F secuencia 5'-TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y UN1392R secuencia 5'-CAGGGGCGGTGTGTACA-3', con las condiciones de reacción siguientes: 95 °C 3 minutos, 30 X (95 °C 1 minuto, 57 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto), 72 °C 5 minutos, T final 4 °C. Los productos de PCR fueron purificados con el kit "Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega). El material obtenido fue revisado por electroforesis en geles de agarosa y el tamaño de la banda esperada fue visualizado. Las bandas fueron extraídas con el kit "Zymoclean™ Gel DNA Recovery de la marca ZYMO RESEARCH" y finalmente el material purificado se comprobó por otra corrida de electroforesis en gel previo a la cuantificación por nanodrop para secuenciación (IBT-UNAM). Las secuencias reportadas fueron visualizadas usando BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5.0, y su análisis fue realizado en la base de datos del NCBI. Para ello, de las secuencias obtenidas de ambos grupos se seleccionó un segmento de aproximadamente 700pb de cada una de las muestras y de cada hebra (forward y reverse) para evitar en la medida de lo posible regiones sin secuencia definida o errores de secuenciación, las muestras fueron comparadas con la base de datos del NCBI para obtener el grado de parentesco y comprobar la identidad de la cepa usada en el estudio, en seguida se compararon las cepas entre sí: primero el grupo de secuencias de cepas que no se sometieron a desecación (control 1), después el grupo de células sometidas a desecación (control 2) y finalmente el grupo uno contra el grupo dos, con el fin de determinar si había cambios drásticos en las secuencias de bacterias que fueron sometidas a desecación con respecto a las células que no sufrieron estrés por desecación.

Análisis estadístico

Para las pruebas de estadísticas de t -student se utilizó el programa Sigma Plot 12.0.

RESULTADOS

Curva de crecimiento en UFC/ml de *Burkholderia tropica* MTo293

Las curvas de crecimiento de cuantificación rápida (absorbancia) y precisa (UFC/ml) muestran el momento en el cual se alcanza la fase estacionaria, permitiendo observar el momento en el cuál la bacteria ha alcanzado su máximo crecimiento y estabilidad de población, su división y muerte es proporcional con una carga bacteriana promedio de 1.06×10^7 , además de que los nutrientes disponibles en el medio se comienzan a agotar (Fig. 1).

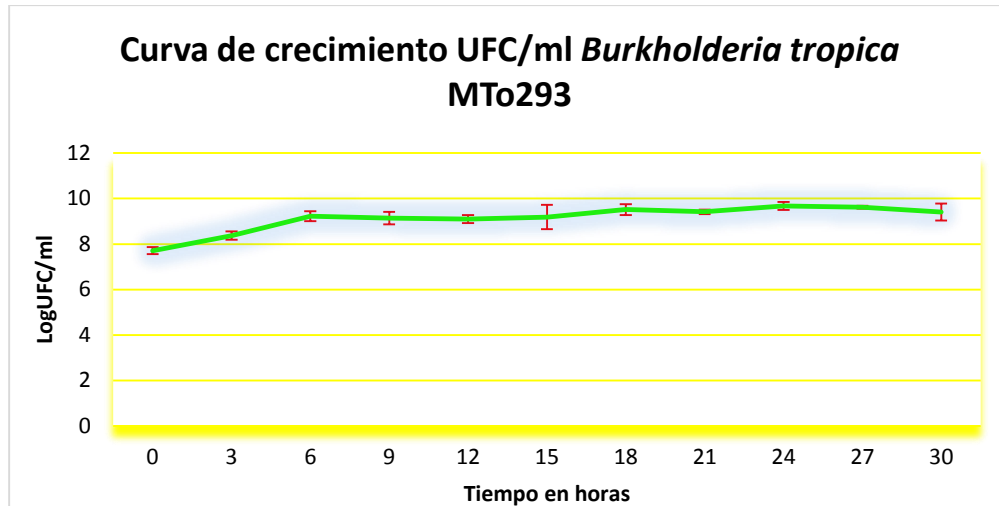


Fig. 1. Curva de crecimiento en Log UFC/ml, se observa que a las 6h la curva alcanza el máximo crecimiento.

En la Figura 2 se graficaron las densidades ópticas obtenidas cada tres horas durante 30 h, leídas a 620nm.

