



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



ENSIFER ARIDI, UNA NUEVA ESPECIE TOLERANTE A LA
SALINIDAD Y A ALTAS TEMPERATURAS AISLADAS DE LA
LEGUMINOSA SILVESTRE *PHASEOLUS FILIFORMIS*: ESTUDIO
DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE HALOTOLERANCIA

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Presenta:

M. C. Guadalupe Rocha Bonilla

Director de tesis

D. C. José Antonio Munive Hernández

Co-director de tesis

D. C. Ricardo Carreño López

Puebla, Puebla.

Noviembre 2019

"... Yo vivo de preguntar, saber no puede ser un lujo..."

Silvio Rodríguez

Índice temático

Índice de figuras.....	vi
Índice de tablas	xi
Resumen	1
Abstract.....	3
Introducción.....	5
CAPÍTULO 1	8
1.1. Antecedentes	8
1.1.1. Antecedentes generales	8
1.1.2. Antecedentes directos	10
1.2. Justificación	12
1.3. Objetivo general.....	13
1.3.1. Objetivos particulares.....	13
CAPÍTULO 2.....	15
2.1. Leguminosas	15
2.1.1. Usos de las leguminosas.	16
2.2. <i>Phaseolus</i>	20
2.2.1. <i>Phaseolus vulgaris</i>	23
2.2.2. <i>Phaseolus filiformis</i>	25
2.3. Rizobia	27
2.3.1. <i>Ensifer</i>	28
2.3.2. <i>Ensifer aridi</i>	29
2.4. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	30
2.5. Interacción rizobia-leguminosa: la nodulación.....	33
2.6. Estrés salino y su efecto en suelos de cultivo	37
2.7. Análisis de secuencias multilocus en la taxonomía rizobial.....	41
CAPÍTULO 3.....	44
3.1. Metodología	44
3.1.2. Amplificación y análisis filogenético de los genes <i>nifH</i> y <i>nodC</i> (fragmentos).....	46
3.1.3. Rango de hospedero.....	47
3.1.4. Formación de la banca de mutantes por transposición de <i>Ensifer aridi</i> LEM451. .	53
3.1.5. Identificación y análisis de la región genómica interrumpida en las mutantes sensibles a sal.	62

3.1.6. Evaluación de la interacción de las mutantes (sensibles a salinidad) de <i>Ensifer aridi</i> LEM451, con plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	64
CAPÍTULO 4	69
4.1. Resultados y discusión	69
4.1.1. Amplificación, concatenación y análisis de secuencias multilocus (MLSA) de los genes <i>16SsRNA</i> , <i>atpD</i> , <i>dnaK</i> , <i>glnA</i> , <i>gyrB</i> , <i>recA</i> , <i>rpoB</i> , <i>thrC</i> .	69
4.1.2. Amplificación y análisis filogenético de los genes <i>nodC</i> (N-acetil-glucosaminil-transferasa) y <i>nifH</i> (dinitrogenasa reductasa).	75
4.1.3. Rango de hospedero.	79
4.1.4. Antibióticos, fuentes de carbono y medios.	80
4.1.5. Conjugación biparental y tasa de mutación.	85
4.1.6. Construcción de una mutateca (por transposición insercional) de la cepa <i>Ensifer aridi</i> LEM451.	85
4.1.7. Prueba de tolerancia a la salinidad de las mutantes.	86
4.1.8. Amplificación del gen gentamicina 3-N-acetiltransferasa (<i>accC1</i>) en las cepas mutantes.	93
4.1.9. Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> y ARDRA y amplificación del gen <i>rpoB</i> y RFLP.	95
4.1.10. Análisis bioinformático e identificación de la región interrumpida por el transposón en el genoma de las mutantes sensibles a sal.	97
4.1.11. Germinación de variedades de frijol bajo estrés salino.	101
4.1.12. Interacción de las mutantes de <i>Ensifer aridi</i> LEM451 sensibles a sal con plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> , en condiciones de salinidad.	111
Capítulo 5	117
5.1. Conclusiones	117
Referencias bibliográficas	119
Anexos	135
Anexo 1	
Medios de cultivo.	135
Anexo 2	
Números de acceso y cepas utilizadas para el análisis filogenético de los fragmentos de los genes <i>nodC</i> y <i>nifH</i> .	139
Anexo 3	
Secuencia completa del gen gentamicina 3-N-acetyltransferasa (<i>accC1</i>).	144
Amplificación del cassette de gentamicina en diferentes transconjugantes.	144

Anexo 4

Predicción de promotores.	145
---------------------------------------	------------

Anexo 5

Secuencia del fragmento de 5056 pb del operón del transportador ABC de <i>Ensifer aridi</i> LEM451.....	146
--	------------

Anexo 6

Alineamiento del fragmento amplificado de <i>E. aridi</i> LEM451.....	148
--	------------

Índice de figuras

Figura 1. Esquema donde se muestran algunos de los efectos producidos por la salinidad en plantas y simbiosis (Recuperado de: Bruning y Rozema, 2013).	6
Figura 2. Tipos de inflorescencias que pueden presentarse en algunas leguminosas. (Recuperado de: https://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/inflorescencia_L.htm).	16
Figura 3. Leguminosas con importancia alimenticia (Recuperado de: https://www.muyinteresante.es/salud/sexualidad/articulo/el-regaliz-puede-reducir-la-fertilidad-731479203364 , http://hablemosdealimentos.com/c-legumbres/el-cacahuete/ , https://www.instazu.com/tag/Jinicuil , https://ecocosas.com/plantas-medicinales/algarroba-propiedades/ , http://recetariomundial.blogspot.com/2011/03/guandules-con-coco.html , https://www.mexicodesconocido.com.mx/arbol-colorin.html , https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-tamarindo-en-mexico-186350).	17
Figura 4. Algunas leguminosas forrajeras (Recuperado de: http://pza.sanbi.org/clitoria-ternatea-var-ternatea , https://tuequus.com/es/equinopedia/alfalfa).	18
Figura 5. Ilustración de <i>Phaseolus vulgaris</i> (Recuperado de: https://www.gettyimages.es/ilustraciones/frijol-colorado?sort=mostpopular&mediatype=illustration&phrase=frijol%20colorado&license=rf,rm&page=1&recency=anydate&suppressfamilycorrection=true).	24
Figura 6. <i>Phaseolus filiformis</i> (Recuperado de: http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=1623).	25
Figura 7. Ilustración de <i>Phaseolus filiformis</i> (Delgado-Salinas et al., 2006).	26
Figura 8. Vainas de <i>Senegalia</i> (A), <i>Vachellia</i> (B), y <i>Prosopis</i> (C). (Recuperado de: https://www.namibian.com.na/157118/archive-read/Meet-the-trees-of-Namibia--Acacia-Senegalia-Vachellia-Why-the-name-change).	30
Figura 9. Algunos de los flavonoides producidos por leguminosas. Arriba, izquierda, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona; abajo, izquierda, 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona (inductores); derecha, 5,7,4'-trihidroxisoflavona (inhibidor).	34
Figura 10. Inducción de la deformación de los pelos radiculares (Brewin, 2004).	35
Figura 11. Esquema de los eventos tempranos del proceso de nodulación de leguminosas (adaptado de Pajuelo et al., 2011).	36
Figura 12. Modelos de endocitosis y desarrollo de simbiosomas (adaptado de Brewin, 2004).	37
Figura 13. Clasificación de los suelos salinos según la NOM-021-RECNAT-SEMARNAT-2000 (Recuperado de: http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf).	41
Figura 14. Semillas de <i>Erythina americana</i> (Ruiz et al., 2012).	48
Figura 15. Flores y semillas de <i>Mimosa pudica</i> . (Recuperado de: http://www.semillasorganicas.cl/producto/semillas-de-mimosa-pudica/).	49
Figura 16. Semillas de <i>Medicago sativa</i> . (Recuperado de: https://es.123rf.com/photo_82315949_semillas-de-alfalfa-en-el-cuenco-de-cer%C3%A1mica-blanco-aislado-en-madera-blanca-pintada-desde-arriba-semi.html).	49
Figura 17. Planta de <i>Lupinus gredensis</i> . (Recuperado de: https://www.asturnatura.com/especie/lupinus-gredensis.html).	50
Figura 18. <i>Phaseolus vulgaris</i> variedad vaquita. (Recuperado de: https://gourmetdemexico.com.mx/comida-y-cultura/5-tipos-de-frijoles-mexicanos/).	50

Figura 19. Phaseolus vulgaris variedad alubia. (Recuperado de: http://www.gastroteca.cat/es/ficha-productos/alubia-del-ganxet-dop/).	51
Figura 20. Semillas de Cicer arietinum. (Recuperado de: https://en.wikipedia.org/wiki/Chickpea).	51
Figura 21. Semillas de Lens culinaris. (Recuperado de: https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/lens-culinaris).	52
Figura 22. Replicador de 96 dientes (Recuperado de: https://www.boekelsci.com/microplate-replicators.html).	57
Figura 23. Diagrama representativo de distribución de las mutantes con la técnica drop plate (Elaboración propia).	58
Figura 24. Fundamento de la AP-PCR. (Adaptado de Das et al., 2005).	62
Figura 25. Ensayo de germinación en curso.	66
Figura 26. Visualización de los fragmentos de los genes atpD (a) y dnaK (b).	69
Figura 27. Visualización de los fragmentos de los genes glnII (a) y gyrB (b).	69
Figura 28. Visualización de los fragmentos de los genes recA (a) y rpoB (b).	70
Figura 29. Visualización de los fragmentos de los genes 16SsRNA (a) y thrC (b).	70
Figura 30. Visualización de los fragmentos del gen glnA.	70
Figura 31. Árbol filogenético concatenado generado mediante el algoritmo Maximum likelihood, basado en las secuencias parciales de los genes 16SsRNA, atpD, dnaK, glnA, gyrB, recA, rpoB, thrC (5326 nucleótidos). La significancia de cada rama se muestra por valores resultantes de un bootstrap de 1500 (sólo se muestran valores mayores al 70%). Barra de escala indica 5% de sustitución por sitio.	71
Figura 32. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood del fragmento del gen 16SsRNA, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de Ensifer aisladas de nódulos de Phaseolus filiformis (en negritas). El análisis se basó en la alineación de 1229 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 5% de sustitución por sitio.	72
Figura 33. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood de los fragmentos de los genes atpD-recA-glnII, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de Ensifer aisladas de nódulos de Phaseolus filiformis (en negritas) y las cepas de referencia. El análisis se basó en la alineación de 1245 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 5% de sustitución por sitio.	73
Figura 34. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood de los fragmentos de los genes atpD-glnII-recA-gyrB-rpoB-thrC, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de Ensifer aisladas de nódulos de Phaseolus filiformis (en negritas) y las cepas de referencia. El análisis se basó en la alineación de 3213 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 2% de sustitución por sitio.	74
Figura 35. Fotografía que muestra algunos de los productos de la amplificación y purificación de los fragmentos de los genes nodC (derecha) y nifH (izquierda).	75
Figura 36. Cromatograma del fragmento de nodC de la cepa Ensifer aridi LEM453 (secuencia reverse).	76
Figura 37. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo Maximum likelihood, basado en las secuencias parciales del gen nodC. Muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de Ensifer aridi aisladas de Phaseolus filiformis en Baja California sur (recuadro en negritas) y otras cepas seleccionadas de la base de datos del NCBI. El análisis se basó en el alineamiento de 722	

nucleótidos. En las bases de las ramas se muestran los valores de bootstrap (solo se muestran los valores mayores de 50%), el cual se realizó con un valor de 500 réplicas.....	77
Figura 38. Gráfica en la que se observa la cantidad de nódulos producidos por las cepas de <i>Ensifer aridi</i> LEM en diferentes leguminosas probadas.....	79
Figura 39. Placas Petri con diferentes medios de cultivo probados para seleccionar el medio más conveniente para la selección de las mutantes.....	83
Figura 40. Mutantes de interés seleccionadas en una placa Petri con agar TYRF-Gm-Km.....	84
Figura 41. Siembra de mutantes en medio de selección TYRF-Gm-Km (crecen) (A) y de contraselección TY-Ap (no crecen) (B).	85
Figura 42. Una de las cajas multipozos en las que se encuentra resguardada la mutateca.	86
Figura 43. Imagen que muestra el crecimiento de las muantes de la caja 044 en medio TY sin y con NaCl (0.2 y 0.3 mM).	87
Figura 44. Se muestra la placa 001 que fue improntada con mutantes de <i>Ensifer aridi</i> LEM451 en medio TY sin NaCl (izquierda) y con 300 mM de NaCl (derecha). El crecimiento registrado en las imágenes fue de 24 h.	87
Figura 45. Imágenes resultantes de la observación al estereoscopio (4X) de la mutante 038E6 en medio TY sin sal (izquierda) y en TY con 300 mM de NaCl (derecha). Nótese la reducción de la producción de exopolisacárido. El crecimiento registrado en las imágenes fue de 24 h.....	88
Figura 46. Placa de TY con 300 mM de NaCl (48-36 h) que muestra el crecimiento de algunas mutantes y a <i>Ensifer aridi</i> LEM451 (derecha). En los recuadros, se observó a detalle, el crecimiento de algunas de las mutantes señaladas con círculos azules en la placa de la derecha. Se observó que en realidad no hubo inhibición de crecimiento, solo se cambios en la producción de exopolisacárido.	88
Figura 47. Imagen que resalta el comportamiento de las mutantes 036-B12 y 038-E6 (en algunos de los diferentes medios de cultivo utilizados), sensibles a salinidad.	90
Figura 48. Placa con TYRF-Gm-Km y 400 mM de NaCl, durante la prueba de drop-plate, de las mutantes 003D11 y 003H1 (Cortesía D. C. Efrén Rodríguez-Ángel, 2016).	91
Figura 49. Gráfico que muestra la curva de crecimiento de <i>Ensifer aridi</i> LEM451.	91
Figura 50. Gráficas que muestran las curvas de crecimiento de <i>Ensifer aridi</i> LEM451 y las mutantes sensibles a NaCl seleccionadas de la prueba cualitativa, en condiciones sin y con salinidad (100, 200, 300, 300, 400 y 450 mM).	92
Figura 51. Fotografía de la amplificación del gen <i>accC1</i> en algunas mutantes sensibles a sal. Se utilizaron como control negativo a la cepa silvestre y como control positivo al plásmido pUT-miniTn5-Gm y a la cepa donadora del mismo. A la derecha se muestra en un diagrama, la región amplificada de dicho gen (491 pb).	94
Figura 52. Fotografía del gel agarosa que muestra los productos de la digestión del cassette de gentamicina por <i>HinfI</i>	95
Figura 53. Fotografía del gel de agarosa donde se revelaron los fragmentos productos de la digestión de los genes <i>16SrRNA</i> y <i>rpoB</i> con las enzimas <i>AluI</i> y <i>HinfI</i> de las cepas silvestre, <i>E. coli</i> S17.1 y mutantes sensibles a sal.	96
Figura 54. Fotografía de los productos de la AP-PCR de cepas mutantes sensibles a salinidad. Se empleó como control negativo, una muestra sin ADN molde y como control positivo a una cepa de <i>Klebsiella</i> sp. que, en los estudios de Rodríguez-Andrade (2014, datos no publicados); ya se había reportado como una cepa a la en la cual sí se había podido amplificar la misma región “O” que posee el transposón usado en nuestras mutantes. Agradecemos al M. C. Osvaldo Rodríguez Andrade por proporcionarnos dicha cepa.	97

Figura 55. Cromatograma resultante de la secuencia amplificada del producto de la AP-PCR de la mutante 003A6.	98
Figura 56. Diagrama de la región “O” del transposón que fue identificada en la secuencia de la mutante 003A6.	98
Figura 57. Imagen que muestra el resultado del análisis BLASTX de la secuencia obtenida a partir de AP-PCR de la mutante 003A6.	99
Figura 58. Imagen que muestra las puntuaciones de la homología de la secuencia obtenida a partir de AP-PCR de la mutante 003A6, por BLASTX.	99
Figura 59. Diagramas de las secuencias y sentido de los genes vecinos del gen transportador ABC en diferentes especies de Ensifer.	100
Figura 60. Gráfica que representa el porcentaje de germinación (con base en las diferentes concentraciones de NaCl).....	102
Figura 61. Gráfica que muestra el porcentaje de germinación de las semillas (con base en las variedades empleadas durante el ensayo).....	102
Figura 62. Gráfico que muestra la VMG de las semillas (con base en las diferentes concentraciones de NaCl empleadas).	103
Figura 63. Gráfica de la VMG de las variedades de Phaseolus vulgaris empleadas en el ensayo. .	104
Figura 64. Gráfico que representa el T (tiempo promedio de germinación).	105
Figura 65. Gráfica que muestra el tiempo promedio de germinación de las variedades de semillas utilizadas en el ensayo.....	105
Figura 66. Semillas de frijol variedad negro Guanajuato, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	106
Figura 67. Semillas de frijol variedad mantequilla, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	106
Figura 68. Semillas de frijol variedad vaquita, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	107
Figura 69. Semillas de frijol variedad Morelos (alubia), al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	107
Figura 70. Semillas de frijol variedad flor de mayo, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	108
Figura 71. Semillas de frijol variedad negro Guanajuato, después de 5 días de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.	108
Figura 72. Gráfica que muestra la longitud de tallos de los germinados, sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.	109
Figura 73. Gráfica que muestra la radícula de los germinados, sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.	110
Figura 74. Tubos de ensayo con las semillas germinadas (izquierda). Experimento en tubos mostrando plantas ya con hojas verdaderas (derecha).	111
Figura 75. Plantas sin estrés salino (izquierda) y con estrés salino (derecha).	111
Figura 76. Plantas sin estrés salino (izquierda) y con estrés salino (derecha), nótese la decoloración de las hojas en la planta que no fue inoculada, característico en plantas con carencia de nitrógeno.	112
Figura 77. Gráfica que muestra las longitudes de tallos y raíces de las plantas de Phaseolus vulgaris variedad negro Guanajuato.....	112
Figura 78. Raíz de planta inoculada con la cepa silvestre y sin condiciones de salinidad (izquierda). Raíces de plantas inoculadas con la mutante 003A6 y en condiciones de salinidad (derecha). Se	

observó que las raíces de las plantas sometidas a estrés salino, producen menos raíces secundarias, más cortas y también se deforman por engrosamiento de las mismas.	113
Figura 79. Gráfica que muestra los pesos frescos de tallos y raíces de las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> variedad negro Guanajuato.	113
Figura 80. Representación gráfica del número de nódulos producidos por las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> variedad negro Guanajuato.	114
Figura 81. Nódulos producidos por la mutante 003A6 sin estrés salino (A), nódulos producidos por la misma mutante con estrés salino (C). Nódulo generado por <i>Ensifer aridi</i> LEM451 sin estrés salino (B), nódulo producido por <i>Ensifer aridi</i> LEM451 con estrés salino (D), en éste último puede observarse la falta de coloración rojiza, lo que puede indicar la ineficiencia del nódulo.	115
Figura 82. Fotografía de un gel de agarosa, donde se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondiente al cassette de gentamicina incluido en el transposón del pUT-mini-Tn5-Gm.	144

Índice de tablas

Tabla 1. Usos medicinales de algunas leguminosas.....	19
Tabla 2. Usos comunes de algunas especies domesticadas de <i>Phaseolus</i> (adaptado de Perales y Aguirre, 2008. Recuperado de: https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I18_Biodivhum.pdf)	21
Tabla 4. Listado de las sales más comunes halladas en suelos salinos y su toxicidad.	40
Tabla 5. Clasificación de los suelos salinos con base en la concentración de NaCl.	41
Tabla 6. Primers y condiciones de temperatura para la PCR de los genes housekeeping. *Modificado de Gaunt et al., 2001.....	45
Tabla 7. Enzimas de restricción utilizadas para realizar el ARDRA y el RFLP y sus respectivos sitios de corte (elaboración propia).	61
Tabla 8. Secuencias de los primers utilizados en la AP-PCR de las mutantes sensibles a NaCl (elaboración propia).	63
Tabla 9. Tratamientos utilizados para el diseño experimental del ensayo invernadero en tubos (elaboración propia).	66
Tabla 10. CMI de la cepa <i>Ensifer aridi</i> LEM451, donde se representa el crecimiento bacteriano con ✓, y el no crecimiento con ✕, a 24 y 48 horas (elaboración propia).	81
Tabla 11. CMI de la cepa <i>E. coli</i> S17.1 pUT-mini-Tn5-Gm, donde se representa el crecimiento bacteriano con ✓, y el no crecimiento con ✕, a 24 y 48 horas (elaboración propia).	82
Tabla 12. Se indica el resultado del ensayo de las diferentes fuentes y medios de cultivos probados para la elección del medio de selección de las transconjugantes (elaboración propia).	83
Tabla 13. Mutantes de <i>Ensifer aridi</i> LEM451 que mostraron resistencia disminuida ante salinidad (hasta 300 mM), en la prueba cualitativa (elaboración propia).	89

***Ensifer aridi*, una nueva especie tolerante a la salinidad y a altas temperaturas aisladas de la leguminosa silvestre *Phaseolus filiformis*: Estudio de los determinantes genéticos de halotolerancia**

Resumen

La finalidad de este proyecto fue identificar y caracterizar algunas de las peculiaridades de cepas de la especie recientemente descrita *Ensifer aridi* (Le Quéré et al., 2017) la cual es fijadora de nitrógeno en leguminosas nativas de zonas áridas y desérticas. Una primera parte consistió de discernir la posición taxonómica de las cepas, pertenecientes a la recién descrita especie *Ensifer aridi*, para ello, se hizo la amplificación y el análisis de secuencias multilocus (MLSA) del concatenamiento de fragmentos de nueve diferentes marcadores taxonómicos moleculares (*16SsRNA*, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *thrC*); para profundizar en las características simbióticas de este grupo bacteriano, se propuso conocer el rango de hospedero de las cepas mexicanas de esta especie, así como identificar los genes N-acetilglucosaminiltransferasa (*nodC*) y nitrogenasa reductasa (*nifH*) presentes en ellas; la amplificación y el análisis filogenético de estos genes fortalecerían la información obtenida del ensayo de rango de hospedero que se realizó con estas cepas en interacción con plantas de *Erythrina americana*, *Mimosa púdica*, *Medicago sativa*, *Lupinus gredensis*, *Phaseolus vulgaris* (en las variedades de alubia y vaquita), *Cicer arietinum* y *Lens culinaris*. De este experimento, se determinó que de las semillas probadas, solo *Ensifer aridi* fue capaz de nodular a *Phaseolus vulgaris*. Mientras que el análisis filogenético, mostró vecindad con cepas que son simbioses de leguminosas pertenecientes a zonas áridas y semiáridas.