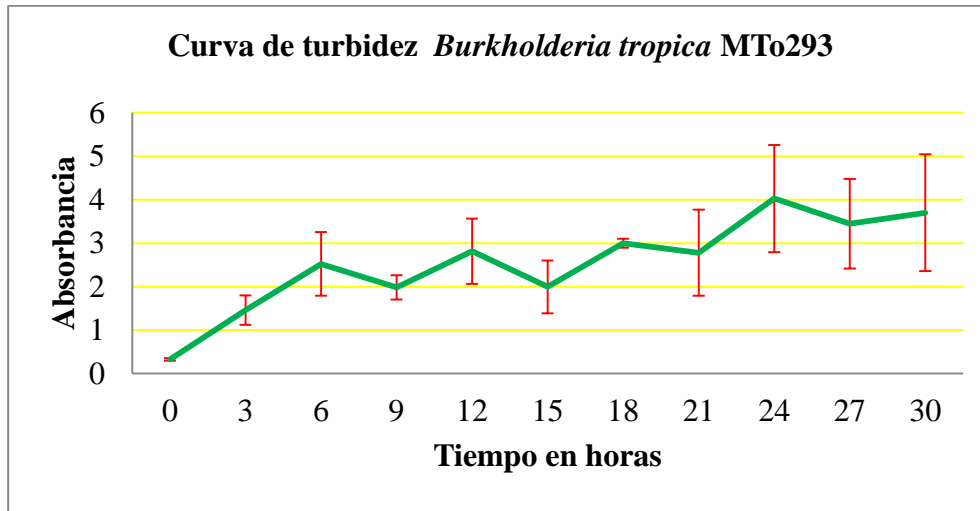


Fig. 2. Curva de turbidez de *B. tropica* MTo293 monitoreada cada tres horas por 30h donde a las 6h se observa el punto más alto a una densidad óptica promedio de 4.02 a 620nm.

Adhesión de *Burkholderia tropica* MTo293 a semillas de maíz amarillo.

En las pruebas de adhesión, se cuantificaron 1.35×10^9 UFC/ml de *B. tropica* MTo293/semilla en semillas inoculadas y sembradas en vermiculita y 3.68×10^8 UFC/ml adheridas a las semillas sembradas en suelo, reflejando la capacidad que tiene esta cepa para fijarse a las semillas de maíz, independientemente del ambiente donde sean sembradas las semillas (ver Fig. 3). Por otra parte, los grupos control: vermiculita y suelo (donde no se inoculó a *B. tropica* MTo293) no mostraron presencia de bacterias.

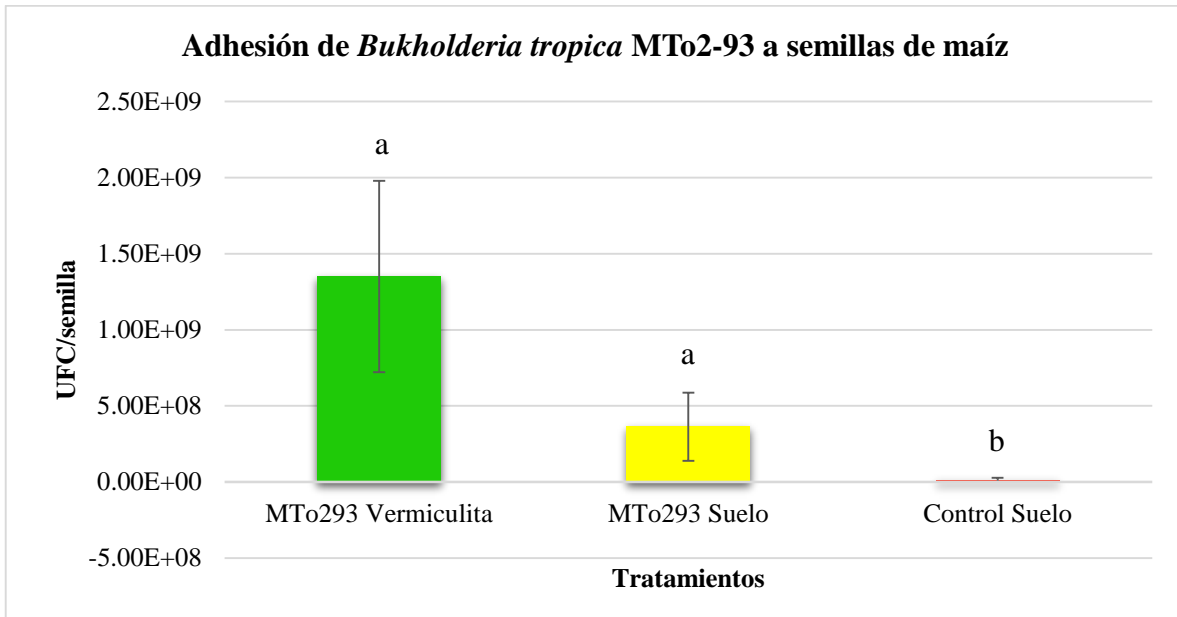


Fig. 3. Adhesión de *B. tropica* MTo293 a semillas de maíz amarillo en dos diferentes sustratos: vermiculita estéril, suelo y el grupo control (células embebidas en agua destilada estéril). Cada barra representa el promedio de 5 réplicas. Para corroborar si existe diferencia estadísticamente significativa se aplicó la prueba *t*-student ($P \leq 0.344$).

Colonización de *Burkholderia tropica* MTo293 en raíces de plantas de maíz amarillo.

Se detectó un promedio de 6×10^8 UFC/ml presentes en raíz de plántulas maíz amarillo a los 20 días posteriores a la siembra (dps), cultivadas en vermiculita estéril, siendo el tratamiento donde más se adhirieron las células a la planta, esto muestra la capacidad que tiene la bacteria modelo para colonizar raíces de maíz (ver Fig. 4). Las cuantificaciones de los grupos control no presentaron crecimiento alguno de bacterias.