Al ser una de las características más notables de *Ensifer aridi*, el ser tolerante a la salinidad, la segunda parte del proyecto, se basó en identificar y caracterizar determinantes genéticos que están relacionados con su halotolerancia. La cepa LEM451, fue la elegida para este experimento, ya que en trabajos previos mostró tener la capacidad de interacción con plantas de frijol común bajo estrés salino, éstas permanecieron viables por más tiempo (Rocha, 2012; Medina, 2014). Para ello, primero se construyó una mutateca generada por transposición mediante el plásmido pUT-mini-Tn5-Gm. Se evaluó el crecimiento diferencial

de 6400 mutantes de la banca a distintas concentraciones de salinidad (100, 200, 300, 400 y 450 mM de NaCl) y se seleccionaron aquellas que mostraron reducción en su halotolerancia. Se identificaron y cuantificaron las mutantes de interés amplificando el cassette de resistencia y se buscó por AP-PCR el sitio de inserción del transposón. Se determinó en la mutante identificada como 003A6 que la región interrumpida por el transposón codifica presuntivamente para un de tipo ABC. Algunos autores han reportado que transportadores ABC, están relacionados directamente con la osmorregulación en bacterias, específicamente en rizobia (Das-Chatterjee et al., 2006; Dogra et al., 2013).

Posteriormente, se evaluó la resistencia a salinidad de *Phaseolus vulgaris*, para lo cual se hizo un ensayo de germinación de las variedades de frijol (negro Querétaro, flor de mayo, vaquita, alubia y mantequilla) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio (0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131, 166.6 y 200 mM). De los resultados obtenidos se concluyó que se emplearían semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato y con la concentración de 33 mM de NaCl.

Estudios *in planta*, indicaron que la mutante 003A6 no pierde su capacidad de nodular a *Phaseolus vulgaris*, Aunque si es menor dicha capacidad comparada a la cepa silvestre y además, los nódulos generados son amorfos en comparación con los que produce *Ensifer aridi* LEM 451 silvestre.

***Ensifer aridi*, a new specie tolerant to salinity and high temperatures of wild legume
Phaseolus filiformis: Study of genetic determinants of halotolerance**

Abstract

The purpose of this project was to identify and characterize some of the peculiarities of strains of the newly described *Ensifer aridi* (Le Quéré et al., 2017) nitrogen-fixing species in legumes native to arid and desert areas. A first part consisted of discerning and checking the taxonomic position of the strains, belonging to the newly described species *Ensifer aridi*, for this, the amplification and multilocus sequence analysis (MLSA) of the concatenation of fragments of nine different molecular taxonomic markers was made (*16SsRNA*, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* and *thrC*); to deepen more about the symbiotic characteristics of this bacterial group, it was proposed to know the host range of the Mexican strains of this species, as well as to identify the N-acetylglucosaminyltransferase (*nodC*) and nitrogenase reductase (*nifH*) genes present in them; the amplification and phylogenetic analysis of these genes would strengthen the information obtained from the host range test that was carried out with these strains in interaction with plants of *Erythrina americana*, *Mimosa púdica*, *Medicago sativa*, *Lupinus gredensis*, *Phaseolus vulgaris* (in bean varieties and vaquita), *Cicer arietinum* and *Lens culinaris*. From this experiment, it was determined that of the seeds tested, *Ensifer aridi* was only able to nodule *Phaseolus vulgaris*. While the phylogenetic analysis showed neighborhood with strains that are symbionts of legumes belonging to arid and semi-arid areas.

Being one of the most notable characteristics of *Ensifer aridi*, being tolerant to salinity, the second part of the project, was based on identifying and characterizing genetic determinants that are related to its halotolerance. The LEM451 strain was the one chosen for this experiment, since in previous work it showed the ability to interact with common bean plants under saline stress, these remained viable for a longer time (Rocha, 2012; Medina, 2014). To this end, a mutateca generated by transposition was first constructed using the plasmid pUT-mini-Tn5-Gm. This bank was constituted by 6400 mutants, which were evaluated under salinity conditions (100, 200, 300, 400 and 450 mM NaCl) and those that

showed reduction in their halotolerance were selected. To characterize them, a set of primers was designed to amplify the gentamicin resistance cassette included in said transposon. Once the mutants of interest were identified and quantified, the genomic region of the wild strain in which the transposon had been inserted was determined using the AP-PCR technique (Arbitrary Primers-Polymerase Chain Reaction). It was identified that one of the salt-sensitive mutants, referred to as 003A6, region interrupted by the transposon, allegedly encodes for an ABC type transporter within an operon. Some authors have reported that ABC transporters are directly related to osmoregulation in bacteria, specifically in rhizobia (Das-Chatterjee et al., 2006; Dogra et al., 2013).

Subsequently, the salinity resistance of *Phaseolus vulgaris* was evaluated, for which a germination test of the bean varieties (black Queretaro, May flower, vaquita, bean and butter) with different concentrations of sodium chloride (0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131, 166.6 and 200 mM). From the results obtained, it was concluded that *Phaseolus vulgaris* seeds variety Guanajuato black and with the concentration of 33 mM NaCl would be used.

In-plant studies indicated that the 003A6 mutant does not lose its ability to nodule *Phaseolus vulgaris*, although it does slightly less compared to the wild strain and also, the nodules generated are amorphous compared to those produced by wild *Ensifer aridi* LEM451.

Introducción

Las leguminosas son plantas cosmopolitas y ampliamente diversas tanto en sus características como en sus usos alrededor del mundo (para consumo humano y animal; materias primas como ceras, alcoholes, maderas, tintes, ornato, biorremediación de suelos (Llamas y Acedo, 2016). Actualmente, el cultivo de leguminosas, principalmente las de consumo humano, ha disminuido de manera considerable debido principalmente, a las técnicas agrícolas erróneas, así como también a la pobre calidad de los suelos.

La salinidad de los suelos es uno de los factores principales causantes de la degradación de los campos de cultivo y de la reducción de la producción agrícola en la actualidad. Esto se debe a que la presencia de altas concentraciones de sales en suelos conduce al estrés tanto a plantas como a los microorganismos que interactúan con ellas. Plantas de leguminosas sometidas a estrés salino, requieren que tanto éstas como los rizobia con las que se asocian, sean tolerantes a la salinidad. Este tipo de estrés inhibe el proceso de la nodulación, lo cual se ve reflejado en la disminución de la fijación de nitrógeno (Zahran, 1999), asimismo, favorece el desarrollo de nódulos ineficaces muy reducidos en leghemoglobina (Delgado et al., 1993). En general, la simbiosis rizobia-leguminosa, seguida de la leguminosa en contraparte con rizobia, es más sensible a este tipo de estrés. Algunos de los efectos que la salinidad ejerce sobre leguminosas y la interacción que estos establecen se mencionan en la tabla siguiente:

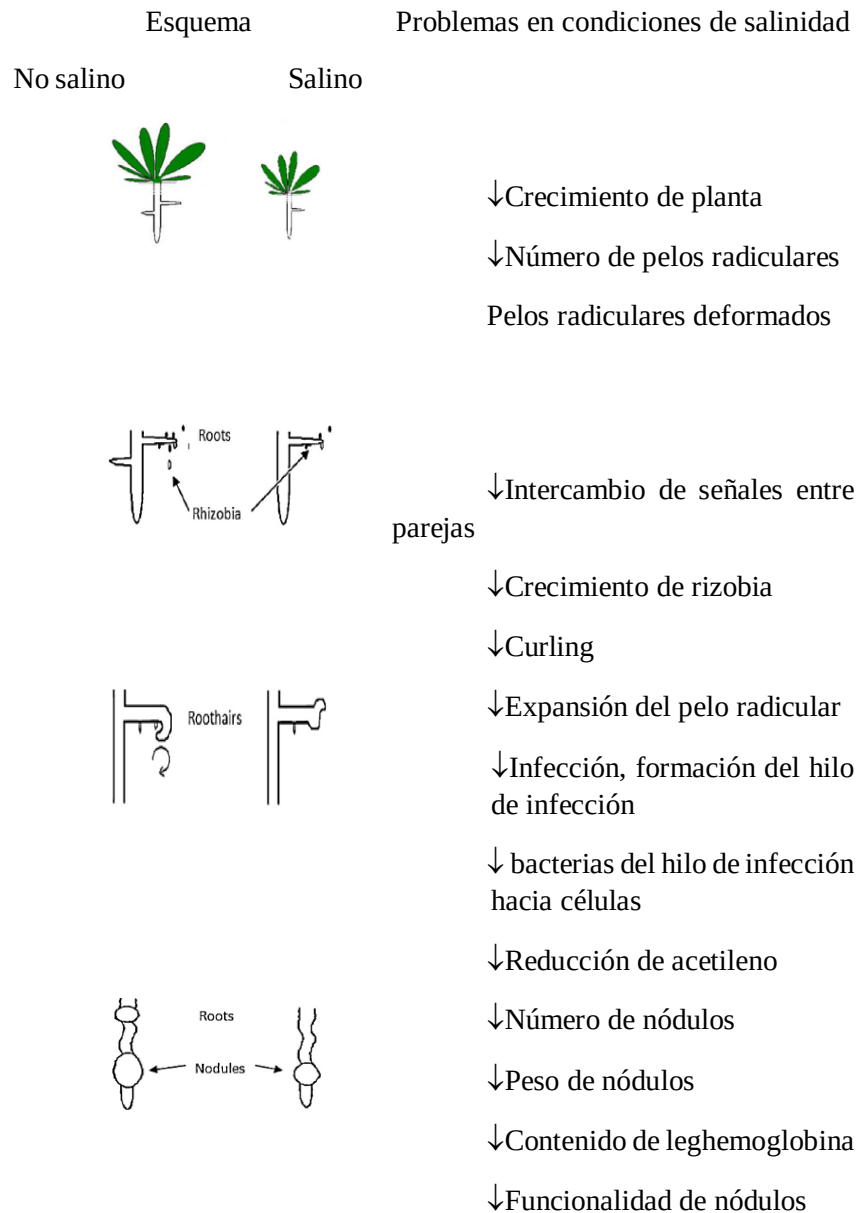


Figura 1. Esquema donde se muestran algunos de los efectos producidos por la salinidad en plantas y simbiosis (Recuperado de: Bruning y Rozema, 2013).

En el caso de rizobia, también se han reportado algunos efectos que las altas concentraciones de sal producen en estos microorganismos, tales como cambios en los patrones de lipopolisacáridos (LPS) y de exopolisacáridos (EPS), acumulación de osmolitos (sacáridos, iones, poliaminas y aminoácidos) que utilizan como osmoprotectores, cambios en su morfología o tamaño celular, entre otros (Wei et al., 2007; Delgado et al., 1995).

La presente investigación tiene como finalidad enriquecer y profundizar el conocimiento de las características de *Ensifer aridi*, ya que debido a las peculiaridades que posee este nuevo género de rizobia, principalmente su halotolerancia, la hace objeto de estudio para indagar acerca de las causas asociadas a esta particularidad. La meta general y a largo plazo que se persigue con la realización de todos estos estudios es disponer de alternativas bacterianas que puedan contribuir con la mejora en la producción de los cultivos de leguminosas pero haciéndolo de manera sustentable, disminuyendo así el impacto negativo que produce nuestra huella ecológica.

Un primer objetivo fue realizar un análisis filogenético con genes “housekeeping” y genes simbióticos presentes en las cepas de rizobia; así como de identificar algunos hospederos de *Ensifer aridi*. Un segundo objetivo fue identificar genes de *Ensifer aridi* LEM451 implicados en la tolerancia la salinidad, y evaluar mutantes de estos genes en plantas de frijol común.

El tipo de investigación de este trabajo fue experimental, cuantitativa, explicativa y longitudinal. Una parte de los experimentos se realizaron en la Unité Mixte de Recherche-Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes-Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (UMR-LSTM-CIRAD), Francia y la otra, en el laboratorio de Ecología Molecular del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICM-ICUAP-BUAP).

CAPÍTULO 1

1.1. Antecedentes

1.1.1. Antecedentes generales

El género *Ensifer* pertenece a la familia Rhizobiaceae, que a su vez, forma parte de la clase alfaproteobacteria, e incluye a un número creciente de especies definidas. Estas bacterias son bacilos, gramnegativas, de rápido crecimiento, móviles, y producen exopolisacáridos (EPS); son capaces de establecer simbiosis con varias leguminosas. Su rango de hospedero varía mucho dependiendo del conjunto de genes simbióticos presente en el microsimbionte, que, generalmente se encuentra en grandes plásmidos llamados pSym.

Estudios recientes basados en análisis de secuencia de locus múltiples (MLSA) han demostrado una gran proximidad entre cepas de *Ensifer* aisladas de especies de *Tephrosia*, que crecen en los suelos alcalinos en el desierto indio de Thar (Tak et al., 2016) con los aislados de *Phaseolus filiformis* recolectados en Baja California Sur en México (Rocha et al., 2019) y de *Acacia* sp. del desierto de Merzouga en Marruecos (Sakrouhi et al., 2016). El método de análisis de secuencias multilocus (MLSA) consiste en el análisis de varios genes de mantenimiento conservados y dispersos en al menos 100 kb del genoma, gracias a ello, se han logrado definiciones exitosas de grupos filogenéticos de rizobia (Menna et al., 2009; Moulin et al., 2004; Cooper y Feil, 2004).

Los estudios sobre la interacción rizobia-leguminosa han demostrado que la tolerancia a la salinidad de la simbiosis, depende directamente de la halotolerancia que posea la planta (Craig et al., 1991; Soussi et al., 1999).

Para comprender la capacidad de rizobia de resistir la salinidad, han sido identificados cambios inducidos de proteínas individuales debidos al estrés (Natarajan et al. 1996) bajo el supuesto de que la adaptación a esta tensión es el resultado de alteraciones en la expresión génica. Una de las consecuencias del estrés salino más reportadas a la fecha, ha sido la

incapacidad de rizobia para infectar las raíces y formar nódulos efectivos, así mismo, una de las explicaciones más denotadas de esta manifestación han sido los cambios en los lipopolisacáridos (LPS) (Lloret et al., 1995) y exopolisacáridos (Lloret et al., 1998; Zahran, 1992; Zahran, 1999) ya que, como componentes importantes de la pared celular externa de las bacterias gramnegativas, desempeñan un papel importante en la adaptación de las bacterias al ambiente (Tao et al., 1992) y como factor de adherencia a los pelos radiculares.

Diversos estudios han reportado que la salinidad afecta directamente al desarrollo y rendimiento de los cultivos de *Phaseolus vulgaris*, y que estos efectos presentan leves diferencias entre variedades de frijol (Campo et al., 2011; Kaymakanova, 2014) y entre los diferentes estadios de desarrollo de la planta (KinfeMichael, 2011, Can-Chulim et al., 2017). Por ello es que además, el estrés salino limita considerablemente la fijación biológica de nitrógeno (FBN) y por lo tanto, también el rendimiento de los cultivos de leguminosas (Zahran 1997; Laranjo y Oliveira, 2011).

Múltiples efectos han sido reportados como resultado del estrés salino, en planta, en rizobia y en la simbiosis que estos dos establecen. Entre ellos se encuentran la disminución del tamaño de la planta, de la cantidad de pelos radiculares, número de nódulos y eficacia de los mismos (nódulos blancos), cantidad de rizobia en el hilo de infección, rizado pobre de los pelos radiculares (se suprime el “cayado del pastor”). En bacteria se ha descrito la acumulación de osmolitos (como osmoprotectores), cambios en morfología y tamaño celular o modificaciones en los patrones de LPS y EPS (Tu, 1981; Zahran y Sprent, 1986; Delgado et al., 1994; Soussi et al., 1999; Bruning y Rozema, 2013). A nivel molecular también se han referido y detallado diversos genes de rizobia involucrados en la respuesta al estrés salino, entre algunos de ellos podemos mencionar *ntrY*, *dnaJ*, *nifS*, *omp10*, *relA*, *nuoL*, *beta*, *B*, *S*, *C*, *I* y *T*, *phA2*, *noeJ*, *kup*, *alaS*, *acdS* (Østerås, 1998; Boscari et al., 2002; Nogales et al., 2002; Payakapong et al., 2006; Wei et al., 2007; Glick, 2014).

Dogra y colaboradores (2013) denotaron la generación de cinco mutantes, de *Mesorhizobium ciceri* Ca181, por transposición con Tn5 incapaces de sobrevivir en presencia de 0.1 M de NaCl. Una de ellas presentaba una disrupción en el gen de un transportador tipo

ABC. Diversos autores han comunicado la relación directa entre los transportadores de tipo ABC con la tolerancia a salinidad en bacterias rizobiales, se ha propuesto que podría representar una estrategia adaptativa potencial en estas bacterias ya que este tipo de transporte están relacionados con la captación de nutrientes y osmoprotección celular (Fox et al., 2006; Dong et al., 2017; Fox et al., 2008).

1.1.2. Antecedentes directos

Este proyecto se inició aislando rizobia procedentes de plantas de *Phaseolus filiformis* que fueron colectadas de la playa Guadalupe, localizada en la bahía Santa María de la región de Los Cabos en Baja California sur, México. A partir de dicho aislamiento, se procedió a la formación de una colección de cepas, la cual, hoy en día, se encuentra resguardada en el cepario del Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones microbiológicas, perteneciente al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Cuéllar-Sánchez (2011), identificó y comprobó el género bacteriano de estas cepas mediante la amplificación y análisis del gen *16S rRNA*, obteniendo como resultado que estas cepas pertenecían al género *Sinorhizobium* (*Ensifer*). Posteriormente, para determinar y evaluar la diversidad genética de la colección, llevó a cabo un Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA) mediante cortes del gen generados por las enzimas *CfoI*, *HinfI*, *NheI* y *AluI*; así mismo, realizó una Amplificación por PCR de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP-PCR). Combinando los resultados obtenidos con estos dos procesos, logró identificar diez perfiles genéticos diferentes. Ella empleó estos perfiles para seleccionar las cepas con las cuales realizaría un ensayo tipo invernadero para probar su capacidad de infección y efectividad, para ello, empleó plantas de diferentes variedades de frijol común (pinto, peruano y negro Jamapa). También evaluó su potencial biofertilizante mediante la cuantificación de peso seco, longitud de raíces y partes aéreas de planta, peso seco y número de nódulos y, con la misma finalidad, llevó a cabo el cálculo de la actividad reductora de acetileno (ARA). Como resultado destacable de estos ensayos en plantas, fue que las cepas nodularon *Phaseolus vulgaris*. Esto resulta relevante debido a que

el género *Ensifer* no había sido reportado como el nodulante habitual de esta leguminosa, salvo en algunos casos (Herrera-Cervera, 1999; Valverde et al., 2003 y Parker, 2002).