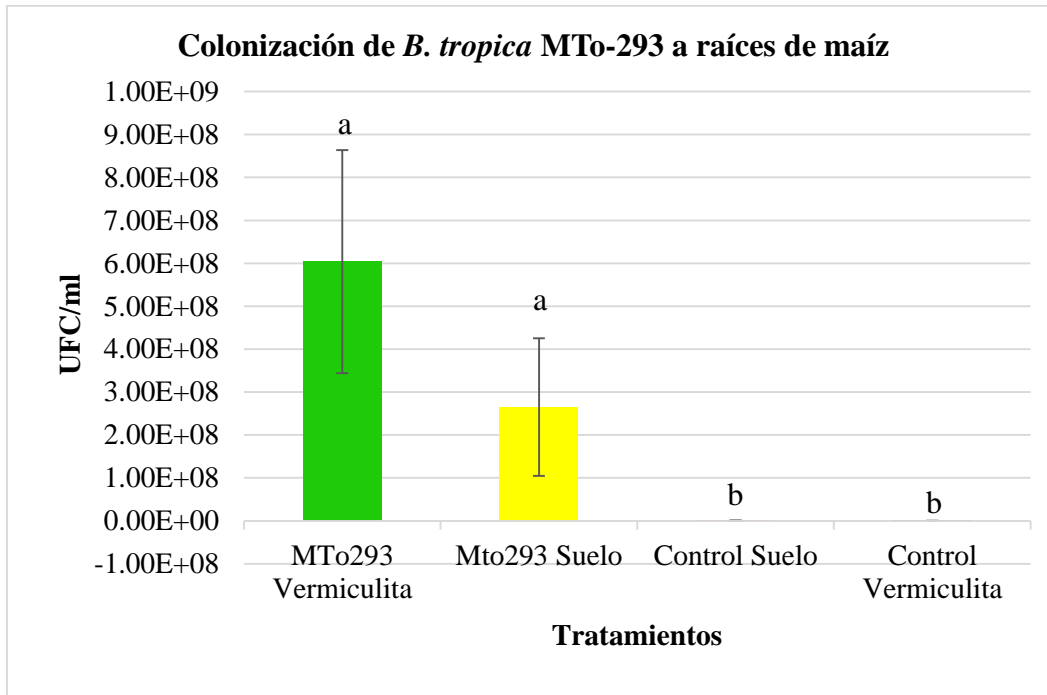


Fig. 4. Gráfica de colonización de *B. tropica* MTo293 a raíces de plantas de maíz amarillo, la columna verde muestra la capacidad que tiene MTo293 de colonizar raíces de plántulas de maíz amarillo en cultivo axénico, y en suelo en la columna amarilla.

Pérdida de Agua en Deseccación

A los tres días se observó que aún existía un poco de agua (Fig. 5). No obstante, a partir del tiempo 6 (T6) la diferencia de pesos con respecto al T0 se mantuvo constante, indicando que las células alcanzaron el equilibrio con el agua del medio ambiente, ya que dejaron de perder agua de su interior (Fig. 5).

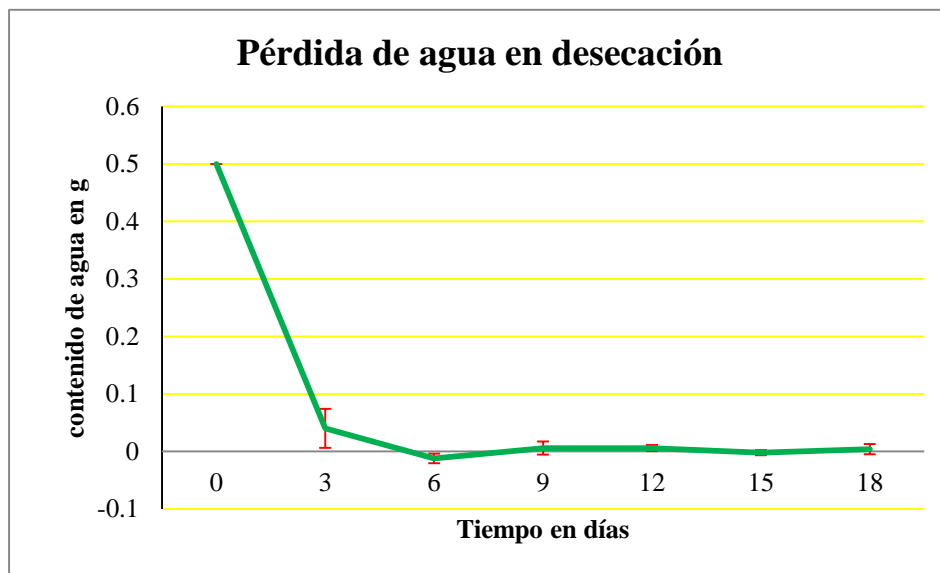


Fig. 5. Gráfica de pérdida de agua en gramos del T0-T18 (T=tiempo), se observa que a partir del día 6 las muestras dejan de perder agua, siendo el tiempo donde se considera desecación completa.

Determinación de resistencia a la desecación de *B. tropica* MTo293

La tasa de supervivencia bacteriana desciende a medida que aumenta el tiempo de desecación. Sin embargo, *B. tropica* MTo293 es capaz de resistir al estrés, observando células cultivables a los 18 días posteriores al inicio de la desecación, con una hidratación prolongada de 24h con una BSR 25.63 y no se observó crecimiento de la misma cepa con una hidratación corta (1h) (Ver Fig. 6).