Posterior a los estudios que Cuéllar-Sánchez hizo, Rocha (2012), probó diferentes fuentes de carbono para determinar cuántas y cuáles de ellas eran metabolizadas por las cepas de la colección, concluyó que L-arabinosa, D-ribosa, D-maltosa, D-lactosa, D-manitol, Metil-bD-xilanopiranosido y 5-cetogluconato potásico, habían sido utilizados por todas las cepas analizadas. También realizó un análisis de secuencias Multilocus (MLSA), empleando para esto fragmentos de los genes housekeeping *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* y *rpoB*. Los resultados generados por este análisis, sugirieron que probablemente se trataba de una especie de *Ensifer*, antes no descrita. De la colección, evaluó de manera cualitativa, su capacidad de crecer bajo estrés salino, ensayando con medios YMA adicionados con diferentes concentraciones de NaCl (0.02, 0.1, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 M). Identificó a las cepas LEM456, LEM466, LEM465 y LEM451 como aquellas que mostraron mayor tolerancia y persistencia ante la salinidad aunque en todos los casos, también reportó cambios en la morfología colonial respecto a la disminución de la producción de exopolisacárido. Con estas cepas, llevó a cabo un ensayo tipo invernadero en plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Jamapa. Sometió a estrés salino, no solo a las rizobia, sino también a las plantas de *Phaseolus*, utilizando para ello, tratamientos salinos en concentraciones de 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 M de NaCl. El resultado producido de este ensayo, fue que las plantas inoculadas con la cepa *Ensifer* sp. (*Phaseolus filiformis*) LEM451 presentaron una ligera mayor viabilidad que aquellas que habían sido inoculadas con las demás cepas seleccionadas, esto lo determinó mediante la evaluación de parámetros como peso seco y longitud de partes aéreas así como la cuantificación y peso seco de nódulos.

Finalmente, Medina (2014), realizó un MLSA con los fragmentos de los genes *thrC*, *glnA* y el gen 16S rRNA. De su análisis, concluyó que la cepa LEM456 pertenecía la especie *meliloti* y que el resto de ellas nuevamente, se agrupaban en un clúster perteneciente a una especie que hasta entonces tampoco se había descrito, y que Le Quéré y colaboradores (2017) designaron como *Ensifer aridi*. Evaluó la capacidad de las cepas de la colección de crecer y persistir bajo diferentes condiciones de salinidad (0.01, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 M de NaCl),

temperatura (28, 32, 37 y 40°C) y potencial de hidrógeno (5.3, 6.8, 8.3 y 9.5); concluyó que con todas las condiciones de salinidad y temperatura que probó, todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer sin ningún problema; sin embargo, con respecto a las condiciones de pH, determinó que el pH básico en el medio redujo el tiempo de generación de las cepas de estudio y modificó la morfología colonial produciendo una mayor cantidad de exopolisacárido. De igual manera, el pH ácido (5.3) inhibió el crecimiento de las cepas LEM457, LEM459, LEM465 y LEM466 y redujo la producción de exopolisacárido de las cepas restantes. En el mismo proyecto realizó pruebas en plántulas de frijol común variedad negro Jamapa (en tubo) sometiénolas a estrés salino en concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 M de NaCl, concluyó que las plantas inoculadas con las cepas de interés, lograron sobrevivir por un lapso de 28 días creciendo en condiciones salinas con una concentración de NaCl de hasta 0.05 M y que únicamente obtuvo nódulos de las plantas que fueron sometieron a la concentración de 0.01 M.

1.2. Justificación

Desde hace más de una década, el interés de muchos investigadores se ha ido centrando hacia el estudio y análisis de bacterias rizobiales con la intención de generar propuestas novedosas que resulten como alternativas a los problemas que aquejan a los cultivos.

La razón fundamental por la que se investiga cómo solucionar las dificultades que muestra la agricultura en nuestros días, es que las necesidades de alimentación de la población mundial incrementan año tras año y la satisfacción de esta demanda alimenticia cada vez se vislumbra más lejana.

Los problemas que exhiben actualmente los suelos destinados para el cultivo, son diversos: presencia de metales pesados, erosión, anegación, variaciones del pH del suelo, eutrofización, sodicidad, salinidad, etcétera. Ésta última representa la causa que más afecta a la degradación del suelo y al rendimiento de los cultivos en distintas partes del mundo (Zhu, 2001). La presencia de las sales afecta la asimilación de nutrientes por las plantas y la

actividad microbiana del suelo. En México, el problema de la salinidad se presenta principalmente en las zonas áridas y semiáridas con riego, y a lo largo de las costas. Según el informe nacional del programa para la recuperación de suelos promovido por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en conjunto con la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA) (FAO y SAGARPA, 2000), la zona del territorio mexicano más afectado por este problema es la región noroeste, que comprende los estados de Baja California norte, Baja California sur, Chihuahua, Durango, Sinaloa y Sonora.

En condiciones de estrés salino, el uso de bacterias con potencial para inducir la nodulación y fijación de nitrógeno en las leguminosas ha sido objeto de estudio como una opción a las dificultades e inconvenientes que se presentan en este tipo de plantas, en bacterias rizobiales pero sobre todo, en la interacción que estos dos establecen y que significa un rol determinante en el desarrollo y rendimiento de las cosechas. Para conseguir lo anterior, ha resultado imprescindible el aislamiento, identificación y caracterización de rizobia nativas de regiones que presentan problemas de salinidad de sus suelos agrícolas.

La meta de este proyecto es contribuir con el conocimiento y desarrollo de esta área de investigación microbiológica mediante la identificación de determinantes genéticos relacionados directa o indirectamente con la tolerancia al estrés salino en rizobia y en interacción con frijol común, bajo estas condiciones.

1.3.Objetivo general

Describir a *Ensifer aridi*, como una nueva especie de rizobia tolerante a la salinidad y a altas temperaturas aisladas de la leguminosa silvestre *Phaseolus filiformis*: Estudio de los determinantes genéticos de halotolerancia.

1.3.1. Objetivos particulares

- Identificar, clasificar y confirmar la filogenia de las cepas de *Ensifer* sp. LEM como pertenecientes a la especie *aridi*, a través del MLSA de nueve marcadores moleculares (*16sSRNA*, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *thrC*) mediante la concatenación de dichas secuencias.
- Realizar el análisis filogenético de los genes de fijación de nitrógeno (*nifH*) y de nodulación (*nodC*) de las cepas de *Ensifer* sp. LEM.
- Estimar y definir el rango de hospedero de las cepas aisladas de *Ensifer aridi*.
- Identificar y caracterizar genes que le confieren a la cepa *Ensifer aridi* LEM451 la capacidad de tolerar el estrés salino.
- Evaluar el efecto que desempeñan estos genes *in vitro* e *in planta*, en condiciones de salinidad y de no salinidad.
- Analizar y describir la importancia de los genes identificados en la cepa *Ensifer aridi* LEM451, vinculados a su halotolerancia y en su relación con la promoción del crecimiento y mantenimiento de *Phaseolus vulgaris* en condiciones normales y de salinidad.

CAPÍTULO 2

2.1. Leguminosas

La palabra "leguminosa" se deriva de la palabra latina *legumen*, que significa semillas cosechadas en vainas (Kingman, 1991). También son conocidas como legumbres y como fabáceas. Es la tercera familia más grande plantas fanerógamas. Todos los miembros de esta gran familia de plantas comparten la característica de producir vainas, pero sus hábitos de crecimiento pueden variar desde ser plantas herbáceas pequeñas, árboles, matorrales o arbustos. Es cosmopolita y se han descrito aproximadamente 750 géneros (en los que se incluyen alrededor de 19,400 especies) que se encuentran agrupados en 40 tribus). Se subdivide en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Judd et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, aunque se encuentra distribuida por todo el mundo, los géneros leñosos en su mayoría se encuentran en el hemisferio sur y los trópicos, mientras que los géneros herbáceos están principalmente presentes en las regiones templadas y son muy numerosos en zonas de clima mediterráneo.

Poseen tallos erectos, trepadores o trezados. A veces presentan zarcillos o vellosidades espinosas. Tienen hojas generalmente compuestas y en algunas ocasiones pinnadas o bipinnadas, con menor frecuencia, palmeadas y trifolioladas. Pueden o no presentar pecíolos. Las estípulas pueden estar ausentes o presentes, en cuyo caso pueden convertirse en espinas. Las flores son bisexuales, rara vez unisexuales, actinomorfas o zigomorfas. Principalmente en racimos, espigas o panículas. Las brácteas a menudo están presentes. Los sépalos son cinco, libres o connados, generalmente desiguales. Los pétalos suelen mostrarse con sépalos, a menudo, altamente diferenciados en corola papilionácea, pétalo superior (estándar) más exterior, con dos pétalos laterales (alas) paralelos entre sí (Beyra y Reyes, 2004; Zhenghao y Meihua, 2017).

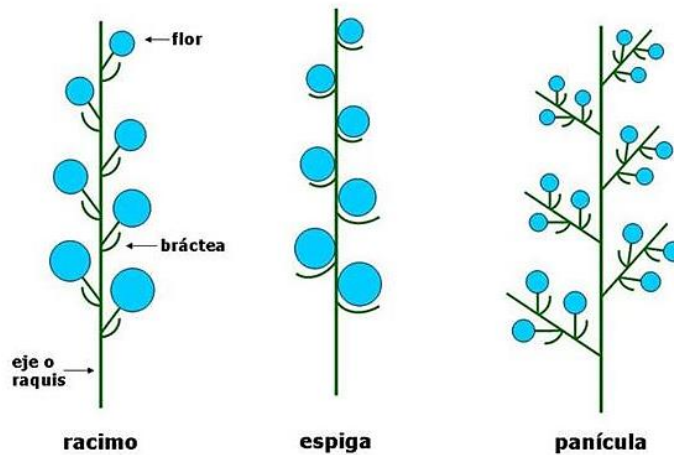


Figura 2. Tipos de inflorescencias que pueden presentarse en algunas leguminosas. (Recuperado de: https://www.unavarra.es/herbario/leguminosas/htm/inflorescencia_L.htm).

En su mayoría tienen diez estambres, a veces menos o más, libres o como mono o diadelfos. Las semillas de las leguminosas suelen ser exalbuminosas, a veces con estrofiolo. Los cotiledones son grandes y carnosos (Zhenghao y Meihua, 2017).

2.1.1. Usos de las leguminosas.

Las legumbres representan una de las fuentes de alimento y nutrientes más importantes del mundo, especialmente en los países en desarrollo. Han sido consumidas por los humanos desde la práctica más temprana de la agricultura. Sus usos a lo largo de la historia, han sido muy diversos debido a sus diferentes propiedades como medicinales, culturales o nutricionales (Phillips, 1993). No solo se han empleado las semillas sino las demás partes de la planta como hojas, brotes, vainas y tubérculos inmaduros, (Aykroyd et al., 1982).

También se obtienen diferentes productos, como ceras, alcoholes, ácidos orgánicos y tintes, algunas de ellas se emplean como ornamentales, e incluso algunas se utilizan con fines de biorremediación y protección del suelo (Llamas y Acedo, 2016).

2.1.1.1. Alimento.

Para este fin, generalmente se usan especies cuya utilidad primaria se basa en las semillas más que en ninguna otra parte de la planta, aunque en el caso de algunas de ellas, también se pueden emplear los tallos, las hojas, las raíces o incluso las flores. Su empleo está dirigido, principalmente, a la alimentación humana debido a su alto contenido proteico, no obstante, también se ha reportado que son fuente importante de vitaminas y minerales (Castrejón et al., 2017) como B1 y hierro. Entre estas leguminosas podemos mencionar al frijol (*Phaseolus vulgaris*), la soya (*Glycine max*), el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), el cacahuate (*Arachis hypogaea*), el tamarindo (*Tamarindus indica*), la lenteja (*Lens culinaris*), los gandules (*Cajanus cajan*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), el ayocote (*Phaseolus coccineus*), el jinicuil (*Inga edulis*), el mezquite (*Prosopis glandulosa*), el guaje rojo (*Leucaena leucocephala*), mimosa (*Acacia dealbata*), el chícharo (*Pisum sativum*), el algarrobo (*Ceratonia siliqua*), el colorín (*Erythrina coralloides*), etcétera.



Figura 3. Leguminosas con importancia alimenticia (Recuperado de:

<https://www.muyinteresante.es/salud/sexualidad/articulo/el-regaliz-puede-reducir-la-fertilidad->

731479203364, <http://hablemosdealimentos.com/c-legumbres/el-cacahuate/>,
<https://www.instazu.com/tag/Jinicuil>, <https://ecocosas.com/plantas-medicinales/algarroba-propiedades/>,
<http://recetariomundial.blogspot.com/2011/03/guandules-con-coco.html>,
<https://www.mexicodesconocido.com.mx/arbol-colorin.html>, <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-tamarindo-en-mexico-186350>).

2.1.1.2. Forraje.

Entre las especies de leguminosas que se usan para este fin, se pueden mencionar a la “campanita morada” (*Clitoria ternatea*), alfalfa (*Medicago sativa*), zapatitos de la virgen (*Lotus corniculatus*), alberja (*Vicia sativa*), mezquite (*Prosopis glandulosa*), cratilia (*Cratylia argentea*), *desmantus* (*Mimosa virgata*), *cacahuananche* (*Gliricidia sepium*), guaje (*Leucaena leucocephala*), guamúchil (*Pithecellobium dulce*), etcétera.

De estas leguminosas, se utilizan partes de la planta distintas a las semillas, principalmente hojas y tallos, para la alimentación animal. Las leguminosas forrajeras, por sí solas o en cultivos mixtos con gramíneas, resultan de gran interés en la alimentación de ganados bovino, caprino, equino, ovino, entre otros debido a su alto contenido proteico (Castrejón et al., 2017).



Figura 4. Algunas leguminosas forrajeras (Recuperado de: <http://pza.sanbi.org/clitoria-ternatea-var-ternatea>,
<https://tuequus.com/es/equinopedia/alfalfa>).

2.1.1.3. Ornamento.

Debido a la gran diversidad de esta familia, contiene especies herbáceas hasta arbóreas con una gran variedad morfológica y florística, razones por las cuales muchas de

ellas son empleadas con fines, como por ejemplo: vergonzosa (*Mimosa pudica*), langosta erizada (*Robinia hispida*), gayomba (*Spartium junceum*), cesalpinia (*Caesalpinia gilliesii*), colorín (*Erythrina coralloides*), framboyán (*Delonix regia*), pata de vaca (*Bauhinia purpurea*), ébano (*Ebenopsis ebano*), etcétera (Trigo y García, 1990).

2.1.1.4. Medicinal.

A ciertas leguminosas se les han atribuido propiedades medicinales, para este fin se ha descrito el uso de prácticamente, todas las partes de la planta. Algunos de ellas y sus usos se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Usos medicinales de algunas leguminosas

Leguminosa	Parte utilizada	Uso	Origen	Referencia
<i>Arachis hypogaea</i>	Semilla	Dietético, afecciones de piel	Sudamérica	Hurrell et al., 2011
<i>Tamarindus indica</i>	Semillas	Ligero laxante	África	Hurrell et al., 2011
<i>Prosopis nigra</i>	Fruto	Asma, conjuntivitis	Sudamérica	Marzocca, 2001.
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Raíces	Expectorante, antiinflamatorio, antiulcerante	Mediterráneo	López, 2008; Hurrell et al., 2011.
<i>Haematoxylon campechianum</i>	Tallo	Antiulcerante, antidiarréico	Centro y sudamérica	Del Campo y Mantilla, 2013.
<i>Genista tinctoria</i>	Ramas (de la floración)	Purgante, diurético, vasoconstrictor	Norteamérica	Walter, 1941.

2.1.1.5. Otros usos.

A la fecha, diversas leguminosas son empleadas con otros fines diferentes de los mencionados anteriormente, han sido empleadas en la industria cosmética, textil, como colorantes, como insumo para la fabricación de muebles, producción de gomas, melíferas, productoras de goma, para el tratamiento de aguas residuales, etcétera. Entre algunas

leguminosas que podemos citar son: palo de Campeche (*Haematoxylon campechianum*), *Genista tinctoria*, soya (*Glycine max*), entre otras (Alcalde, 2007; Miranda, 2018).

2.2. *Phaseolus*

El género *Phaseolus* L., es originario del continente americano y se distribuye en el sureste de Canadá, este y suroeste de Estados Unidos, México, Centroamérica, Antillas y Sudamérica, principalmente en la región andina hasta el norte de Argentina. *Phaseolus* es un género que posee nueve grupos filogenéticos (Delgado-Salinas et al., 1999; Freytag y Debouck 2002) cuenta con más de 60 especies silvestres, de las cuales en México se encuentran alrededor del 83%, de estas, 34 son endémicas. Los estados con mayor riqueza de especies son Oaxaca y Jalisco. Este género incluye cinco especies domesticadas que originalmente han sido cultivadas en México y en la región de los Andes (Gepts 1998; Delgado-Salinas et al. 1999; Gepts et al. 1999): *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima), *P. acutifolius* (frijol tépari), *P. coccineus* spp. *coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus* (*P. polyanthus*, *P. coccineus* spp. *darwinianus*) (Freytag y Debouck, 2002).

Tabla 2. Usos comunes de algunas especies domesticadas de *Phaseolus* (adaptado de Perales y Aguirre, 2008.
Recuperado de: https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Vol%20I/I18_Biodivhum.pdf)

Especie	Nombre común	Uso comestible	Uso forrajero	Uso medicinal	Otros usos	Origen
<i>P. acutifolius</i>	Tépari y escumite	Semilla				Noroccidente de México y suroeste de Estados Unidos
<i>P. coccineus</i>	Ayocote, patolas, tecomari y frijolón	Raíz, follaje, flor, fruto y semilla	Follaje y fruto	Raíz y hojas	Ornamental	México
<i>P. lunatus</i>	Frijol navajita, frijol lima, ib, ixtapacal, chilipuca, pallares y comba	Semilla		Follaje		Sur de México y Guatemala
<i>P. polyanthus</i>	Gordo, acalete, ibes, cubá, frijol toda la vida, piloy, piloya, pilillo	Semilla	Follaje y fruto			Mesoamérica y la región Andina
<i>P. vulgaris</i>	Frijol, garden bean, kidney bean, ñunas y porotos	Semilla	Follaje		Colorante	Mesoamérica y la región Andina

Las especies de *Phaseolus* son herbáceas volubles, generalmente crecen en espacios abiertos, algunas son enredaderas o bien están postradas sobre el suelo. Muchas especies resultan ser muy vistosas debido a sus inflorescencias; en muchos casos presentan numerosas flores de colores que van del violáceo, rosa, blanco al rojo, incluso en algunos casos son de tonos amarillos. En México, se pueden encontrar desde el nivel del mar hasta los 3,000 m de altitud. Sin embargo, es en los bosques tropicales subhúmedos y en los templados de pino, encino o mixtos de encino y pino donde son más frecuentes. La mayoría de ellas se desarrollan en suelos con buen drenaje, donde anclan sus raíces, lo que les permite

vivir por varios años en asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno y microsimbiontes (rizobia). Sus frutos o vainas pueden contener desde una hasta aproximadamente veinte semillas, las cuales comúnmente son expulsadas a varios metros de distancia al abrirse y separarse violentamente sus valvas (Delgado-Salinas et al., 1999).

Se ha observado que diferentes especies pueden habitar en un mismo tipo de comunidad vegetal y es frecuente que varias de ellas coincidan en una misma zona. Esto propicia una competencia entre congéneres por los nutrientes y los polinizadores, además genera las posibilidades de que varias especies de frijol silvestre corran riesgos simultáneos ante disturbios naturales o provocados en una región determinada.

La distribución entre especies de *Phaseolus* es muy diversa, ya que algunas especies están distribuidas de manera extensa mientras que otras se encuentran restringidas en ciertas localidades puntuales. Un ejemplo que ha mostrado las consecuencias de estas restricciones en el caso de *Phaseolus leptophyllus*, fue colectada por primera vez en el siglo XVIII en las montañas cercanas a Chilpancingo, Guerrero, puede ser considerada probablemente extinta, ya que no ha sido encontrada otra vez, a pesar de varias búsquedas en esa región (Freytag y Debouck, 2002). Contrariamente a lo que se cree, la diversidad de las especies silvestres de *Phaseolus* se encuentra amenazada debido a la destrucción de sus hábitats, principalmente por la erosión del suelo, lo que provoca la disminución de materia orgánica en él así como la cantidad de bacterias fijadoras de nitrógeno y microsimbiontes, sin dejar de mencionar a la destrucción de polinizadores potenciales y la presencia de plantas invasoras y plagas (Delgado-Salinas et al., 1999).

El género *Phaseolus* tiene una historia taxonómica y nomenclatural compleja, incluye especies leguminosas de alta importancia a nivel mundial desde el punto de vista alimenticio, son capaces de desarrollarse y proliferar en una variedad amplia de condiciones ambientales: desde los 52° latitud norte, hasta los 32° de latitud sur; en los trópicos húmedo y semiárido, e incluso en regiones con clima frío (Schoonhoven y Voysest, 1991).

2.2.1. *Phaseolus vulgaris*.