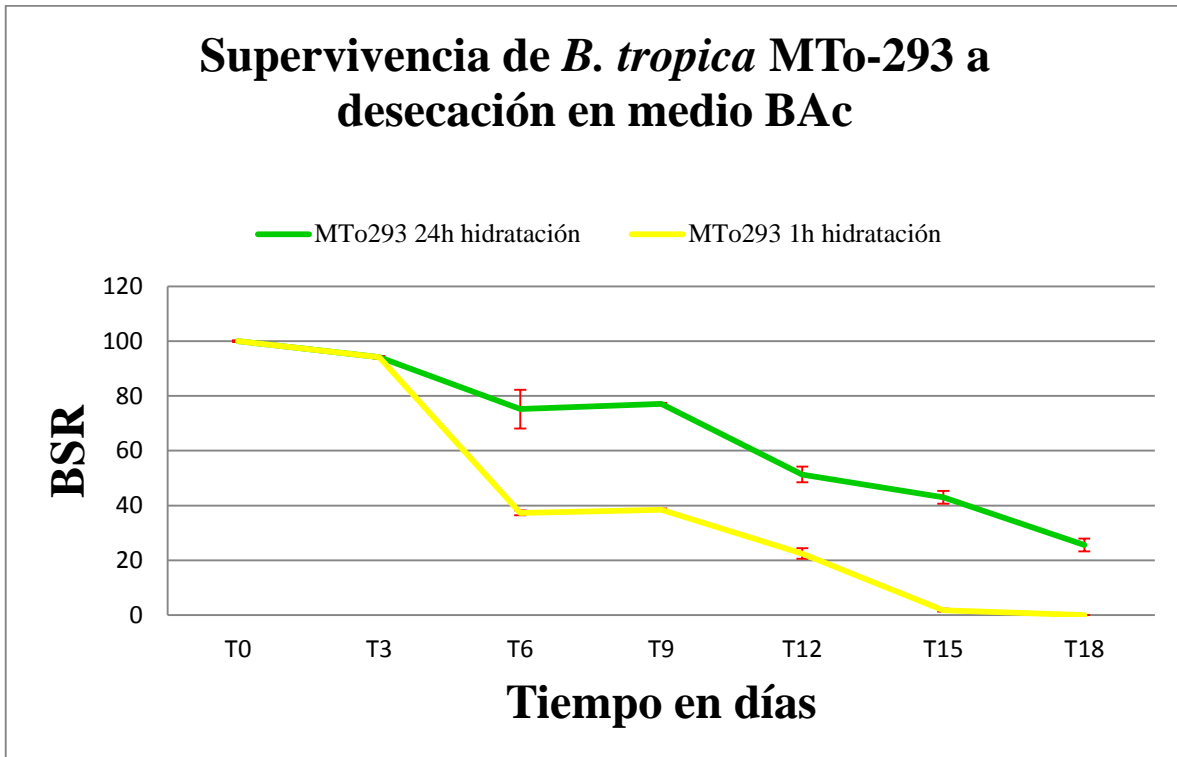


Fig. 6: Tasa de supervivencia bacteriana (BSR) de *B. tropica* MTo293.

Extracción de DNA de *B. tropica* MTo293 antes y después de la desecación

A los DNAs totales purificados de las muestras tanto del antes como del después de la desecación se les corrió en un gel de agarosa al 1% y posteriormente le tiñó con bromuro de Etidio para su visualización luz ultravioleta. En la Figura7 se observa la presencia de DNA en todas las muestras purificadas aún para el caso de las muestras de DNA obtenidas de células después de la desecación. Las bandas se observaron con una concentración menor a las de las muestras que no sufrieron desecación.

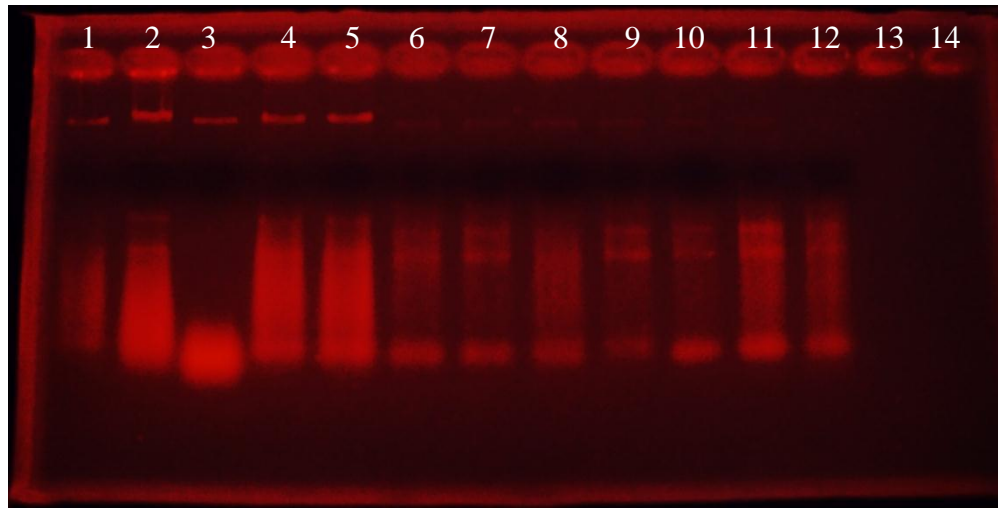


Fig. 7: DNA de *B. tropica*MTo293 pozos 1-4 antes de la desecación y 5-12 después de la desecación.

Amplificación del gen 16S DNAr por PCR de *B. tropica* MTo293

En la figura 8 se observa la presencia en gel de agarosa al 1% de las amplificaciones del gen 16S DNAr de las muestras (4 sin desecar y 8 después de la desecación) y su respectivo marcador de 100pb en el primer carril.

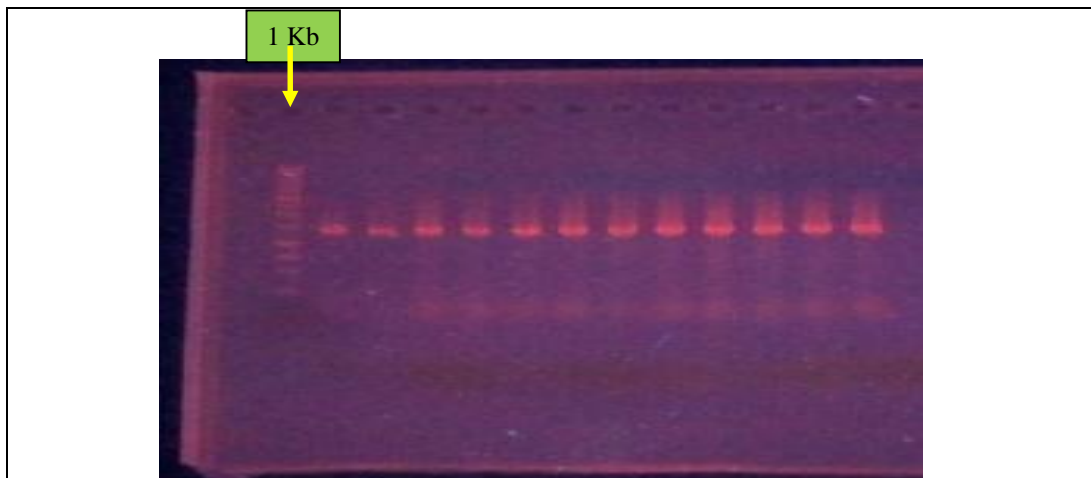


Fig. 8. Amplificación del gen 16S DNAr por PCR de *B. tropica* MTo293, en el carril 1 se observa el marcador, del 2-5 muestras del gen 16S DNAr sin someter a desecación y del 6-13 el gen 16S DNAr de muestras desecadas.

Comparación entre secuencias del gen 16S DNAr antes y después de la desecación

En la tabla 1 se presentan los porcentajes de identidad de secuencias del gen 16S DNAr de *B. tropica* MTo293 a partir de un segmento de 700pb y la diferencia en el porcentaje de identidad tanto del antes como del después de la desecación, donde se observa que la diferencia es mayor en las comparaciones del antes contra el después de la desecación además, en la figura 9 se remarca el sitio de modificación que persiste en todos los empalmes por pares de las secuencias, obtenidos del análisis bioinformático con Blast nucleotid (NCBI) de la confrontación de secuencias no desecadas contras las que sí sufrieron éste estrés. Sin embargo el análisis de alineamiento múltiple hecho en Clustal W reflejó lo opuesto, pues todas las secuencias (directas y reversas de ambos tratamientos) empalman correctamente con la secuencia reportada en el Gen Bank con número de clave AY128103 correspondiente a *B. tropica* MTo293, con lo cual se observa que no hay mutaciones puntuales ocasionadas por la desecación, significando que se mantiene íntegro el gen 16S DNAr (Fig. 10).

Porcentaje de identidad en empalmes de secuencias de gen 16S DNA ribosomal

| Forward | A1 | A2 | A3 | A4 | Forward | D1 | D2 | D3 | D4 | Forward | A1 | A2 | A3 | A4 |
|---------|------|------|------|------|---------|------|------|------|------|---------|------|-----|------|------|
| A1 | 100% | 89% | 100% | 100% | D1 | 100% | 92% | 99% | 90% | D1 | 100% | 89% | 100% | 100% |
| A2 | 89% | 100% | 89% | 89% | D2 | 92% | 100% | 92% | 96% | D2 | 92% | 96% | 92% | 92% |
| A3 | 100% | 89% | 100% | 100% | D3 | 99% | 92% | 100% | 90% | D3 | 99% | 89% | 99% | 99% |
| A4 | 100% | 89% | 100% | 100% | D4 | 90% | 96% | 90% | 100% | D4 | 90% | 95% | 90% | 90% |

| Reverse | A1 | A2 | A3 | A4 | Reverse | D1 | D2 | D3 | D4 | Reverse | A1 | A2 | A3 | A4 |
|---------|------|------|------|------|---------|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|-----|-----|
| A1 | 100% | 100% | 100% | 100% | D1 | 99% | 99% | 99% | 99% | D1 | 99% | 99% | 99% | 99% |
| A2 | 100% | 100% | 100% | 100% | D2 | 99% | 99% | 99% | 99% | D2 | 99% | 99% | 99% | 99% |
| A3 | 100% | 100% | 100% | 100% | D3 | 99% | 99% | 99% | 99% | D3 | 99% | 99% | 99% | 99% |
| A4 | 100% | 100% | 100% | 100% | D4 | 99% | 99% | 99% | 99% | D4 | 99% | 99% | 99% | 99% |

Tabla 1: Porcentajes de identidad de empalmes de secuencias donde: A: Antes de la desecación, D: Después de la desecación, 1-4: número de muestra (4 réplicas para antes y después de la desecación respectivamente), Forwar y reverso: el sentido de la hebra y %: el grado de identidad obtenido en cada empalme.