Mejor conocido como frijol. México se ha reconocido como el más probable centro de su origen, o al menos, como el centro primario de diversificación. El cultivo del frijol se considera uno de los más antiguos. Algunos de los hallazgos arqueológicos en México y Sudamérica indican que se conocía hace algunos 5000 años antes de Cristo (Gepts y Debouck, 1991).

Es una hierba de vida corta, puede ser enredadera o bien erecta en forma de pequeños arbustos con pequeñas vellosidades. La planta de frijol común es muy ramificada. Las ramas principales pueden tener a su vez ramas laterales; lo anterior multiplica los lugares potenciales de floración. Cada uno de los nudos del tallo posee una hoja trifoliada a excepción del nudo cotiledonar y el nudo de las hojas primarias. En las ramas los dos primeros nudos (difícilmente diferenciables) poseen una estructura foliácea de forma triangular denominada prófilo. El tercer nudo presenta una hoja trifoliada del tipo normal (Debouck e Hidalgo, 1985).

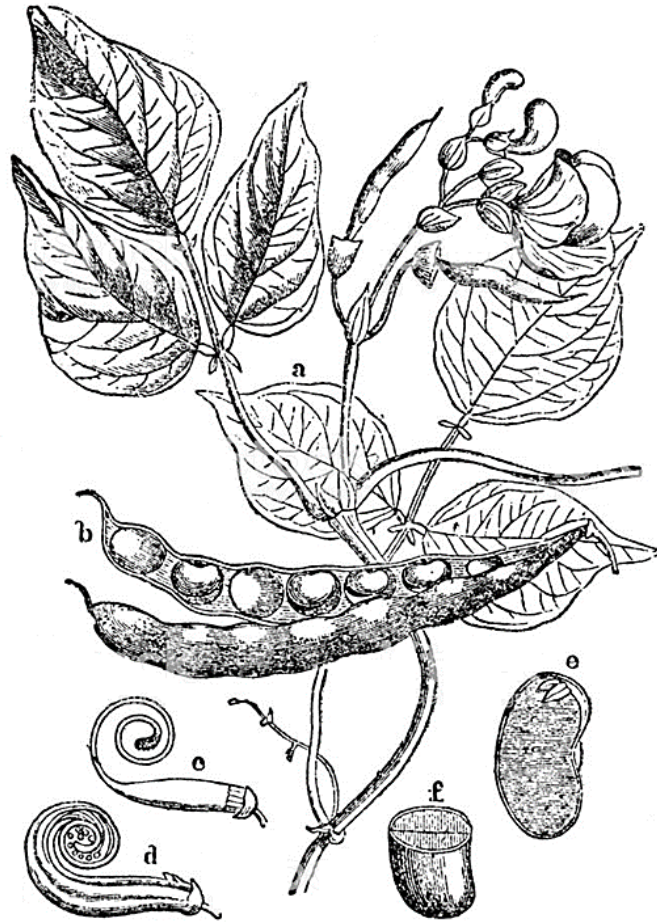


Figura 5. Ilustración de *Phaseolus vulgaris* (Recuperado de: <https://www.gettyimages.es/ilustraciones/frijol-colorado?sort=mostpopular&mediatype=illustration&phrase=frijol%20colorado&license=rf,rm&page=1&recency=anydate&suppressfamilycorrection=true>).

Las hojas del frijol son de dos tipos: simples y compuestas. Están insertadas en los nudos del tallo y las ramas. En dichos nudos siempre se encuentran estípulas que constituyen un carácter importante en la sistemática de las leguminosas. La longitud que pueden alcanzar va desde los 40 cm hasta 3 m de largo, en el caso de las enredaderas. En la base de las hojas sobre el tallo se presenta un par de hojillas (llamadas estípulas), estriadas, las hojas son alternas, pecioladas, y trifoliadas, ovaladas o rómbicas, con el ápice agudo; en la base de cada foliolo se encuentra un par de estipelas. Poseen pocas flores dispuestas sobre pedúnculos más cortos que las hojas, ubicados en las axilas de las hojas; las flores acompañadas por brácteas estriadas. Su cáliz es un tubo campanulado que hacia el ápice se divide en cinco lóbulos, dos de los cuales se encuentran parcialmente unidos; la corola generalmente es de color rosa-

púrpura a blanquecina o blanca, se compone de cinco pétalos desiguales, el más externo es el más ancho y vistoso, llamado estandarte, en seguida se ubica un par de pétalos laterales similares entre sí, llamados alas y por último los dos más internos, también similares entre sí y generalmente fusionados forman una quilla que presenta el ápice largo y torcido en espiral y que envuelve a los estambres y al ovario; diez estambres, los filamentos de nueve están unidos y uno libre; ovario angosto, con un estilo largo y delgado, con pelos hacia el ápice, terminado en un estigma pequeño. El fruto es una vaina con dos valvas, las cuales provienen del ovario comprimido. Puesto que el fruto es una vaina, esta especie se clasifica como leguminosa. Dos suturas aparecen en la unión de las dos valvas: una es la sutura dorsal, llamada placentar; la otra sutura se denomina sutura ventral. Sus vainas son lineares y pueden medir hasta 20 cm de largo, a veces cubiertos de pelillos, dentro contiene semillas globosas y variables (Debouck e Hidalgo, 1985).

2.2.2. *Phaseolus filiformis*.

Algunos de los nombres comunes que describen a esta planta son slimjim, frijol de Wright, frijol de tallo delgado o haba de Wright. Es nativa del suroeste de Estados Unidos de Norteamérica y del norte de México.



Figura 6. *Phaseolus filiformis* (Recuperado de: <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=1623>).

Se ha descrito como una leguminosa herbácea y ruderal, rastrera y trezada; perenne y de vida corta. Su raíz es delgada y su tallo es cilíndrico o en ángulo, posee muchas ramas; en la base a menudo son opuestas. Sus hojas son anchas ovaladas-triangulares, lobuladas y generalmente presenta foliolos de 1 a 5 cm. Presenta flores enracimadas, de aproximadamente 1 cm, son de color rosa-púrpura; su temporada de floración generalmente es de octubre a diciembre. Su fruto es de aproximadamente 2.5-3.5 de largo, oblongo, curvado, colgante y glabro. Sus semillas poseen una cubierta rugosa, con flores de menos de 1.3 cm de largo, oblonga a reniforme (Baldwin et al., 2012).

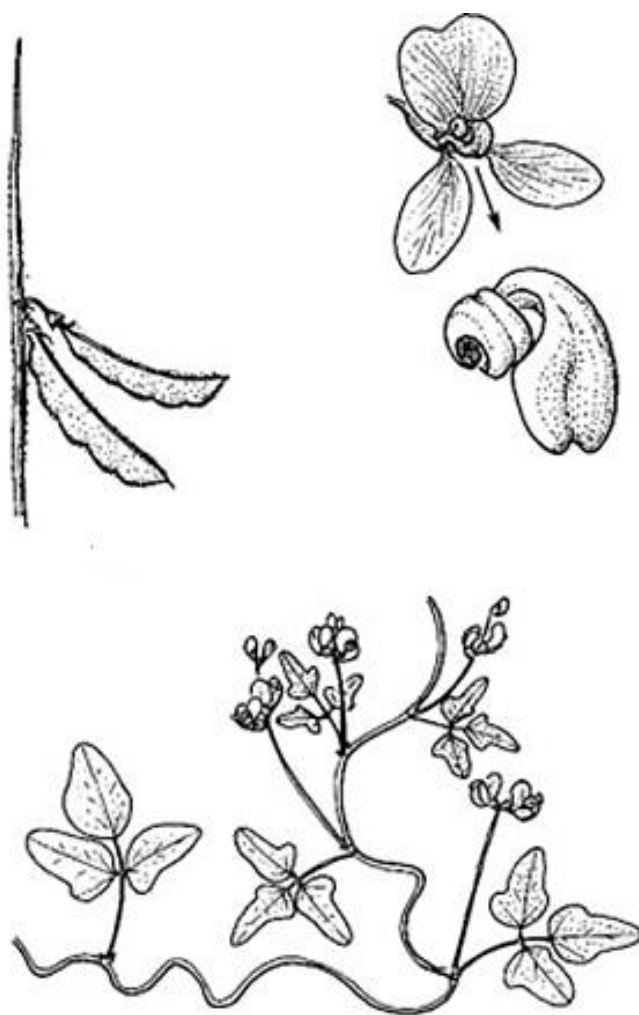


Figura 7. Ilustración de *Phaseolus filiformis* (Delgado-Salinas et al., 2006).

Está estrechamente relacionado con *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus lunatus* (Delgado-Salinas et al., 2006). Se trata de una especie naturalmente tolerante a la salinidad,

desde la germinación y el desarrollo total de la planta; adaptada a ambientes árido y semiárido además de que tiene el potencial de tolerar la sequía y las heladas (Bayuelo-Jiménez et al., 2002).

2.3. Rizobia

Este término, en el sentido estricto de la palabra, corresponde al plural de *rhizobium* (*riza*=raíz y *bios*=vida), y concierne de manera general a un grupo de bacterias que son capaces de fijar biológicamente nitrógeno, mediante el establecimiento de una interacción simbiótica con leguminosas, y, que como resultado de esto producen nódulos en las raíces de las mismas.

La familia Rizobiaceae, pertenece al grupo de las rizobia, que, según el manual de Bergey, describe a esta familia como células bacilares sin endosporas (Jordan, 1984); aerobias o anaerobias facultativas, Gram negativas, móviles (poseen uno o varios flagelos). Su temperatura óptima de crecimiento va desde los 24°C a 30°C, aunque algunas especies pueden crecer a temperaturas mayores de 37°C, su pH óptimo de crecimiento es del rango de 4-7 (Kuykendall et al., 2005). Se pueden encontrar tanto en vida libre como en simbiosis.

La clasificación de rizobia ha sufrido grandes cambios debido a los nuevos datos filogenéticos y polifásicos que lleva a la descripción de los nuevos taxones, aunque aún este campo sigue en expansión pues cada vez más y más rizobia se aíslan y caracterizan, especialmente de las zonas tropicales y mediterráneas, donde la diversidad aún está mal documentada. A principios de la década de los 80's, todas las rizobia habían sido clasificadas en un género único *Rhizobium*, e incluía seis especies *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* y *R. japonicum*. Esta taxonomía coincidió con los grupos de interinoculación, definidos como el conjunto de plantas hospedadoras noduladas por las mismas cepas bacterianas. Los géneros *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium* se agruparon en la familia Rizobiaceae a lo largo de muchos años, debido principalmente, a su característica funcional común de inducir la proliferación celular en las plantas. Basados en secuencias de ADN ribosomal 16S, los simbioses de leguminosas se pueden clasificar en

tres ramas filogenéticas principales separadas: *Rhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Young, J. P. W., 1996, Zakhia y De Lajudie, 2001).

Actualmente, posee géneros que se encuentran dentro de las clases alfa-proteobacterias que incluye a los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) (Mousavi et al., 2014). Y de las beta-proteobacterias que incluye a los géneros *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Cupriavidus* (*Ralstonia*) (Chen et al. 2001; Vandamme y Conye 2004) y *Herbaspirillum* (Valverde et al., 2003).

2.3.1. *Ensifer*.

Casida (1982) describió por primera vez a este género, determinando las características de una cepa a la que nombró *Ensifer adhaerans*, especificó que eran colonias menos viscosas, más pequeñas y ligeramente más blancas que las generadas por *Rhizobium*.

En 1988, Chen y colaboradores, renombraron a este género como *Sinorhizobium*, aludiendo a un género con características similares a *Rhizobium*, esto hizo que a lo largo de varios años, *Sinorhizobium* fuera el nombre que se empleaba para designar a este grupo bacteriano. Sin embargo, la *Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes* (2008) argumentaron que según las Reglas del Código Bacteriológico (Lapage et al., 1992) indicaron que el principio de prioridad daba lugar a la transferencia de los miembros del género *Sinorhizobium* al género *Ensifer*, ya que éste se describió antes que el término *Sinorhizobium*.

Actualmente se han descrito 17 especies de este género: *E. meliloti* (Dangeard, 1926; Jordan et al., 1984; Chen et al., 1988; de Lajudie et al., 1994; Young, 2003); *E. fredii* (Scholla y Elkan, 1984; Chen et al., 1988; de Lajudie et al., 1994); *E. xinjiangense* (Chen et al., 1988); *E. saheli* (de Lajudie et al., 1994); *E. teranga* (de Lajudie et al., 1994); *E. medicae* (Rome et al., 1996); *E. arboris* (Nick et al., 1999); *E. kostiense* (Nick et al., 1999); *E. kummerowiae*

(Wei et al., 2002); *E. morelense* (Wang et al., 2002); *E. americanum* (Toledo et al., 2003); *E. adhaerens* (Casida, 1982; Young, 2003; Willems et al. 2003); *E. mexicanus* (Lloret et al. 2007); *E. chiapanecum* (Rincón-Rosales et al. 2009); *E. garamanticus* (Merabet et al., 2010); *E. numidicus* (Merabet et al., 2010) y *Ensifer aridi* (Le Quéré et al., 2017).

2.3.2. *Ensifer aridi*.

La especie *Ensifer aridi* fue definida por Le Quéré y colaboradores (2017). Reportaron que se trata de una especie que fue aislada de ambientes áridos y cálidos de tres continentes (África [Marruecos], Asia [India] y América [México]).

El tamaño de su genoma central es de 5.12 Mpb, mientras que su genoma accesorio es de 1576 Kpb. Reportaron que posee una mayor proporción de genes que son específicos de cepas aisladas de la misma región, esto sugiere que hubieron adquirido genes accesorios a nivel local. Encontraron una mayor proporción de PEGs asignados a la clase M (relacionados con la biosíntesis membrana, pared celular y envoltura) y S (funciones desconocidas). Mientras que las clase U (Tráfico intracelular, secreción y transporte vesícula) y las clases L (replicación, recombinación y reparación), la proporción fue mínima. La mayor proporción de genes de la clase M indica que *E. aridi* ha favorecido, este proceso celular que puede representar un papel esencial para la viabilidad de esta especie en los desiertos.

Uno de los resultados del análisis genómico comparativo que realizaron, indicaron que un módulo genómico, que designaron como M00599 y que compararon con la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), determinaron que se refiere a un sistema de transporte tipo ABC de fosfato inositol, que está relacionado con la utilización de compuestos derivados de inositol fosforilados que se originan a partir de la degradación de la planta, que beneficia aún más la aptitud bacteriana de supervivencia al proporcionar fuentes de carbono y fósforo utilizables en la senescencia de planta/nódulo. Además, predijeron una mio-inositol fosfato sintasa en todas las cepas de *E. aridi* (Le Quéré et al., 2017); este sistema de transporte también participa en la osmotolerancia de los simbiontes (Das-Chatterjee et al.,

2006) y contribuye a la adaptación particular de esta nueva especie ante condiciones de estrés ambientales como las que se encuentran en los biomas desérticos.

Ensifer aridi es una especie de rápido crecimiento, productora de ácido y tolerante a altas concentraciones de NaCl, a altas temperaturas (hasta 48°C) y a pH alcalino (7.2-9.8) (Rocha, 2012; Medina, 2014; Le Quéré et al., 2017).

A partir de las cepas con las que fue descrita la especie *E. aridi*, determinaron que es capaz de nodular diversas especies de leguminosas (*Vachellia*, *Senegalia* y *Prosopis*).

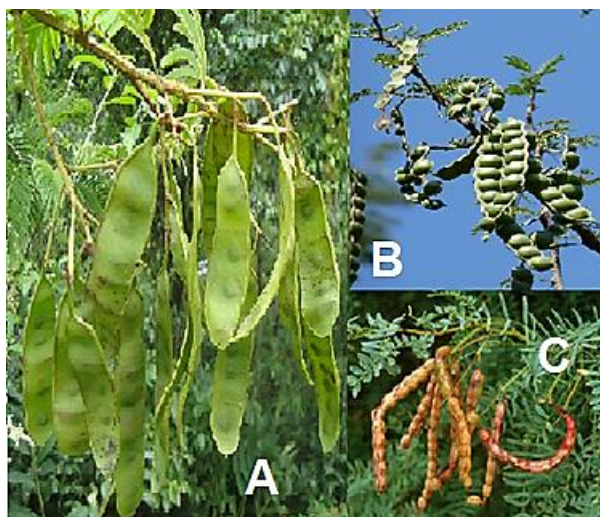


Figura 8. Vainas de *Senegalia* (A), *Vachellia* (B), y *Prosopis* (C). (Recuperado de: <https://www.namibian.com.na/157118/archive-read/Meet-the-trees-of-Namibia--Acacia-Senegalia-Vachellia-Why-the-name-change>).

Una característica más reportada de *Ensifer aridi*, es su capacidad de utilizar una amplia variedad de fuentes de carbono aunque no puede utilizar el xilitol (Le Quéré et al., 2017) ni Metil- α D-piranósido (Rocha, 2012).

2.4. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

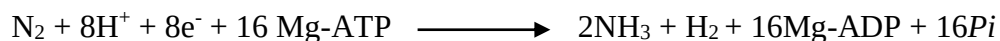
El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre, sin embargo, también representa una fuente nutritiva imprescindible pero muy escasa para las plantas. Esto se debe a que el N_2 atmosférico es inerte y no utilizable para la mayoría de los seres vivos; el N_2 únicamente se incorpora a los sistemas biológicos una vez que haya sido fijado, es decir, que haya sido reducido por organismos fijadores o bien, combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, en forma de nitrato o de amonio.

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación mundial se ha estimado en aproximadamente 275 millones de toneladas de nitrógeno al año, de las cuales 30 millones se fijan mediante causas naturales como las descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etcétera. 70 millones son fijadas mediante el proceso de Haber-Bosch, para el cual se requiere un gran gasto de energía que procede de la industria petrolera, y 175 millones se fijan a través de la FBN. De estos 175 millones, 35 son fijados por microorganismos fijadores en vida libre y 140 millones se fijan gracias a la acción de microorganismos simbióticos (De Felipe, 2006).

Únicamente algunos organismos procariotas poseen la capacidad de asimilar al nitrógeno molecular. La fijación de nitrógeno es el proceso mediante el cual el nitrógeno atmosférico pasa a sus formas combinadas, y son tres las vías por las cuales este proceso puede llevarse a cabo:

- a. Fijación espontánea. Proceso natural en el que descargas eléctricas de tormentas, radiación ultravioleta, rayos cósmicos, meteoritos, combustibles industriales e incendios, entre otras causas, proporcionan momentáneamente la energía requerida para originar óxidos de nitrógeno e incluso amoníaco, a partir de nitrógeno molecular atmosférico, que eventualmente son arrastrados por el agua de lluvia al suelo.
- b. Fijación industrial química. Es cuando la producción de amoníaco y fertilizantes nitrogenados se genera por procesos industriales a partir del nitrógeno del aire (Haber-Bosch).

- c. Fijación biológica. Se refiere a la conversión de nitrógeno atmosférico en amoníaco realizada por microorganismos en vida libre o en asociación con plantas, estos microorganismos reciben por ello el nombre de diazótrofos (*azoe*: nitrógeno; *trofos*: alimentación), este proceso es posible gracias a la presencia de un sistema enzimático denominado nitrogenasa que se encuentra en estos microorganismos; los cuales no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr et al., 1998). Este complejo enzimático consta de dos componentes: el componente I que se caracteriza por tener un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo), también llamada ferromolibdoproteína o dinitrogenasa y es sintetizada por los genes *nifD* y *nifK* (Olivares, 2006); y el componente II, posee átomos de hierro acomplejados con el azufre de determinadas proteínas, también llamada ferroproteína o dinitrogenasa reductasa y es sintetizada por el gen *nifH*. La nitrogenasa es sumamente lábil ante la presencia del oxígeno; de hecho, para su purificación se requieren condiciones anaeróbicas estrictas debido a que el cofactor FeMoCo es irreversiblemente desnaturalizado y oxidado. Para contrarrestar este efecto, una proteína llamada leghemoglobina (cuya síntesis también es estimulada por los factores *Nod*) regula la presencia del oxígeno en el nódulo, lo transporta a través de los tejidos vegetales, liberando el oxígeno suficiente para mantener el proceso respiratorio de las bacterias (Brewin et al., 1992) y a su vez, evita que tenga contacto con la nitrogenasa (“*paradoja del oxígeno*”, Becana et al., 1995). La FBN es un proceso que requiere un gasto considerable de energía, de ahí que su biosíntesis esté sometida a una estricta regulación. Ha sido determinado que, bajo condiciones de laboratorio, se requieren 16 moléculas de Mg-ATP y se produce además una molécula de H₂ (Olivares, 2006) y cuya ecuación global de esta reacción es:



Las bacterias que realizan dicho proceso comprenden organismos fotótrofos, como bacterias pertenecientes a la familia *Rhodospirillaceae*, *Clorobiaceae* y *Cianobacteriae*; organismos quimioautótrofos, como bacterias de los géneros *Thiobacillus*, *Xanthobacter* y

Desulfovibrio y organismos heterótrofos como las bacterias pertenecientes a la familia *Frankiaceae*, al grupo *Rizobiaceae* y a los géneros *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Clostridium* (Sprent y Sprent, 1990). Gracias a la acción de estos microorganismos el empleo de fertilizantes químicos en suelo deja de ser la única opción para enriquecerlo. En la mayoría de estas asociaciones estará limitada por condiciones ambientales desfavorables (sequía, salinidad, baja fertilidad del suelo, entre otros) (Neyra, 1995).

2.5. Interacción rizobia-leguminosa: la nodulación

En 1886 a partir de los trabajos de Jean Batiste Boussingault, de Hermann Hellriegel y Hermann Wilfarth, se describió que la capacidad de las leguminosas para utilizar el N_2 de la atmósfera se debía a la presencia de “nudos” de la raíz inducidos por “fermentos” localizados en el suelo. Este descubrimiento fue seguido rápidamente por el aislamiento por Beijerinck de *Rhizobium* a partir del chícharo (*Pisum sativum*).

Una de las características principales de los miembros de la familia *Leguminosae* es su capacidad para establecer simbiosis con rizobia, como resultado de esta interacción las bacterias inducen en planta la formación de un nuevo órgano llamado nódulo. Los nódulos son estructuras especializadas donde se lleva a cabo la FBN que algunas familias de angiospermas han desarrollado, principalmente en el córtex radicular y en tallo como es el caso de *Sesbania rostrata* y *Aeschynomene* sp. La simbiosis produce un incremento del contenido de nitrógeno del suelo, de la materia orgánica, de la estabilidad de los agregados del suelo y del transporte de nitrógeno de los organismos fijadores a los no fijadores (Zahran, 1991). La interacción entre rizobia y leguminosa inicia mediante el intercambio de señales químicas que producen ambos simbioses.

El proceso de la formación de los nódulos es el resultado de un protocolo entre la planta y los rizobia, en el cual si alguno de los dos incumple con las condiciones establecidas, la formación del nódulo no será lograda. Dicho protocolo puede resumirse en cuatro etapas:

1. Intercambio de señales de naturaleza química entre la planta y el microorganismo. La planta exuda hacia la rizósfera compuestos flavonoides (moléculas de naturaleza fenólica) cuya composición puede variar dependiendo de la especie, y que además de ser metabolizados, desencadenan una serie de respuestas específicas en los rizobia circundantes apropiados (especificidad), algunos de estos flavonoides, provocan la quimiotaxis activa de estas bacterias hacia la superficie radical (Sánchez et al., 1991; Barbour et al., 1991) y estimulan también la producción de oligómeros de N-acetil-D-glucosamina acilados (Lloret y Martínez, 2005). Producen cambios conformacionales en la proteína NodD. El complejo NodD-flavonoide se une a la región situada delante de los genes de nodulación y activa su transcripción. Como consecuencia, la bacteria produce y secreta hacia el entorno factores de nodulación (LCOs) que van a desencadenar en la planta una serie de respuestas biológicas como la despolarización, deformación y curvatura de los pelos radiculares y el inicio de la organogénesis nodular. Cada tipo de rizobia posee factores Nod característicos gracias a los cuales se les debe la especificidad o promiscuidad de la interacción con su hospedero. Las leguminosas también pueden ser específicas para un simbiote en particular.

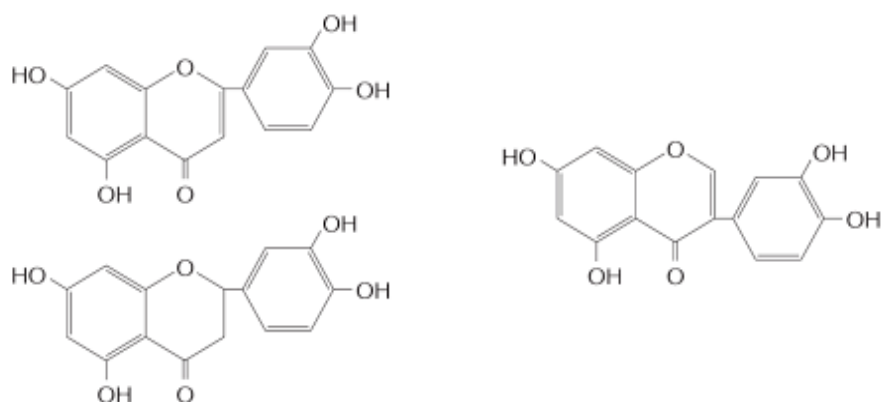


Figura 9. Algunos de los flavonoides producidos por leguminosas. Arriba, izquierda, 5,7,3',4'-tetrahydroxiflavona; abajo, izquierda, 5,7,3',4'-tetrahydroxyflavanona (inductores); derecha, 5,7,4'-trihydroxyisoflavona (inhibidor).

2. Activación del ciclo celular en células corticales e iniciación del nuevo órgano en la planta. La presencia de los factores Nod en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca la deformación de los pelos radiculares (Lerouge et al., 1990; Heidstra et al., 1994) pero se necesitan niveles mayores, del

orden de 10^{-7} a 10^{-9} M para provocar la formación de los pre-canales de infección, la división de las células corticales y la inducción de genes implicados en las fases previas a la nodulación (Truchet et al., 1991).

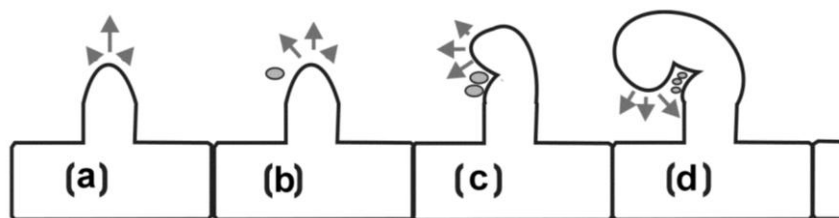


Figura 10. Inducción de la deformación de los pelos radiculares (Brewin, 2004).

3. Infección por parte de la bacteria, formación del canal de infección e invasión de los tejidos recién formados. La unión de las bacterias a la superficie de la raíz es un paso preliminar muy importante que precede a la invasión. Fibrillas de celulosa producidas por la bacteria pueden ayudar a enredar a las rizobia en la superficie mucilaginosa de la raíz. Los polisacáridos y proteínas producidos por las rizobia pueden jugar un papel importante en la interacción física entre la planta y la bacteria. Así, mutantes que carecen de exopolisacáridos (EPS) no invaden ni forman canales de infección (Gray et al., 1990; Soto et al., 2006). Entre otras, el EPS podría enmascarar la superficie bacteriana para evitar el desencadenamiento de una respuesta de defensa por parte de la planta, encapsular a la bacteria contra el estrés fisiológico que existe en el canal de infección, identificar a la bacteria ante el receptor de la planta adecuado. Además, la presencia de un gel de naturaleza tan rígida puede servir a la bacteria como punto de apoyo para entrar en el pelo aprovechando la presión que ejercen las sucesivas divisiones de la bacteria. De este modo se origina una invaginación de la membrana del pelo por la cual las bacterias infectan a la planta formando así los primordios del canal de infección, estructura a través de la cual las bacterias van a discurrir por la planta hasta llegar al nódulo. A lo largo de toda la luz del canal existe una matriz glucoproteica cuyos componentes proceden tanto de la planta como de la bacteria (Broughton et al., 2000, Brewin, 2004). Ya en el interior del canal, las bacterias comienzan a dividirse en los espacios intercelulares hasta tener acceso a las células corticales, y luego, a las células del meristemo (Brewin et al., 1992, Brewin, 2004), los rizobia penetran y se convierten en simbioses intracelulares.

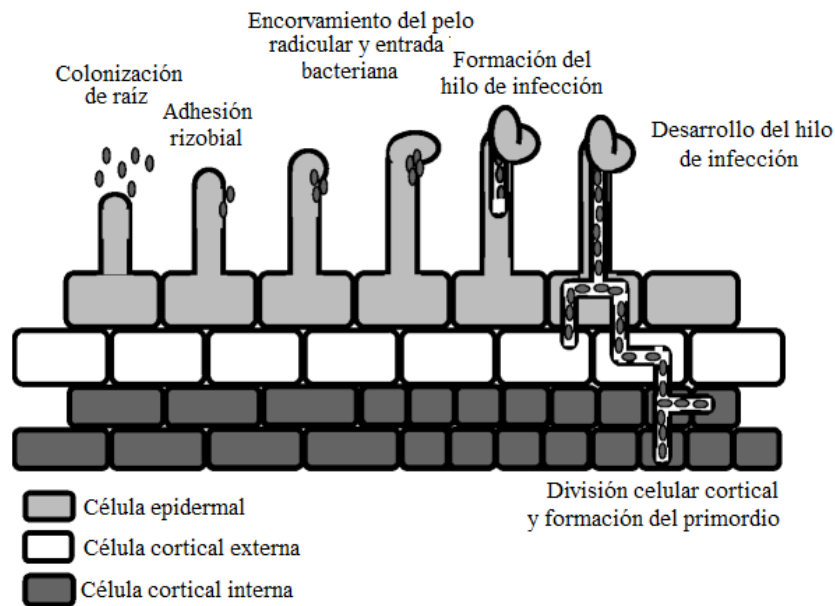


Figura 11. Esquema de los eventos tempranos del proceso de nodulación de leguminosas (adaptado de Pajuelo et al., 2011).

4. Diferenciación de la bacteria a forma especializada (bacterioide). Toda esta serie de modificaciones que culminan en la formación del simbiosoma, el cual presenta una serie de características que son indispensables para realizar la actividad fijadora de nitrógeno:

- Membrana peribacterioidea, sirve de intermediario de señales y nutrientes entre la bacteria y la planta.
- Fluido peribacterioideo, mantiene en contacto la superficie de ambos, estableciendo una zona que permite la interacción.
- Bacterioide, en el proceso de diferenciación los rizobia pueden o bien aumentar su tamaño original de cuatro a siete veces, o bien adquirir un forma de “Y” (sólo en nódulos indeterminados).

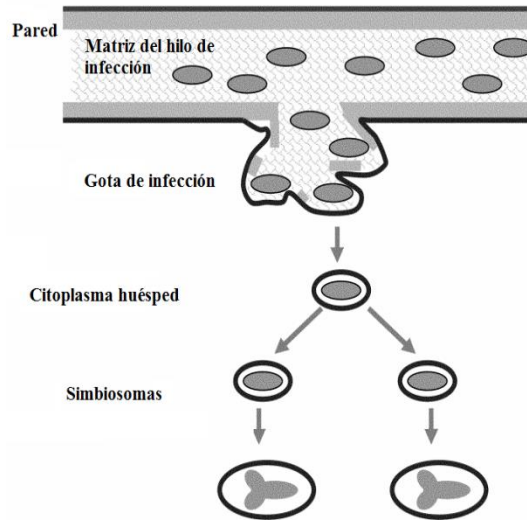


Figura 12. Modelos de endocitosis y desarrollo de simbiosomas (adaptado de Brewin, 2004).

2.6. Estrés salino y su efecto en suelos de cultivo

Suelo es la parte superficial de la corteza terrestre que es biológicamente activa y que se ha formado muy lentamente, a través de los años, debido a la desintegración física y/o química de las rocas y de los residuos de las actividades de seres vivos que se desarrollan sobre él. Está compuesto por minerales, materia orgánica, diminutos organismos vegetales y animales, aire y agua. En el suelo se multiplican miles de formas de vida. Todos los componentes que conforman al suelo son importantes por sí mismas, principalmente, para conservar la homeostasis entre sus diferentes constituyentes. La materia orgánica y los microorganismos aportan y liberan nutrientes. El manejo sostenible del suelo debe estimular la actividad de los microorganismos, manteniendo o aportando una cantidad adecuada de materia orgánica. El suelo que utilizamos para la agricultura es una capa delgada que descansa sobre una base de rocas y pueden degradarse con notable rapidez, volviéndose estériles (Schlegel, 1996).

Aproximadamente, el 12% de la superficie de la tierra es fácilmente cultivable, esto es consecuencia de que la mayor parte de la extensión territorial esté imposibilitada para ser empleada como zona de cultivo principalmente, por problemas que los suelos presentan como sequía por falta de lluvia, temperaturas muy bajas o muy altas, terrenos que siempre están

cubiertos de nieve o hielo o con una pendiente muy acentuada, suelos infértiles por carencia de nutrientes minerales o por contener exceso de sal (Schlegel, 1996).

La salinidad representa hoy en día la causa más grande de la degradación del suelo y el rendimiento de los cultivos disminuyen en diversas regiones del mundo (Zhu, 2001), este problema se ve acentuado por malas prácticas agrícolas como la irrigación (Nadeem et al., 2019) (cantidad y calidad del agua de riego). En campos agrícolas, la presencia en exceso de diversas sales (NaCl , NaCOH_3 , MgSO_4 , MgCl_2 , entre otras) provoca que pierdan su fertilidad y con ello, su capacidad para ser explotados, además, en conjunto con el riego, aumenta la disponibilidad de iones disueltos (De La Peña y Pueyo, 2011), lo que provoca cambios en los gradientes de concentración ocasionando que las plantas presenten dificultades para absorber el agua por medio de las raíces lo cual lleva a pérdidas y dificultades en la asimilación de los nutrientes (Martínez et al., 2011) sobre todo en aquellas zonas geográficas donde la evaporación superficial y la cantidad de agua absorbida por parte de las plantas es mayor que la que se precipita (Fernández-Mata et al., 2014).

La producción de leguminosas depende de la fijación de nitrógeno y es a menudo limitada por estrés salino y sequía (Zahran, 1999). Como se mencionó anteriormente, la infertilidad de las tierras de cultivo a menudo es ocasionada por altas concentraciones de sal, debido a ello, la utilización de leguminosas y de rizobia tolerantes a este tipo de estrés ha ido cobrando mayor interés en el campo de la investigación desde hace algunos años. Tan sólo en México la mayoría de cultivos son sensibles a la salinidad, esto ha reportado una significativa disminución en los rendimientos (Zahran, 1999), esto también genera un impacto negativo en la economía del país, ya que representan una fuente de ingresos importante para un gran número de familias a nivel nacional, incluso es considerado como un producto estratégico en el desarrollo rural y social del país, ya que representa toda una tradición productiva y de consumo, cumpliendo diversas funciones tanto de carácter alimentario como para el desarrollo socioeconómico (Secretaría de Economía, 2012).

En el caso de la simbiosis rizobia-leguminosa, el proceso de fijación de nitrógeno está fuertemente relacionado con el estado fisiológico del hospedero. La variabilidad de tolerancia

a salinidad entre diferentes tipos de leguminosas ha sido reportada, entre algunas de ellas a *Medicago truncatula*, *Lotus japonicum*, *Vigna unguiculata*, *Acacia* spp., entre otras (Bayuelo et al., 2002; Gómez-Padilla et al., 2009; Bruning y Rozema, 2013, Bruning et al., 2015; Khalil et al., 2016; Lei et al., 2018).

La simbiosis establecida entre rizobia-leguminosa así como la formación de nódulos es mucho más sensible al estrés salino que las bacterias rizobia por sí mismas, ya que el estrés salino inhibe las etapas iniciales de la simbiosis (Zarhan, 1999) (adhesión, colonización, formación de canal de infección, etcétera). Se ha observado que en pelos radiculares de soya inoculada con *Bradyrhizobium japonicum* en la concentración de 170 mM de NaCl se presenta una ligera deformación dichos pelos pero, en concentración de 210 mM de NaCl este proceso es totalmente suprimido (Tu, 1981, Zahran, 1999). También se ha reportado que en concentración de 0.3M de NaCl se produce una disminución drástica de la producción de EPS (40% en medio YM) en *Sinorhizobium meliloti*, manifestándose con cambios morfológicos coloniales (colonias no mucoides) lo que conlleva a una débil colonización de los pelos radiculares afectando así el proceso de nodulación (Lloret et al., 1998). Mhadhbi y Aouani en 2008, concluyeron que la simbiosis entre *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* se ve alterada por la presencia de NaCl, ya que disminuye algunas actividades enzimáticas como las de la CAT (catalasa) y la nitrogenasa pero estimula otras como la POX (guaicol peroxidasa), dentro de los nódulos. Del mismo modo, se han reportado modificaciones en la composición de ácidos grasos de la membrana celular de cepas de *Bradyrhizobium* (Paulucci et al., 2011).

El estrés salino también acelera la senescencia de los nódulos (Martínez-Salazar, et al., 2009) y reduce el contenido de leghemoglobina dentro de los mismos lo que provoca la ineffectividad de éstos (Delgado et al., 1993). Se ha reportado la acumulación de osmolitos en bacterias que se encuentran bajo estrés salino y que tienen función osmoprotectora como poliaminas (Aziz et al., 1999; Kasinathan y Wingler, 2004; Shamseldin et al., 2006), polisacáridos (Rüberg, et al., 2003; Gouffi et al., 1998; Gouffi et al., 1999) aminoácidos (TeChien et al., 1992), solutos orgánicos (Soussi et al., 1999), azúcares solubles (Sairam y Tyagi, 2004) y cationes inorgánicos (Asch et al., 1999).

El efecto de las sales en la planta se presenta cuando es sometida a altas concentraciones de una sal, lo que afecta la retención osmótica del agua, y de los efectos iónicos que esto ocasiona, muy específicamente sobre el citoplasma y las membranas de las células (Basurto-Sotelo et al., 2009). Para determinar si un suelo es salino o no, o bien, determinar el grado de salinidad del mismo, se cuantifican los valores de concentración de sales, comúnmente se hace a través de la medición de la conductividad eléctrica (CE), es la capacidad que tiene un material de permitir el paso de la corriente eléctrica a través de él, es directamente proporcional a la concentración de sales en dicha solución y a la temperatura del medio (Fernández et al., 2014). Se expresa en unidades *Siemens* o *mhos* por metro (S/m). Para fines agronómicos, normalmente es determinada en extracto de pasta saturada suelo:agua (ECe), realizado en suelo tomado de la región de la raíz, promediado sobre profundidad y tiempo, extraído mediante vacío y posterior filtrado.

Con base en los valores de conductividad eléctrica del suelo, es que se pueden clasificar y así determinar si son aptos o no para el desarrollo de cierto tipo de cultivos. Cabe mencionar que la conductividad eléctrica está regida por el tipo y concentración de iones que se encuentren presentes en la muestra, por ello es que se ha establecido que la salinidad de los suelos no se debe únicamente a la presencia de NaCl, sino a otras sales. A continuación se muestra un listado de las sales más frecuentes en suelos salinos y su grado de toxicidad para las plantas:

Tabla 3. Listado de las sales más comunes halladas en suelos salinos y su toxicidad.

Sal	Frecuencia	Toxicidad
NaCl	Común	+++
MgCl ₂	Común	++++
CaCl ₂	Raro	++
KCl	Baja	+
Na ₂ SO ₄	Común	++
MgSO ₄	Común	++++
K ₂ SO ₄	Baja	+
Na ₂ CO ₃	Suelos	+++++
NaCO ₃ H	Suelos	++++

Según la Norma Oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos (NOM-021-RECNAT-SEMARNAT-2000), los suelos son considerados como se muestra en la siguiente figura.

CE dS m ⁻¹ a 25°C	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 - 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 - 4.0	Moderadamente salino
4.1 - 8.0	Suelo salino
8.1 - 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

Figura 13. Clasificación de los suelos salinos según la NOM-021-RECNAT-SEMARNAT-2000 (Recuperado de: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>).

Para fines prácticos, con base en la concentración de NaCl, los suelos se pueden clasificar de la siguiente manera, según Richards (1990).

Tabla 4. Clasificación de los suelos salinos con base en la concentración de NaCl.

Tipo de suelo	NaCl (mM a 25°C)
Muy fuertemente salino	>175
Fuertemente salino	87.6-175
Suelo salino	43.8-87.5
Moderadamente salino	21.5-43.7
Muy ligeramente salino	12-21.4
Efectos despreciables de la	1.09-11

2.7. Análisis de secuencias multilocus en la taxonomía rizobial

Los conceptos basados en la teoría de las especies procariotas han sido un tema de debate dentro de la filogenética de rizobia. La técnica considerada como la “prueba de oro” es la hibridación ADN-ADN (DDH), ya que ésta es una de las más utilizadas para definir y designar especies bacterianas. Sin embargo, tiene serias limitaciones: demanda mucho tiempo para una identificación rápida, no es apropiada para procariotas no cultivables; además, el criterio del 70% no corresponde a un concepto basado en la teoría evolutiva de

las propiedades que una especie debería tener (Gevers, et al., 2005). El avance en la tecnología de secuenciación, ha permitido utilizar a la genómica comparativa y al análisis de secuencias multilocus (MLSA) para proporcionar una relación más cercana entre la conceptualización y la definición de especies. Hace pocos años, se ha demostrado que un ANI (Average Nucleotide Identity) del 95-96% de genomas apareados, correlaciona con el criterio del 70% de la prueba DDH (DNA-DNA Hybridization) (Goris et al., 2007).