Rojas, 2011; Muñoz-Arenas, 2011). Por esta razón se consideró importante evaluar el tiempo requerido para que *B. tropica* MTo293 llegara a la fase estacionaria.

La curva de turbidez es una metodología de cuantificación rápida de bacterias sin embargo; es un tanto imprecisa aunque. Al elaborarse con una curva de crecimiento en UFC/ml se puede relacionar la densidad óptica (D. O.) con las UFC/ml de la cepa. La fase estacionaria se alcanzó a las 24 h y su correspondiente en la curva de turbidez fue una D. O. de 4 y se le puede utilizar como parámetro práctico para conocer el estado de crecimiento de esta bacteria.

En promedio la cantidad total de UFC/ml de *B. tropica* MTo293 adheridas a semillas axénica de maíz fue de 1.35×10^9 UFC/ml valor muy cercano a lo reportado por Guo y cols. (2011) además de haberse cuantificado un promedio de 3.68×10^8 UFC/ml colonizando a las semillas sembradas en suelo reflejando ser una buena colonizadora aún en suelo no estéril.

Al obtener 6×10^8 UFC/ml colonizando a la raíz se refleja la buena capacidad de ésta cepa en su asociación con plantas de: maíz (Estrada de los Santos *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2004; Suárez-Moreno *et al.*, 2012), *Sedum alfredii* (Guo *et al.*, 2011), mimosas (Bournaud *et al.*, 2013), caña de azúcar (Paungfoo-Lonhienne *et al.*, 2013), jitomate (Martínez-Aguilar *et al.*, 2013) y lupin (Kost *et al.*, 2014).

En las pruebas de desecación se determinó que *B. tropica* MTo293 entra a estado de desecación a partir del día 6 cuando deja de perder agua de su interior encontrando su equilibrio con el agua del medio ambiente (Alpert, 2005) además de ser capaz de resistir aún después de 18 días de éste estrés, con una BSR de 25.63 en contraste a la sensibilidad reportada para *Pseudomonas putida* KT2440 que no crece a los 12 días posteriores a la desecación sin rehidratar (Pazos Rojas, 2011) o que es moderadamente resistente a la desecación si se compara con *Sinorhizobium meliloti* que resiste a la desecación después de dos meses (Humman *et al.*, 2009). Conocer que es viable aún después de ser sometida a estrés por

deseccación durante 18 días, demuestra su potencial agrobiotecnológico en posteriores formulaciones de inoculantes microbianos que promueven el crecimiento de plantas.

Se observó que el gen 16S DNAr mantiene la integridad de sus secuencias sin presentar mutaciones puntuales sin embargo no se pueden descartar otro tipo de mutaciones o daños de reparación ocasionados por la desecación como lo reporta Potts (1994), este resultado es relevante ya que al no haber cambios en el DNA se predice que la actividad metabólica de la bacteria aunada a sus mecanismos de promoción del crecimiento se mantendrán aún bajo condiciones de desecación, garantizando el funcionamiento óptimo de la bacteria y por ende su beneficio en la planta.

CONCLUSIONES

Burkholderia tropica MTo293 es una bacteria que sí resiste a la desecación pudiendo ser recuperada después de 18 días de ser sometida a éste estrés, manteniendo además íntegro su gen 16S DNAr, aunado a que es con buena tasa de adhesión a semillas de maíz y sumándole su capacidad de colonizar la rizósfera de plantas de éste mismo grano. Por lo tanto es un modelo experimental con potencial para estudiar su posible utilización en formulaciones de bio-inoculantes de uso agrícola para zonas de lluvias poco frecuentes, áridas y de altas temperaturas pues, garantizando que la identidad de la bacteria codificada en su genoma no se modifica como consecuencia del estrés que le ocasiona la desecación se infiere que su fisiología no se verá afectada.

PERSPECTIVAS

Se recomienda hacer análisis más finos de cada una de las posibles modificaciones existentes en cada secuencia sometida a estrés por desecación para descartar del todo que sean mutaciones o daños a nivel en el gen 16S DNA.

BIBLIOGRAFÍA

Amann, R. I., Ludwig W. and Schleifer K.H., (1995). Phylogenetic identification and *In Situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.

Alizadeh O. y Parsaeimehr A., (2011). The influence of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on the reduction of abiotic stresses in crops. *ELBA BIOFLUX*, 3, 93-99.

Alpert P., (2005). The Limits and Frontiers to Desiccation-Tolerant Life. *INTEGR. COMP. BIOL.*, 45:685–695.

Baker G C., Smith J J. y Cowan D A., (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 55. Issue 3 pp: 541-555

Baset Mia M.A, Shamsuddin Z.H., Wahab Z. y Marziah M., (2010). Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth and nitrogen incorporation of tissue-cultured *Musa* plantlets under nitrogen-free hydroponics condition. *AJCS*, 4(2), 85-90.