Una metodología de clasificación ampliamente utilizada para el análisis filogenético de rizobia, es el MLSA, éste puede detectar diferentes líneas clonales, incluso, en presencia de bajos niveles de variabilidad en el genoma. Hace uso de la secuenciación genética para caracterizar a los alelos presentes en diferentes genes no sometidos a selección, implicados en el metabolismo bacteriano (genes *housekeeping*). Dado que la relación que hay entre estos genes no es la misma en muchas especies, la acumulación de cambios de nucleótidos en estos de genes es un proceso relativamente lento y por lo tanto el perfil alélico es estable a lo largo del tiempo (Vázquez y Berrón, 2004). Compara las secuencias primarias de múltiples loci de genes que codifican para proteínas altamente conservadas para evaluar la diversidad y relación de diferentes aislados a través de taxa relacionados empleando para ello un enfoque cladístico o filogenético. Por otra parte el análisis de secuencias genéticas tiene un alto poder de discriminación y permite el intercambio y la comparación objetiva de resultados entre distintas bases de datos, tales como las que maneja el NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Entre las diversas ventajas del MLSA, es que los datos resultantes pueden ser fácilmente compartidos entre un grupo de investigación y otro, además de que estos resultados también han dado origen a bases de datos globales y que pueden ser compartidas a través de internet. Y, aunque no es una técnica de genómica comparativa, predice de manera precisa las relaciones entre organismos estrechamente vinculados. Una estrategia general para la identificación de nuevos aislamientos podría consistir en la secuenciación parcial inicial del gen 16S rRNA de identificación a nivel de género (Martens, 2008). Para análisis filogenéticos, muchos genes de mantenimiento pueden ser analizados para propósitos de identificación. Las filogenias incongruentes indican una posible transferencia horizontal

mientras que las filogenias congruentes reflejan una historia ancestral en común entre dichos genes. Para el grupo rizobia, los genes con muy buena capacidad para identificar y clasificar cepas son los genes *gyrB*, *glnII*, *recA* y *trhC* (Martens, 2008).

CAPÍTULO 3

3.1. Metodología

3.1.1. Extracción de ADN, amplificación, concatenación y análisis de secuencias multilocus (MLSA) de los genes *16SsRNA*, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *glnII*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* y *thrC* (fragmentos).

Para identificar las cepas nativas de rizobia provenientes de *Phaseolus filiformis* de la región de Baja California Sur, se realizó un MLSA de fragmentos de nueve genes housekeeping. La extracción de ADN se realizó utilizando el “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción de PCR para todos los fragmentos fue la siguiente: 12.5 l de GoTaq® green master mix (Promega) 1 l a 20 pmol de cada uno de los primers (*forward* y *reverse*) con un volumen final de 25 µl. Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (BET) con una concentración de 0.5 mg/mL. Las bandas correspondientes a los productos de la amplificación fueron escindidos del gel, fueron purificados utilizando el Qiaquick® PCR purification kit (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y finalmente enviados para su secuenciación a los laboratorios “Genoscreen” en Francia.

La lista de primers y condiciones de amplificación de los genes de interés para en este ensayo, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 5. Primers y condiciones de temperatura para la PCR de los genes housekeeping. *Modificado de Gaunt et al., 2001.

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Condiciones de PCR	Referencia
<i>atpD</i>	atpD255F atpD782R	GCTSGGCCGCGATCMTSAACGTC GCCGACACTTCMGAACCNGCCT G	3'30" 95°C, x30 (1' 93.5°C, 40" 55°C, 1' 72°C), 5' 72°C, ∞ 15°C.	Vinuesa et al., 2005.
<i>rpoB</i>	rpoB83F rpoB1061R	CCTSATCGAGGTTCACAGAAGGC AGCGTGTTGCGGATATAGGCG	5' 96°C, x 35 (30" 94°C, 30" 59°C, 1' 72°C), 3' 72°C, ∞ 20°C.	Martens et al., 2008.
<i>gyrB</i>	gyrB343F gyrB1043R	TTCGACCAGAAATCCTAYAAGG AGCTTGTCCTTSGTCTGCG	5' 96°C, x 35 (30" 94°C, 30" 59°C, 1' 72°C), 3' 72°C, ∞ 20°C.	Martens et al., 2008.
<i>recA</i>	recA12* recA555	GTAGAGGAYAAATCGGTGGA CGRATCTGGTTGATGAAGATCAC CAT	5' 94°C, x35 (30" 94°C, 1' 50°C, 45" 72°C), 7' 72°C, ∞ 20°C.	Gaunt et al., 2001.
<i>dnaK</i>	TSdnaK2 TSdnaK4	GTACATGGCCTCGCCGAGCTTCA GGCAAGGAGCCGCAYAAGG	5' 94°C, x 35 (30" 94°C, 1' 60°C, 45" 72°C), 7' 72°C, ∞ 20°C.	Stepkowsky et al., 2003.
<i>glnA</i>	glnA144F glnA1142R	GTCATGTTGACGGYTCYTCG TGGAKCTTGTTCTTGATGCCG	3'30" 95°C, x30 (1' 93.5°C, 1' 61°C, 1' 72°C), 5' 72°C, ∞ 20°C.	Martens et al., 2007.
<i>glnII</i>	12F 689R	YAAGCTCGAGTACATYTGGCT TGCATGCCGAGCCGTTCCA	3'30" 95°C, x 30 (30" 93.5°C, 1' 58°C, 1' 72°C), 5' 72°C, ∞ 20°C.	Vinuesa et al., 2005.
<i>thrC</i>	thrC577F thrC1231R	GGCANKTTTCGACGAYTGCCAG GGRAATTTDGCCGGRTGSGC	3'30" 95°C, x30 (1' 93.5°C, 1' 55°C, 1' 72°C), 5' 72°C, ∞ 20°C.	Martens et al., 2007.
<i>16sSRNA</i>	UN27F UN1392R	TAGAGTTTGATCCTGGCTCAG CAGGGGCGGTGTGTACA	3' 95°C, x26 (30" 94°C, 1' 57°C, 1'10" 72°C), 10' 72°C, ∞ 20°C.	Biodiversa Inc., México

Para realizar el MLSA primero se hizo el empalme de las secuencias, tanto *forward* como *reverse*, se hizo mediante el programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.8.0 (Hall, 1999); mientras que para el manejo de las secuencias en formato "fasta" se utilizó un editor de texto.

Se compararon cada una de las secuencias con las reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) para comprobar que efectivamente las secuencias obtenidas pertenecen al gen que de interés.

Las secuencias fueron manipuladas mediante el programa CLUSTALX versión 2.0.10 (Thompson et al., 1997); y los archivos de alineamiento (*.aln) fueron importados con el programa GeneDoc versión 2.7.000 (Nicholas et al., 2009) para poder manipular las secuencias de una manera más simple y sencilla. Después de esto, los archivos exportados desde GeneDoc (*.aa) fueron manipulados con el programa DNAsp versión 6.12.03 (Rozas et al., 2017) para con ello producir los archivos con formato MEGA (*.meg) los cuales posteriormente fueron procesados con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura et al., 2013), el cual nos permitió llevar a cabo el análisis filogenético al generar los dendrogramas con base en el algoritmo Maximum Likelihood, para lo cual se realizó un análisis de confianza (bootstrap) de 500 para cada árbol filogenético.

Para el caso de la concatenación de los fragmentos de los nueve genes, se empleó el programa DNASP6 (Rozas et al., 2017).

3.1.2. Amplificación y análisis filogenético de los genes *nifH* y *nodC* (fragmentos).

Para relacionar filogenéticamente a las cepas de *Ensifer aridi* con sus posibles hospederos, se llevó a cabo la amplificación y el análisis de fragmentos de las secuencias correspondientes a los genes simbióticos (*nodC* y *nifH*).

Para la amplificación de los genes *nodC* y *nifH*, se usaron los juegos de primers y perfiles de temperatura descritos por Laguerre y colaboradores (2001), estos son:

nodC

nodCF (5'-AYG THG TYG AYG ACG GTT C-3').

nodCI (5'-CYG GAC AGC CAN TCK CTA TTG-3').

5' 95°C
 30" 94°C } 35 ciclos
 30" 56°C }
 1' 72°C }
 7' 72°C }
 ∞ 20°C

nifH

nifHF (5'-TAC GGN AAR GGS GGN ATC GGC AA-3').

nifHI (5'-AGC ATG TCY YCS AGY TCN TCC A-3').

5' 95°C
 30" 94°C } 35 ciclos
 30" 60°C }
 45" 72°C }
 7' 72°C }
 ∞ 20°C

Los programas y estrategia para realizar el análisis de los genes simbióticos, fueron los mismos que se emplearon para el MLSA de los fragmentos de los nueve genes que se mencionó en el apartado anterior.

3.1.3. Rango de hospedero.

Estos ensayos se realizaron en las instalaciones del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se probaron plantas de las siguientes leguminosas para evaluar la capacidad infectiva (producción de nódulos) y el rango de hospedero de las cepas *Ensifer aridi* LEM 451, *Ensifer aridi* LEM 457 y *Rhizobium etli* CE3 (como testigo): *Erythrina americana*, *Mimosa pudica*, *Medicago sativa*, *Lupinus gredensis*, *Phaseolus vulgaris* (en las variedades de alubia y vaquita), *Cicer arietinum* y *Lens culinaris*.

3.1.3.1. Selección y desinfección de semillas.

Se seleccionaron doce semillas de cada una de las leguminosas. Fueron elegidas aquellas semillas que presentaron un tamaño y color óptimos, así como que tuvieran su superficie uniforme, que no tuvieran daño mecánico visible ni tampoco que fuese notoria la presencia de hongos o algún otro microorganismo que pudiese estar dañando a la semilla. Como primer paso, todas las semillas fueron sometidas a un lavado con una solución jabonosa y se enjuagaron con agua destilada estéril. A continuación, se describen los protocolos de desinfección de cada una de las semillas:

Erythrina americana. Se sometieron a la abrasión de su testa, muy cercano al macrópilo e hilo usando para ello una lija media para madera (100-120). Después se embebieron en etanol al 70% durante diez minutos y se enjuagaron una vez con agua destilada. A continuación se les escurrió por completo el exceso de agua y se sumergieron en H_2SO_4 concentrado a lo largo de diez minutos y se enjuagaron nuevamente con agua destilada estéril para finalmente, drenarles el agua remanente. Posteriormente, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 25% durante quince minutos; en seguida se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Finalmente, se dejaron en remojo con agua destilada estéril durante seis horas continuas.



Figura 14. Semillas de *Erythina americana* (Ruiz et al., 2012).

Mimosa púdica. Se sumergieron en etanol al 70% durante cinco minutos. Después se embebieron en H_2SO_4 durante 10 minutos seguidos por sumergirlas en una solución de

hipoclorito de sodio comercial al 25% durante quince minutos. Finalmente, se hicieron cinco lavados con agua destilada estéril.



Figura 15. Flores y semillas de *Mimosa pudica*. (Recuperado de: <http://www.semillasorganicas.cl/producto/semillas-de-mimosa-pudica/>).

Medicago sativa. Se remojaron en etanol al 70% durante cinco minutos, después se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 25% durante quince minutos. Finalmente, se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril.

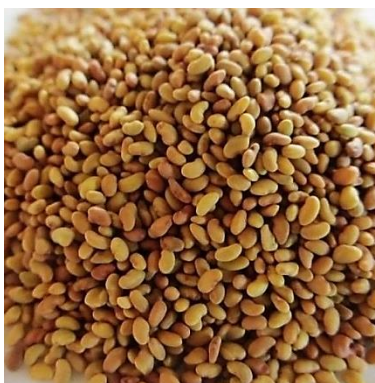


Figura 16. Semillas de *Medicago sativa*. (Recuperado de: https://es.123rf.com/photo_82315949_semillas-de-alfalfa-en-el-cuenca-de-cer%C3%A1mica-blanco-aislado-en-madera-blanca-pintada-desde-arriba-semi.html).

Lupinus gredensis. Se colocaron en etanol al 70% durante cinco minutos, en seguida enjuagaron y se agregaron a una solución de cloro al 25% durante quince minutos, al término de este tiempo se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.



Figura 17. Planta de *Lupinus gredensis*. (Recuperado de: <https://www.asturnatura.com/especie/lupinus-gredensis.html>)

Phaseolus vulgaris (Var. vaquita). Se sumergieron después durante tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% y se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril.



Figura 18. *Phaseolus vulgaris* variedad vaquita. (Recuperado de: <https://gourmetdemexico.com.mx/comida-y-cultura/5-tipos-de-frijoles-mexicanos/>).

Phaseolus vulgaris (Var. alubia). Primero se sumergieron en alcohol al 70% durante cinco minutos y después en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante quince minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril cinco veces y, finalmente se embebieron en agua hirviendo durante quince segundos.



Figura 19. *Phaseolus vulgaris* variedad alubia. (Recuperado de: <http://www.gastroteca.cat/es/ficha-productos/alubia-del-ganxet-dop/>).

Cicer arietinum. Se esterilizó con agua y detergente, alcohol al 70% durante 5 minutos, después cloro al 25% durante 15 minutos, se enjuagó con agua destilada estéril 5 veces y después se vertió en agua hirviendo durante 50 segundos.

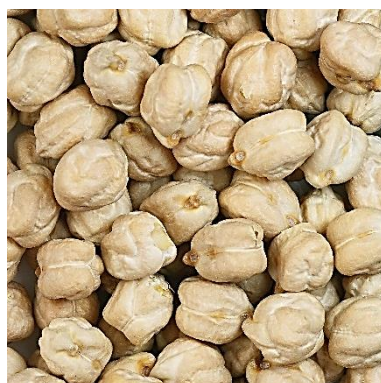


Figura 20. Semillas de *Cicer arietinum*. (Recuperado de: <https://en.wikipedia.org/wiki/Chickpea>).

Lens culinaris. En el caso de esta semilla, todo el procedimiento se llevó a cabo de manera muy suave debido a que la cutícula de la misma es muy frágil. Primero se sumergieron en alcohol al 70% durante dos minutos y después en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% durante dos minutos, finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces.



Figura 21. Semillas de *Lens culinaris*. (Recuperado de: <https://www.sinavimo.gov.ar/cultivo/lens-culinaris>).

3.1.3.2. Inoculación, tratamiento y mantenimiento de las plántulas de leguminosas.

Una vez desinfectadas, se procedió a colocar las semillas sobre agar agua al 0.7 %, contenido en placas Petri para que germinaran, se incubaron por tres días (en promedio) a 28°C en condiciones de oscuridad. Una vez germinadas las semillas, fueron trasplantadas a macetas de plástico que contenían vermiculita estéril y humedecida igualmente con agua destilada estéril. Se sembraron cuatro semillas por maceta y esto se hizo por triplicado (por cepa). Una vez inoculadas las plantas, fueron regadas una vez por semana con 50 mL de solución nutritiva Jensen libre de nitrógeno y dos veces por semana con 50 mL de agua destilada estéril. Las plantas fueron incubadas a 20°C con un ciclo de luz/oscuridad de 16 h y 8 h, respectivamente (Knight et al., 1986).

Para la preparación de los cultivos con los cuales fueron inoculadas las leguminosas, primero, las cepas candidatas se sembraron en placas con medio TY durante 24h a 30°C. Posteriormente, las colonias de rizobia fueron sembradas en TY (líquido) con agitación constante e incubadas a 30°C hasta que el crecimiento bacteriano de los cultivos tuviera una densidad óptica de 0.8 (1×10^8 UFC). Con un mililitro de estos cultivos (de cada cepa), se inocularon cada una de las semillas (doce semillas por cepa).

3.1.3.3. Evaluación de la capacidad nodulante de las cepas de *Ensifer aridi*.

Para identificar y determinar la capacidad nodulante de las cepas de *Ensifer aridi* probadas en este ensayo, se comprobó la presencia o ausencia de nódulos y la cuantificación de los mismos. El tiempo de aparición desarrollo de los nódulos, dependió del tipo de semilla.

3.1.4. Formación de la banca de mutantes por transposición de *Ensifer aridi* LEM451.

La mutateca que se formó en este proyecto, se llevó a cabo mediante transposición, a través de un proceso de conjugación biparental, usando como cepa receptora a *Ensifer aridi* LEM451 y como cepa donadora a *Escherichia coli* S17.1 (recA pro hsdR, RP4-Tc::Mu-Km::Tn7) pUT mini Tn-5-Gm (la cual fue muy amablemente donada por el D. C. Jesús Muñoz Rojas).

La cepa silvestre *Ensifer aridi* LEM451 fue sembrada en medio TY (Tryptona-Extracto de levadura) e incubada a 30°C por 24-36 h.

Antibiograma y concentración mínima inhibitoria (CMI).

Ensifer aridi LEM451, por tratarse de una especie recién descrita, tuvimos que realizar un antibiograma y determinar la CMI para identificar el antibiótico que sería el medio de selección; esto también se hizo con la cepa *Escherichia coli* S17.1 pUT mini Tn-5-Gm. Los antibióticos que se utilizaron para esta prueba fueron los siguientes: kanamicina (Km), estreptomycin (Sm), spectinomycin (Spc), tetraciclina (Tc), gentamicina (Gm) y cloranfenicol (Cm).

Esta prueba se realizó utilizando 3 medios de cultivos diferentes, YM, TY y MMK. Se colocaron 10 ml de cada cultivo en cada tubo de ensayo de vidrio. A cada tubo se le agregó el antibiótico en la concentración correspondiente. Se tomó con el asa bacteriológica una muestra de las cepas a probar y se inocularon cada uno de los tubos. Finalmente, los tubos se

incubaron a 30°C por 24 y 48 h (tiempos en los que se realizaron los registros del crecimiento o inhibición bacteriana).

3.1.4.1. Fuentes de carbono.

Para determinar el crecimiento con diferentes fuentes de carbono (maltosa, succinato, sacarosa, lactosa, malato, glucosa, lactato, acetato, ácido glutámico y ácido málico), se usaron placas con medio base-K (MMK) modificando la fuente de carbono correspondiente (35 mM) y se sembraron las cepas donadora y aceptora por estría cruzada y se determinó el crecimiento de las mismas.

3.1.4.2. Prueba de medios de cultivo.

Con el objetivo de definir qué medio de cultivo iba a ser empleado para realizar y optimizar el proceso de conjugación bacteriana biparental, se probaron diferentes medios de cultivo con la finalidad de elegir el adecuado para usarlo como medio de selección de la mutantes transconjugantes. Los medios que se probaron fueron TY (agar Triptona-Extracto de levadura), RFM (agar Rojo de Fenol y Manitol), MMAB (agar Medio Mínimo AB), MMK (agar Medio mínimo Base-K) y MMK modificado (35 mM de otras fuentes de carbono, ya descritas anteriormente); M9-cit (agar Medio Mínimo 9-Citrato), YMA (agar Extracto de levadura-Manitol). La cepa *Ensifer aridi* LEM451 y *E. coli* S17.1 pUT mini-Tn5-Gm fueron sembradas por estría cruzada y se determinó el crecimiento de las mismas.

3.1.4.3. Conjugación biparental.

Para llevar a cabo la conjugación biparental la cepa donadora (*Escherichia coli* S17.1 pUT miniTn5-Gm) se incubó en 5 ml de medio Luria Bertani (LB) adicionado con gentamicina (10 µg/ml), mientras que, la cepa aceptora (*Ensifer aridi* LEM451) se incubó en 10 ml de medio TY, ambas cepas se incubaron con agitación constante (180 rpm) a 30°C por un periodo de 24 h.

La cepa silvestre se cultivó en 10 ml de medio TY líquido y la cepa *E. coli* S17.1 pUT mini-Tn5-Gm se cultivó en 10 ml de medio LB líquido adicionado con gentamicina (10 µg/ml), ambas cepas se incubaron a 30°C por 24 h y con agitación constante de 180 rpm. Una vez transcurrido el tiempo indicado de incubación, se centrifugaron las cepas, *E. aridi* LEM451 a 1200 x g durante 5 minutos, mientras que la cepa *E. coli* S17.1 pUT mini-Tn5-Gm se centrifugó a 640 x g durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante de ambas cepas y los pellets fueron resuspendidos; el de la cepa *Ensifer aridi* LEM451 con 3 ml de una solución de MgSO₄ (10 mM) y, el de *Escherichia coli* S17.1 (pUT-miniTn5-Gm), fue resuspendido en 5 ml MgSO₄ (10 mM). Se mezclaron ambas cepas en proporción 1:5 (*E. coli* S17.1:*Ensifer aridi*), posteriormente, se centrifugó esta mezcla a 640 x g durante 3 minutos; después se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido con 500 µl de medio TY líquido, esto se realizó una vez más; finalmente, se resuspendió el pellet en 50 µl de medio TY líquido, mismos que se colocaron sobre una placa con medio TY y se dejaron secar; una vez ocurrido esto, se incubó la placa dentro de un contenedor con tapa que contenía un poco de agua limpia dentro, esto se hizo con la finalidad brindar humedad constante al proceso de conjugación; se incubó a 30°C durante un periodo de 24 h. Como controles se utilizaron a las cepas donadora y receptora sometidas al mismo proceso que la conjugación, pero se cultivaron en placas separadas.