Bautista-Calles J, García-Espinosa R, Pérez-Moreno J, Zavaleta-Mejía E, Montes-Belmont R y Rerrera-Cerrato R., (2008). Inducción de supresividad a fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Interciencia*. Vol. 33 N° 2.

Beukes, C. W., Venter, S. N., Law, I. J. Law, Phalane, F. L., Steenkamp, E. T.(2013). South African Papilionoid Legumes Are Nodulated by Diverse Burkholderiawith Unique Nodulation and Nitrogen-Fixation Loci. *PLOS One* Volume 8 | Issue 7 | e68406

Xicale-Nava F., (2015).

Berendsen R L., Pieterse C M J. y Bakker P A H M., (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, 17, 478-486.

Bournaud C., Miana de Faria S., Ferreira dos Santos J M., Tisseyre P., Silva M., Chaintreuil C., Gross E. James E K., Prin Y. y Moulin L., (2013). *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). *PLOS ONE* 8(5): e63478.

Brämer, C. O., Vandamme, P., da Silva, L. F., Gomez, J. G. C.&Steinbüchel, A. (2001). *Burkholderiasacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J SystEvolMicrobiol* 51, 1709–1713.

Caballero-Mellado, J. Martínez-Aguilar, L. Paredes-Valdez, G. Estrada-de los Santos, P., (2004). *Burkholderia unamae* sp. Nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54, pp. 1165–1172.

Caballero-Mellano J., (2006). Microbiología Agrícola e Interacciones Microbianas con plantas. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 48 (2): 154-161.

Chiarini, L., Bevivino, A., Dalmastrì, C., Tabacchioni, S., Visca, P. (2006). *Burkholderiacepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. *TRENDS Microbiol* 14: 277–286.

Coenye T y Vandamme P., (2003). Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol.* 5, 719-729.

Xicale-Nava F., (2015).

Compant S., Nowak J., Coenye T., Clément C. y Ait Barka E., (2008). Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. FEMS Microbiology Reviews 32: 607–626.

Curtis T. P., Sloan W. T. y Scannell J. W., (2002). Estimating prokaryotic diversity and limits. PNAS. 99:10494-10499.

Dose K., Bieger-Dose A., Labusch M., y Gill, M. (1992). Survival in extreme dryness and ADN-single-strand breaks. Adv Space Res 12: 221-229

Estrada-de los Santos P., Bustillos-Cristales R. y Caballero-Mellado J., (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. Appl Environ Microbiol 67:2790-2798.

Ferreyra, M, M., Schvab M del C., Davies C V., Gerard L, M y Solda C A., (2014). Obtención de vinagre de naranja en proceso semi-continuo, a escala laboratorio. Ciencia, Docencia y Tecnología, 25 (49). (154-165).

Glick B R., Patten C L., Holguin G., Penrose D M., (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. London, UK: Imperial College Press. pp. 267.

Guo, J., Tang, S., Ju, X., Ding, Y. , Liao, S., Song, N. (2011). Effects of inoculation of a plant growth promoting rhizobacterium *Burkholderia* sp. D54 on plant growth and

Xicale-Nava F., (2015).

metal uptake by a hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance grown on multiple metal contaminated soil. *World J Microbiol Biotechnol* 27:2835–2844

Gyaneshwar P., Hirsch A M., Chen W M., Elliott G N., Bontemps C., Gross E., Reis Junior FB., Sprent JI, Young JPW, James E K., (2011) Legume nodulating β -proteobacteria: diversity, host range and future prospects. *Mol Plant-Microbe Int* 24:1276–1288

Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J. (2001). How optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 44 (2): 121-129.

Hughes J B., Hellman J J., Ricketts T H. y Bohannan B . M., (2001). Counting the uncountable: Statistical Approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:4399-4406.

Humann, J. L., Hope, T., Ziemkiewicz, Yugel, S. N., and M. L. Kahn (2009). Regulatory and DNA Repair Genes Contribute to the Desiccation Resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 446–453 Vol. 75, No. 2.

Kennedy A C., (2005). Rhizosphere, in: *Principles and Applications of Soil Microbiology*, D.M., Sylvia, J.J., Fuhrmann, P.G., Hartel, and D.A., Zuberer, eds., 2nd ed. Pearson, Prentice Hall, New Jersey. 242-262.

Xicale-Nava F., (2015).

Kloepper J W., Lifshitz R., Zablotowicz R M., (1989). Free living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol 7: 39–44.

Leslie S B.; Israeli E.; Lighthart B., Crowe J H. y Crowe L M., (1995). Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. Appl Environ Microbiol.;61:3592-3597.

Martinez Aguilar, L., Salazar-Salazar, C., Díaz Méndez, R., Caballero-Mellado, J., Hirsch, A. M., Vásquez-Murrieta, M. S., Estrada-de los Santos, P.,(2013). *Burkholderia caballeronis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum*) with the ability to effectively nodulate *Phaseolus vulgaris*. Antonie van Leeuwenhoek 104:1063–1071.

Morales-Garcia E., Herrera C. y Muñoz Rojas, J. (2007). Cloranfenicol un antibiotico clásico como alternative en el presente. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas 38:58-69.

Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Bustillos-Cristales, M. R., Krell, T., Muñoz-Rojas, J. (2010). Método rápido para la obtención de maíz axénico a partir de semillas. *Elementos*. 80 (17): 35-38.