3.1.4.3.1. Cosecha de las transconjugantes.

Después de haber transcurrido el periodo de incubación, se recolectó el tapete celular de la conjugación y se solubilizó en 1 ml de medio TY líquido. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas (de 10⁰-10³). Una vez generadas las diluciones, se vertieron 200 µl de cada una de ellas, en placas con el medio de selección elegido TYRF (Tryptona-Extracto de levadura-Rojo de Fenol) adicionado con gentamicina (10 µg/ml) y kanamicina (20 µg/ml), y se distribuyeron uniformemente con ayuda de una varilla de vidrio. Se realizó esto con los µl restantes de la conjugación. Se dispusieron las placas expuestas dentro de la campana de flujo laminar, con la finalidad de que el líquido distribuido en ellas se secase por completo para después incubarlas a 30°C por un periodo de 48 h. Cabe mencionar que, el proceso descrito para la cosecha de las transconjugantes, también se realizó para las cepas control.

3.1.4.3.2. Selección, contraselección y almacenamiento de las transconjugantes.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las transconjugantes, estas fueron seleccionadas mediante la técnica de “picado de colonia” y resembradas en placas cuadriculadas y enumeradas con medio selectivo TYRF-Km-Gm (20 µg/ml-10 µg/ml), esto se hizo con el objetivo de corroborar que fueran transconjugantes y de que no estuvieran contaminadas. Además, al mismo tiempo, se contraseleccionaron cultivándose en placas (con la misma técnica) con medio TY-Ap (Tryptona-Extracto de levadura-Ampicilina (100 µg/ml)). Es decir, se eligieron las transconjugantes que fueron capaces de crecer en el medio de selección TYRF pero que no mostraron ningún crecimiento en las placas con medio TY-Ap.

Una vez seleccionadas las transconjugantes de interés, se confirmó que no estuvieran contaminadas, y se procedió a cultivarlas en tubos eppendorf con 1 ml de medio TY-Km-Gm (Tryptona-Kanamicina (20 µg/ml)-Gentamicina (10 µg/ml)) a 30°C durante 24 h con agitación constante (180 rpm). Posteriormente, fueron resguardadas en medio TY-Km-Gm con glicerol al 20% y preservadas a -80°C, en placas multipozos (96).

3.1.4.4. Evaluación de tolerancia de las transconjugantes bajo estrés salino.

3.1.4.4.1. Prueba cualitativa.

Para este ensayo, se probó el crecimiento de las mutantes en medio TY adicionado con NaCl (100 mM, 200 mM y 300 mM). Se realizó con ayuda de un replicador de acero inoxidable (96 dientes) con el cual se hicieron improntas de todas las cepas mutantes en medio TY con sal. Las mutantes fueron incubadas durante 6 días (Wei et al., 2004) a 30°C, su crecimiento fue observado, registrado y evaluado por periodos de 24 horas; para este proceso, se hizo uso del microscopio estereoscópico. Se utilizó como control el crecimiento de las mismas cepas en medio TY sin NaCl adicionado.



Figura 22. Replicador de 96 dientes (Recuperado de: <https://www.boekelsci.com/microplate-replicators.html>).

3.1.4.4.2. Prueba cuantitativa.

3.1.4.4.3. Curva de crecimiento bacteriano.

Para realizar la prueba cuantitativa de las mutantes sensibles a sal, fue necesario ajustar su crecimiento a la fase exponencial; para esto, primero se determinó una curva de crecimiento bacteriano de la cepa silvestre. Para realizar esta curva, se hizo un preinóculo en 10 ml de medio TY y se incubó a 30°C por 24 h y con agitación constante de 180 rpm; al día siguiente, el cultivo que se incubó el día anterior, se le permitió alcanzar la densidad de 0.5 (600 nm), con este cultivo, se inocularon 50 ml de medio TY fresco hasta lograr la densidad óptica de 0.05 (600 nm); después se incubó a 30°C con agitación constante de 180 rpm. Posteriormente, cada hora se hicieron mediciones de densidad óptica y también se cuantificaron las UFCs mediante la técnica de drop-plate, empleando para ello, diluciones desde 10^0 a 10^{-7} .

Una vez llevada a cabo la prueba cualitativa, las cepas mutantes que presentaron reducción de crecimiento (se consideró la reducción de producción de exopolisacárido como indicador de crecimiento) en medios salinos (200 mM y 300 mM) con respecto a la cepa silvestre (*Ensifer aridi* LEM 451) fueron cuantificadas mediante la técnica de *drop plate*. La cuantificación se hizo con placas con medio TY adicionado con NaCl (200 mM, 300 mM, 400 mM y 450 mM). El ensayo se hizo por triplicado y usando diluciones desde 10^0 hasta 10^{-7} , para cada mutante.

Las cepas mutantes seleccionadas en la prueba cualitativa fueron cultivadas en medio TY a 30 °C por 24 h con agitación constante de 180 rpm. Como se mencionó anteriormente, los cultivos se ajustaron a fase exponencial, una vez logrado esto, se procedió a realizar series de diluciones de 10^0 a 10^{-7} . De cada una de las diluciones se tomó un volumen de 10 µl para colocarlo sobre placas de TY con las diferentes concentraciones de NaCl, anteriormente mencionadas, el ensayo se llevó a cabo por triplicado. Una vez que las gotas fueron colocadas sobre las placas con medios sólidos, se dejaron secar en un ambiente estéril dentro de la campana de flujo laminar; y ya secas totalmente las gotas, se procedió a incubar las cajas a 30°C. El registro y cómputo de las UFC's de este ensayo, se hizo por un periodo de cinco días.

En la siguiente figura, se muestra de manera gráfica la distribución y aplicación de las gotas con su correspondiente dilución usada en la técnica mencionada.

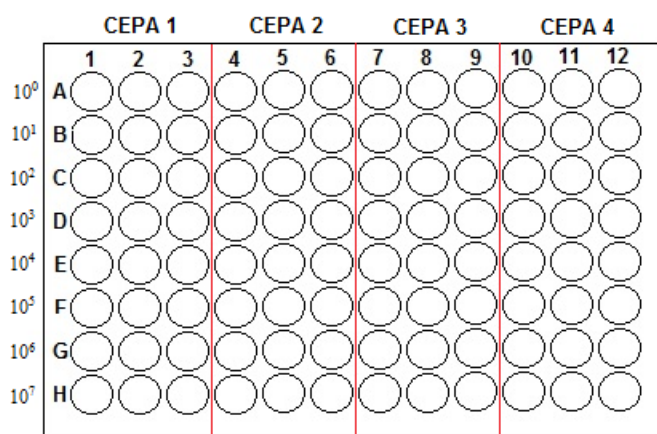


Figura 23. Diagrama representativo de distribución de las mutantes con la técnica drop plate (Elaboración propia).

3.1.4.4.4. Confirmación molecular de las transconjugantes sensibles a sal.

Para ratificar que las cepas sensibles a sal eran efectivamente mutantes por transposición, se determinó por la presencia del cassette de gentamicina que la cepa *E. coli* S17.1 pUT mini-Tn5-Gm transfirió a *Ensifer aridi* LEM451 durante la conjugación

biparental. Para ello, se diseñó un par de primers utilizando el programa *PrimerSelect* de la paquetería DNASTAR Lasergene™, versión 15.3.

Para realizar la amplificación de dicho cassette, se efectuaron reacciones de PCR, el volumen total de reacción fue de 25 µl por cada muestra y su composición fue la siguiente: 1 µl de DNA, 0.75 µl de MgCl₂, 0.5 µl de nucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 µl buffer de enzima, 18.12 µl de H₂O, 0.12 µl enzima Taq polimerasa (Biorad™) y 1 µl de cada primer (forward y reverse). El perfil de temperatura para realizar la PCR de esta amplificación, se muestra a continuación:

5' 96°C	
30" 94°C	} 30 ciclos
30" 57°C	
1' 72°C	
4' 72°C	
∞ 20°C	

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (BET) con una concentración de 0.5 mg/mL. Las bandas correspondientes a los productos de la amplificación fueron escindidos del gel, fueron purificados utilizando el Qiaquick™ PCR purification kit (Qiagen™), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR, finalmente fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinfl*, con la finalidad de comprobar que la región amplificada durante la PCR, efectivamente se tratara del fragmento del cassette de gentamicina para el cual se había diseñado el par de cebadores. La mezcla de la digestión se compuso de 2 µl de la enzima de restricción, 2 µl de buffer de enzima y 10 µl de producto de PCR.

Se utilizó como control al plásmido pUT-mini-Tn5-Gm, por lo que se hizo la extracción del mismo a partir de la cepa donadora *E. coli* S17.1 pUT-mini-Tn5-Gm mediante el uso del kit Pure link quick plasmid™ de Invitrogen™, siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.4.5. Caracterización genotípica de las mutantes sensibles a sal.

A las cepas mutantes que fueron seleccionadas de la prueba cuantitativa se les efectuó un Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA) y un Análisis de restricción de fragmentos de longitud polimórfica (RFLP) del gen *rpoB*, para corroborar que se trataban de mutantes de la cepa *Ensifer aridi* LEM451, y así descartar una posible contaminación.

3.1.4.5.1. Amplificación del gen 16S rRNA y Análisis de Restricción de DNA Ribosomal Amplificado (ARDRA).

Para la extracción del ADN de las mutantes de interés, se siguió el protocolo mencionado anteriormente para el mismo fin. El volumen total de reacción de PCR fue de 25 µl por cada muestra y su composición fue la siguiente: 1 µl de ADN, 0.75 µl de MgCl₂, 0.5 µl de nucleótidos trifosfato (dNTPs), 2.5 µl buffer de enzima, 18.12 µl de H₂O, 0.12 µl enzima Taq polimerasa (Biorad™) y 1 µl de cada primer (forward y reverse). El juego de cebadores que se utilizó para este ensayo fueron UN27F (5'-TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y UN1392R (5'-CAG GGG CGG TGT GTA CA-3') (Biodiversa Inc., México), mientras que el perfil de temperatura para realizar la PCR de esta amplificación, se muestra a continuación:

3' 95°C	}	26 ciclos
30" 94°C		
45" 57°C		
1'10" 72°C		
10' 72°C		
∞ 20°C		

Los productos de la amplificación fueron evidenciados y analizados mediante el corrimiento de los mismos en geles de agarosa al 1%, teñidos con GelRed® y revelados posteriormente sobre un transiluminador de luz UV. Una vez obtenido los productos de PCR del gen *16SrRNA*, estos se digirieron con las enzimas de restricción *AluI* y *HinfI* durante 3 h a 30°C; para ello se preparó la mezcla de digestión compuesta por 2 µl de la enzima de

restricción (correspondiente), 2 µl de buffer de enzima y 10 µl de producto de PCR. Los fragmentos fueron revelados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con GelRed® y visualizados posteriormente sobre un transiluminador de luz UV.

3.1.4.5.2. Amplificación del gen *rpoB* y Análisis de Restricción de Fragmentos de Longitud Polimórfica (RFLP).

Para efectuar la extracción del ADN de las mutantes seleccionadas, se siguió el protocolo mencionado anteriormente, del mismo modo, el volumen total de la reacción de PCR se hizo como en el apartado anterior, pero usando el par de cebadores para amplificar la subunidad β del gen de la RNA polimerasa: *rpoB*83F (5'-CCT SAT CGA GGT TCA CAG AAG GC-3') y *rpoB*1061R (5'-AGC GTG TTG CGG ATA TAG GCG-3') (Martens et al., 2008). Las condiciones de amplificación se muestran a continuación:

5' 96°C		
30" 94°C	}	30 ciclos
30" 59°C		
1' 72°C		
5' 72°C		
∞ 20°C		

Después de haber obtenido el producto de PCR del gen *rpoB*, éste fue digerido utilizando la mezcla de digestión descrita anteriormente, con las mismas enzimas y condiciones de incubación que se emplearon para realizar el ARDRA.

Las enzimas empleadas para los ensayos ARDRA y RFLP, son de corte frecuente y reconocen los sitios siguientes:

Tabla 6. Enzimas de restricción utilizadas para realizar el ARDRA y el RFLP y sus respectivos sitios de corte (elaboración propia).

ENZIMA	SITIO DE CORTE
<i>AluI</i>	5'-AG*CT-3'
<i>HinfI</i>	5'-G*ANTC-3'

Tanto los productos de amplificación y digestión del gen *rpoB*, fueron evidenciados y analizados mediante el corrimiento de los mismos en geles de agarosa al 1% (para productos de PCR) y al 1.5% (productos de digestión), teñidos con GelRed® y revelados posteriormente sobre un transiluminador de luz UV.

3.1.5. Identificación y análisis de la región genómica interrumpida en las mutantes sensibles a sal.

Una vez obtenidas las transconjugantes e identificadas aquellas mutantes, que, debido a esa mutación se mostraron sensibles ante el estrés salino, se procedió a identificar la región genómica que había sido interrumpida por la inserción del transposón contenido en el pUT miniTn-5-Gm que la cepa *E. coli* S17.1 transfirió a la cepa *Ensifer aridi* LEM451. Para llevar a cabo este ensayo se empleó la técnica de PCR con primers arbitrarios (AP-PCR); con ella, se localizó el sitio de inserción del transposón dentro el genoma de la cepa mutante (Das et al., 2005).

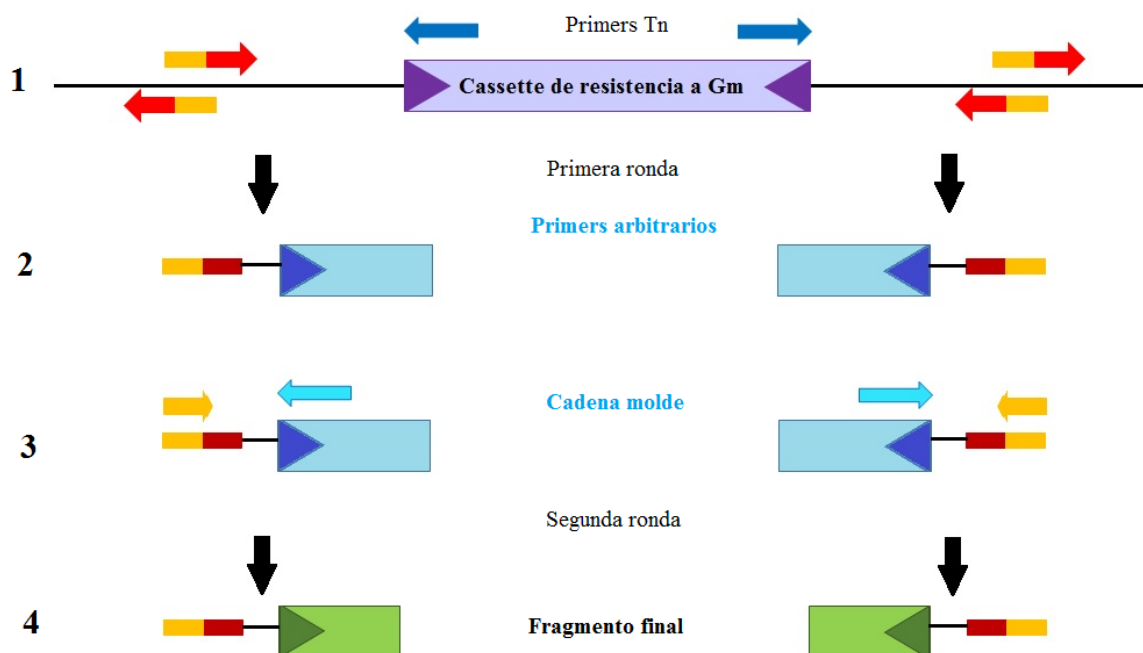


Figura 24. Fundamento de la AP-PCR. (Adaptado de Das et al., 2005).

La extracción de ADN de las mutantes, se hizo como se mencionó la extracción de ADN de la cepa silvestre. Los primers utilizados en la AP-PCR fueron descritos por Duque et al., (2007). Este proceso se realizó en dos rondas, en la primera de ellas, se utilizó un mix de reacción con un volumen final de 25 µl, este contenía 1 µl de ADN, 0.75 µl de MgCl₂, 0.5 µl de deoxynucleótidos trifosfato (dNTP's), 2.5 µl buffer de enzima, 17.12 µl de H₂O, 0.12 µl enzima Taq. Polimerasa (Biorad™), 1 µl de primer Tn5Ext, 0.5 µl de primer CEKG2B y 0.5 µl de primer Arb1A. Para la segunda ronda, se utilizó un mix de reacción similar al de la primera ronda, con la diferencia de que esta segunda, el ADN que se usó como molde, fue el producto de PCR de la primera ronda (1 µl) y los primers fueron sustituidos por los cebadores Arb2A y Tn5Int (1 µl de cada uno).

La secuencia de los cebadores de la AP-PCR de este ensayo, así como las condiciones de temperaturas, se muestran a continuación:

Tabla 7. Secuencias de los primers utilizados en la AP-PCR de las mutantes sensibles a NaCl (elaboración propia).

PRIMER	SECUENCIA
Arb1A	5'-CCA CGC GTC GAC TAG TAC NNN NNN NNN N-3'
Tn5Ext	5'-CTT TAT TGA TTC CAT TTT TAC ACT-3'
CEKG2B	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACN NNN NNN N-3'
Arb2A	5'-CCA CGC GTC GAC TAG TAC-3'
Tn5Int	5'-GAC CCT GCA GGC ATG CAA GCT TCG GC-3'

3.1.5.1. Secuenciación y análisis de los productos de la AP-PCR de las mutantes sensibles a sal.

Los amplificados obtenidos de la AP-PCR, fueron revelados en gel de agarosa y escindido las bandas, finalmente los productos fueron purificados utilizando el Qiaquick™ PCR purification kit (Qiagen™), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para finalmente, enviar dichos purificados al laboratorio de servicios genómicos “Langebio” del CINVESTAV, en Irapuato, Guanajuato, para su secuenciación.

Una vez obtenidas las secuencias, se corroboró su intensidad y calidad de señal en el cromatograma, para ello se utilizó el programa Bioedit versión 7.0.8, además, en esta etapa del proyecto, se hizo la búsqueda de una pequeña región de la terminación “O” del transposón incluido en el pUT mini-Tn-5-Gm dentro de las secuencias (GAC CCT GCA GGC ATG CAA GCT TCG GC).

Después, con las secuencias ya analizadas y editadas, fueron comparadas con las depositadas en la base de datos de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en el sitio NCBI (National Center for Bioinformation), con el objetivo de encontrar aquellas secuencias que fueran análogas y con ello determinar la región del genoma en la que fue insertado el transposón en la conjugación. Oportuna y amablemente, en este punto del proyecto, el doctor Antoine Le Quéré, nos proporcionó el genoma completo secuenciado de la cepa *Ensifer aridi* LEM451 en formato fasta y con ello también se hizo una búsqueda y análisis de las secuencias obtenidas por AP-PCR, dentro del genoma de esta cepa.

3.1.6. Evaluación de la interacción de las mutantes (sensibles a salinidad) de *Ensifer aridi* LEM451, con plantas de *Phaseolus vulgaris*.

3.1.6.1. Ensayo de germinación en condiciones de estrés salino.

Para determinar la variedad de *Phaseolus vulgaris* con la que se iba a llevar a cabo el ensayo en planta así como la concentración de NaCl límite a la que se iban a someter a las plántulas de frijol, primero se realizó una prueba de tolerancia a la salinidad desde la germinación de la semilla, estos dos factores resultaban importantes ya que, se ha reportado en diversos trabajos, que la salinidad no solo afecta directamente a los diferentes estadios de una planta, sino que, en el caso de *Phaseolus vulgaris*, la tolerancia a la misma, es diferente entre variedades de frijol (Asfaw, 2011; Campos et al., 2011). Las variedades elegidas para este ensayo fueron: vaquita, flor de mayo, negro Guanajuato (semilla certificada), mantequilla, Morelos (alubia).

Cabe mencionar y agradecer al D. C. Jorge Acosta Gallegos, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), quien muy amablemente nos donó las semillas certificadas de la variedad negro Guanajuato.

3.1.6.1.1. Selección, desinfección y germinación de semillas.

Se seleccionaron 144 semillas de cada una de las variedades de frijol, se procuró que las semillas elegidas fueran aproximadamente del mismo tamaño (según su variedad), que no se evidenciara la presencia de hongos y sin daños mecánicos visibles. La desinfección de las semillas fue igual para todas las variedades, y se hizo de la siguiente manera: primero, se lavaron con solución jabonosa (detergente líquido) y se enjuagaron hasta eliminar los residuos de detergente (aproximadamente cinco enjuagues con agua destilada estéril). Se les retiró el exceso de líquido y después fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio comercial, al 15% durante tres minutos, se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril y se escurrieron para eliminarles el exceso de líquido, nuevamente.