Muñoz-Rojas, J.,† Bernal, P.,† Duque, E., Godoy, P., Segura, A. and Ramos, J. L. (2006). Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. Applied and Environmental Microbiology, p. 472–477 Vol. 72, No. 1.

Murashigue T., y Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473.

Murray P. R., Rosenthal K. S. y Pfaller M. A., (2009). MICROBIOLOGÍA MÉDICA. Barcelona España: Elsevier p. 3

Xicale-Nava F., (2015).

Muñoz-Rojas J. y Caballero-Mellado J., (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microb. Ecol.* 46:454-464.

Paganin, P., Tabacchioni, S. Chiarini, L. (2011). Pathogenicity and biotechnological applications of the genus *Burkholderia*. *Cent. Eur. J. Biol.* 6(6) 997-1005.

Palleroni N J. (2005). The genus *Burkholderia*. In: Brenner D J., Krieg N R., Garrity G M. y Staley J T (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology: the Proteobacteria; the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon proteobacteria*, vol 2. Springer, East Lansing, pp 575-600.

Parra Huertas R A., (2010). Bacterias Ácido Lácticas: Papel Funcional en los Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Payne GW, Vandamme P, Morgan SH, Lipuma JJ, Coenye T, et al. (2005) Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. *J. Clin. Microbiol.* 71: 3917–3927.

Pazos Rojas, L. A. (2011). Estudios biológicos sobre la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440 a la desecación. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad de Puebla.

Perín, L, Martínez-Aguilar, L, Paredes-Valdez, G, Baldani, J.I., Estrada-de los Santos, P, et al. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1931–1937.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Sa, T. (2007) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals is widespread in gram-negative *Methylobacterium*. *J Microbiol Biotech.* ;17:226–233.

Xicale-Nava F., (2015).

Porcel, R., Zamarreño, Á.M. y Aroca, R., (2014). Involvement of plant endogenous ABA in *Bacillus megaterium* PGPR activity in tomato plants. *BMC Plant Biology*, 14(36), 1-26.

Potts Malcom (1994). Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *American Society for Microbiology*. Vol. 58, No. 4. p. 755-805.

Potts M., Stephen M., Slaughter., Hunneke F U., Garst J M. y Helm R F (2005). Desiccation Tolerance of Prokaryotes: Application of Principles to Human Cells. *Integrative and Comparative Biology* 45(5):800-809

Puntus, F., Filonov, A. E., Akhmetov, L. I. Karpov, A.V. y Boronin, A.M. (2008). Phenanthrene Degradation by Bacteria of the Genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in Model Soil Systems. *Microbiology*, Vol. 77, No. 1, pp. 7–15.

Reis V M., Estrada-de los Santos P., Tenorio-Salgado S., Vogel J., Stoffels M., Guyon S., Mavingui P., Baldani V L D., Schmid M., Baldani J I., Balandreau J., Hartmann A. y Caballero-Mellado J., (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2155–2162

Sánchez López D B., Gómez Vargas R M., Garrido Rubiano M F. y Bonilla Buitrago R R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(7), 1401-1415.65-71.

Sarabia Ochoa M., Madrigal Pedraza R., Martínez Trujillo M. y Carreón Abud, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*, 12(1), 65-71.

Xicale-Nava F., (2015).

Scott A.C. (1989). Historia temprana de la vida en la tierra firme. En Weber, R. Editor (Morfología, Reproducción y Evolución de las Arquegoniadas. Una antología.). UNAM. México, D. F.

Serrato R V., Sasaki G L., Cruz L M., Pedrosa P J L. y Lacomini, A., (2006). Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Canada Journal Microbiology*. 52:489-493.

Sessitsch J., Howieson X., Perret H., Antoun H. y Martinez-Romero E. (2002). Advances in *Rhizobium* Research. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21, Issue 4, 1 : 323-378.

Suárez-Moreno Z R., Caballero-Mellado J., Coutinho B G., Mendonça-Previato L., James E. K. y Venturi V. (2012). Common Features of Environmental and Potentially Beneficial Plant-Associated *Burkholderia* Microb Ecol 63:249–266. DOI 10.1007/s00248-011-9929-1

Tenorio-Salgado S., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Caballero-Mellado J. y Perez-Rueda E., (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, Vol. 4, pp. 236-243.

Trân Van V., Berge O., Ngô Kê S., Balandreau J. y Heulinn T., (2000). Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant Soil* 218, 273–284

Sevilla M., Meletzus D., Teixeira K., Lee S., Nutakki A., Baldani I. y Kennedy C (1997). Analysis of *nif* and regulatory genes in *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol Biochem*. 29:871–874.

Xicale-Nava F., (2015).



León, Gto. 17 de mayo de 2013

A quien corresponda:

Se hace constar que:

Fernando Xicale Nava

Asistió al XI Encuentro "Participación de la Mujer en la Ciencia" del día **14 al 16 de mayo del año en curso.**

Sin otro particular, se extiende la presente para los fines que el(la) interesado(a) estime conveniente.

ATENTAMENTE:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Vázquez', with a horizontal line drawn through the bottom of the signature.

Dra. Gloria Verónica Vázquez García
POR EL COMITÉ ORGANIZADOR
encuentro2013@cio.mx