Después de desinfectar las semillas, éstas fueron colocadas en placas Petri cuadradas sobre agar agua (0.7 %), adicionadas con diferentes concentraciones de NaCl: 0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131, 166.6 y 200 mM. Se colocaron 12 semillas de una misma variedad por concentración. Finalmente, las semillas fueron incubadas a 28°C durante 5 días (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996; Kader, 2005). El registro se hizo, antes, durante y hasta el final de la germinación. Se evaluó el porcentaje de germinación, velocidad media de germinación, tiempo promedio de germinación, así como la longitud de la radícula y de tallo.

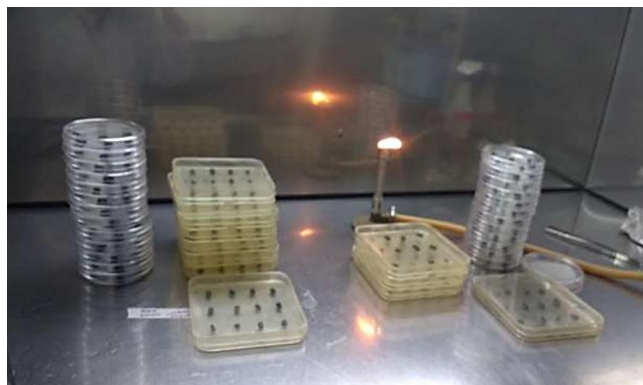


Figura 25. Ensayo de germinación en curso.

3.1.6.2. Ensayo de nodulación.

La afectación de la interacción rizobia-leguminosa, es principalmente alterada por el estrés salino es, lo cual, se hace evidente por la ausencia de nódulos en los pelos radiculares de la planta. Así que, en este experimento, se quiso precisar el efecto de la salinidad en la interacción de la mutante sensible a sal de la cepa silvestre *Ensifer aridi* LEM451 y plantas de frijol común.

3.1.6.2.1. Selección, desinfección y germinación de semillas.

Al llevar a cabo este procedimiento, ya se había determinado, mediante el ensayo anterior qué variedad de frijol y en qué concentración de NaCl se iba a llevar a cabo la prueba de nodulación. Las semillas de la variedad elegida, llevaron el mismo proceso de selección y desinfección que en el apartado anterior de germinación de semillas. En esta ocasión se utilizaron 72 semillas de *Phaseolus vulgaris*, pero en este caso, la mitad de semillas se germinaron en placas con agar agua al 0.7 % y la otra mitad, en placas con agar agua al 0.7 % adicionadas con la concentración de NaCl determinada en el ensayo de germinación.

El ensayo se estructuró de la siguiente manera:

Tabla 8. Tratamientos utilizados para el diseño experimental del ensayo invernadero en tubos (elaboración propia).

	CLAVE	TRATAMIENTO	CANTIDAD
SIN NaCl	CSIN	Sin inocular (control negativo)	12 semillas
	451SIN	Inoculada con <i>Ensifer aridi</i> LEM451 (control positivo)	12 semillas
	MutSIN	Inoculada con mutante sensible	12 semillas
CON NaCl	CNaCl	Sin inocular (control negativo)	12 semillas
	451NaCl	Inoculada con <i>Ensifer aridi</i> LEM451 (control positivo)	12 semillas
	MutNaCl	Inoculada con mutante sensible	12 semillas

Para realizar este procedimiento, se utilizaron tubos de ensayo de vidrio de 200x25 mm, 36 de los cuales se les agregó 75 ml de medio Jensen libre de nitrógeno y a los restantes, 75 ml de medio Jensen libre de nitrógeno adicionado con NaCl en la concentración que resultó elegida en el ensayo de nodulación. Todo material y reactivos se utilizaron en condiciones estériles. Después de germinadas las semillas de frijol, cada una de ellas fue trasplantada a cada uno de los tubos con la solución indicada. Los tubos fueron tapados con papel aluminio, el cual solo tenía un pequeño orificio por el cual se introdujeron las radículas de las semillas germinadas, para que de esta manera, únicamente la raíz quedara en contacto directo con la solución del tubo. Asimismo, las gradillas que soportaban los tubos fueron forradas con una cubierta plástica de color negro, con el objetivo de impedir que la luz incidiera sobre las raíces y esto contribuyera a producir más estrés sobre las plantas e interfiriera con los resultados.

3.1.6.2.2. Inoculación, mantenimiento y evaluación de plantas.

Para la preparación de los cultivos con los cuales fueron inoculadas las leguminosas, primero, las cepas silvestre y mutante fueron sembradas en placas con medio TY y TY con NaCl en la concentración designada en el ensayo de germinación, se incubaron durante 24h a 30°C Posteriormente, las colonias de rizobia fueron disueltas en medio TY (líquido) y TY adicionado con la concentración de NaCl que se usó anteriormente en la siembra en placa; con agitación constante e incubadas a 30°C hasta que el crecimiento bacteriano de los cultivos tuviera una la densidad óptica de 0.8 (1×10^8 UFC). Con un mililitro de estos cultivos (de cada cepa), se inocularon cada una de las semillas. Finalmente, las plantas fueron incubadas a 20°C con un ciclo de luz/obscuridad de 16 h y 8 h, respectivamente. (Knight et al., 1986), y el nivel de líquido en los tubos fue revisado diariamente a lo largo de aproximadamente 30 días con la finalidad de resurtir el líquido que fuera necesario en cada caso.

Los parámetros que se evaluaron de las plantas fueron longitud, peso fresco de tallo y raíz; y número de nódulos.

CAPÍTULO 4

4.1. Resultados y discusión

4.1.1. Amplificación, concatenación y análisis de secuencias multilocus (MLSA) de los genes *16SsRNA*, *atpD*, *dnaK*, *glnA*, *gyrB*, *recA*, *rpoB*, *thrC*.

La longitud de los fragmentos amplificados para cada gen, fueron: *atpD*, 500 pb; *dnaK*, 900 pb; *glnA*, *glnII*, 500 pb; 600 pb; *gyrB*, 700 pb; *recA*, 500 pb; *rpoB*, 900 pb; *16SsRNA*, 1500 pb y *thrC*, 600 pb. Éstos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, posteriormente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y revelados bajo luz UV. El tamaño de dichos fragmentos se determinó usando el marcador molecular de 1Kb GeneRuler™ (Fermentas™).

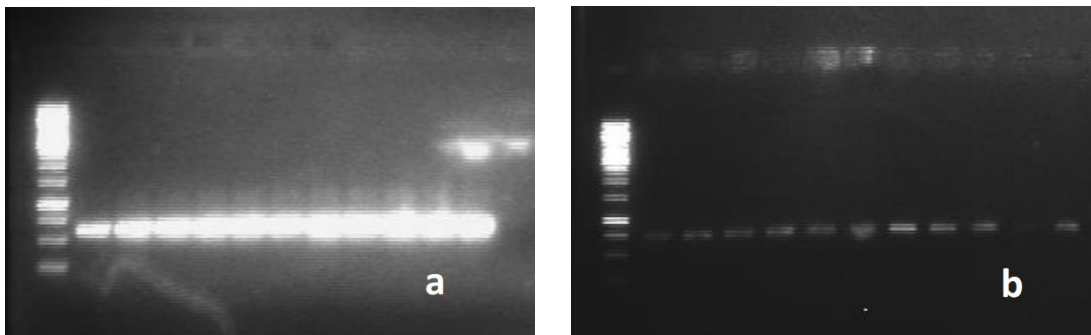


Figura 26. Visualización de los fragmentos de los genes *atpD* (a) y *dnaK* (b).

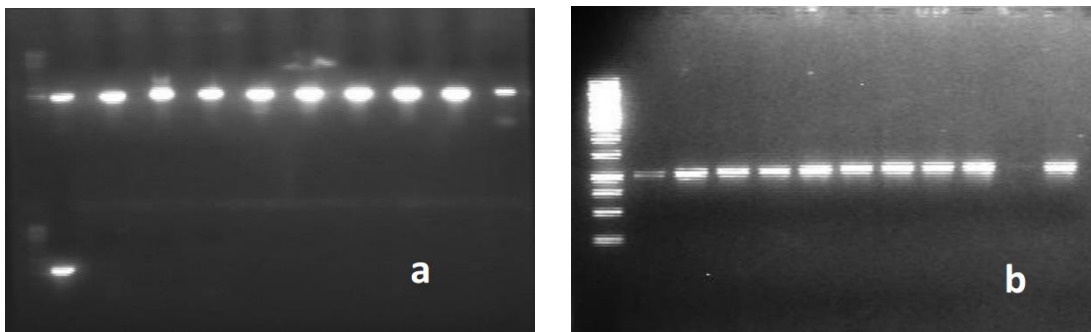


Figura 27. Visualización de los fragmentos de los genes *glnII* (a) y *gyrB* (b).

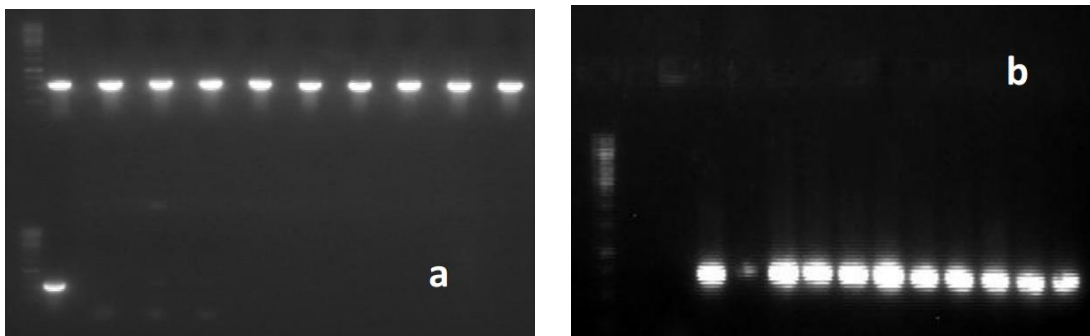


Figura 28. Visualización de los fragmentos de los genes *recA* (a) y *rpoB* (b).

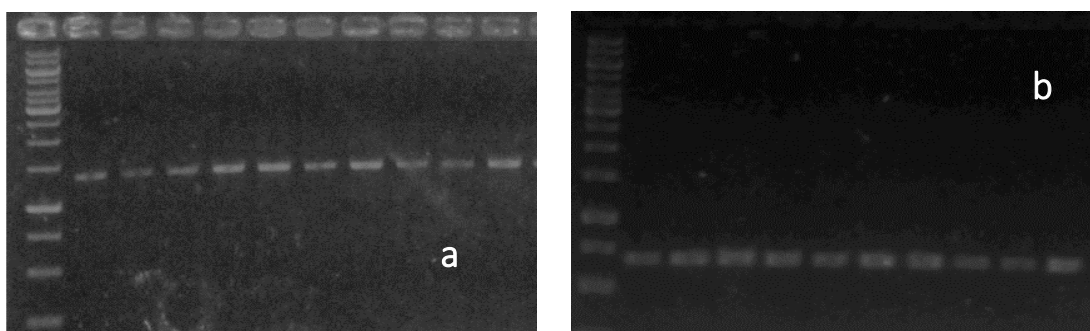


Figura 29. Visualización de los fragmentos de los genes *16SsRNA* (a) y *thrC* (b).

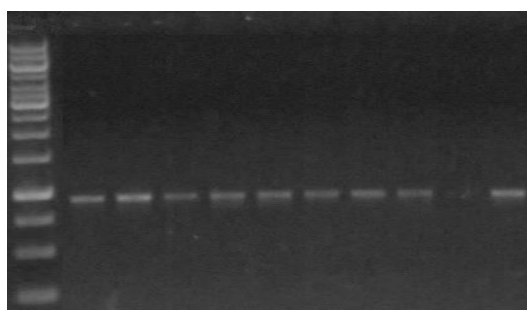


Figura 30. Visualización de los fragmentos del gen *glnA*.

Las secuencias fueron corroboradas comparándolas con sus correspondientes cromatogramas; fueron empalmadas las secuencias forward y reverse para obtener una única secuencia, la cual se comparó mediante un alineamiento BLAST, con las secuencias que se encuentran en la base de datos del NCBI.

Aunque se hicieron análisis individuales para cada gen, la finalidad de éste fue realizar la concatenación de los fragmentos de los nueve genes, de esta manera, se unifica la

Como se observa en el árbol filogenético concatenado de la figura 31, el grupo de las cepas de *Ensifer aridi* mexicanas, se mantienen agrupadas en un taxón bien definido y separado del resto de cepas de *Ensifer*; excepto en el caso de la cepa LEM456, ya que esta fue designada como perteneciente a la especie *meliloti*.

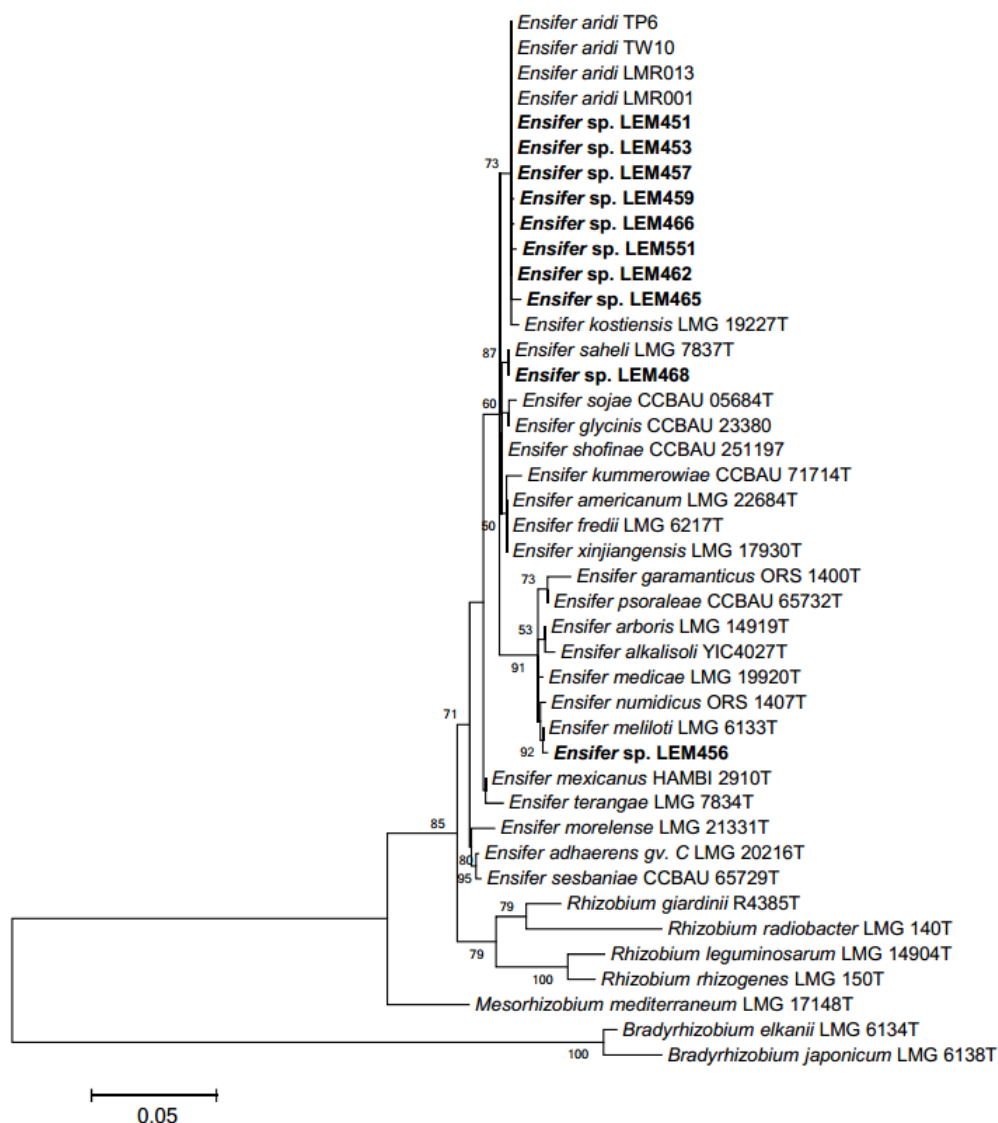


Figura 32. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood del fragmento del gen 16SsRNA, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de *Ensifer* aisladas de nódulos de *Phaseolus filiformis* (en negritas). El análisis se basó en la alineación de 1229 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 5% de sustitución por sitio.

El árbol de la figura 32, mostró que los aislados de *P. filiformis* pertenecen al género *Ensifer* y se agruparon en tres clusters. La mayor parte de las secuencias parciales del gen

16SsRNA mostraron similitudes elevadas con respecto a las de las cepas *Ensifer* que fueron recuperadas de los desiertos de Thar y de Merzouga que describieron Le-Quéré y colaboradores (2017); y para las cuales se propuso nombrarlas como *Ensifer aridi*. Incluso, en la base de datos genómicos de este estudio, se incluyeron a las cepas LEM451 y LEM457.

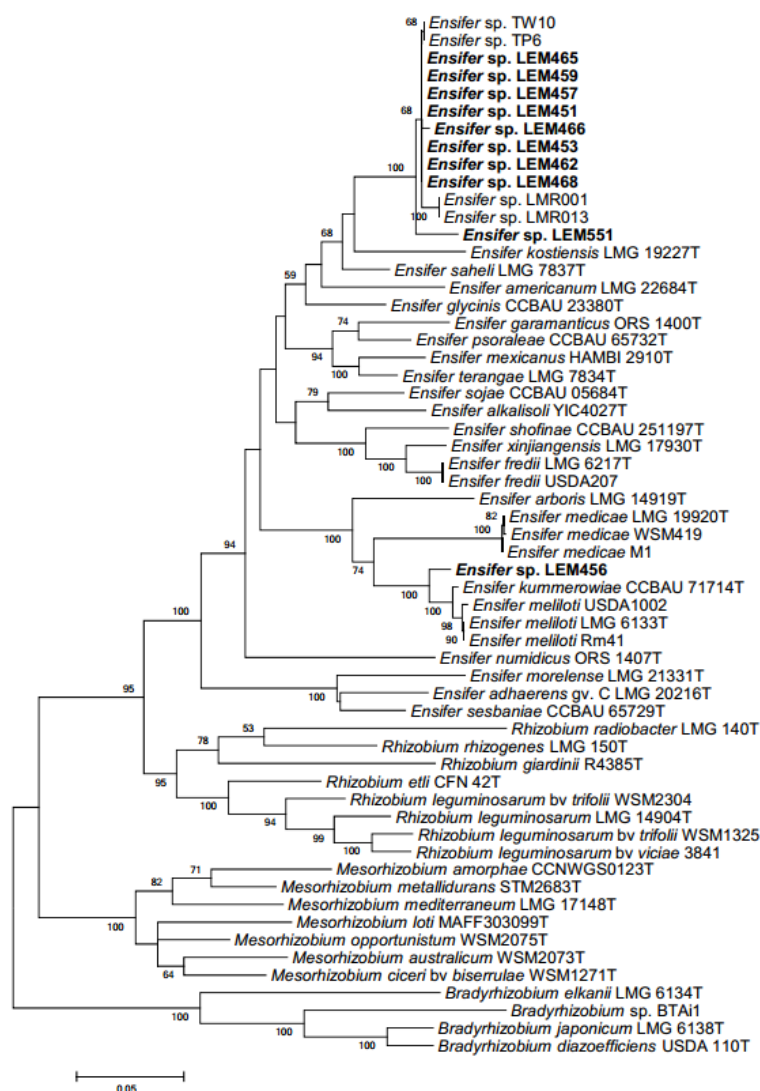


Figura 33. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood de los fragmentos de los genes *atpD-recA-glnII*, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de *Ensifer* aisladas de nódulos de *Phaseolus filiformis* (en negritas) y las cepas de referencia. El análisis se basó en la alineación de 1245 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 5% de sustitución por sitio.

Con la finalidad de resolver mejor la posición de las especies de *Ensifer* dentro de la clasificación taxonómica de las mismas, se construyó un árbol filogenético con las secuencias

de tres genes, *atpD*, *recA* y *glnII* (figura 33). Se eligieron estos genes ya que se encuentran en la mayoría de las especies de *Ensifer*. Además, de *atpD* y *recA*, se ha reportado que mantienen congruencia con el del gen *16SsRNA* (Gaunt et al., 2001). En el caso de la cepa *LEM468*, aunque en la filogenia obtenida a partir del análisis del gen *16SsRNA* está próximo a *E. saheli*, en el caso de este último árbol, se aleja un poco de ella y se mantiene en el clado de las cepas de *E. aridi*.

Para el caso de la cepa *LEM456*, igualmente se mantienen alejada del resto del grupo de *Ensifer aridi* y se coloca dentro del grupo de *E. meliloti*.

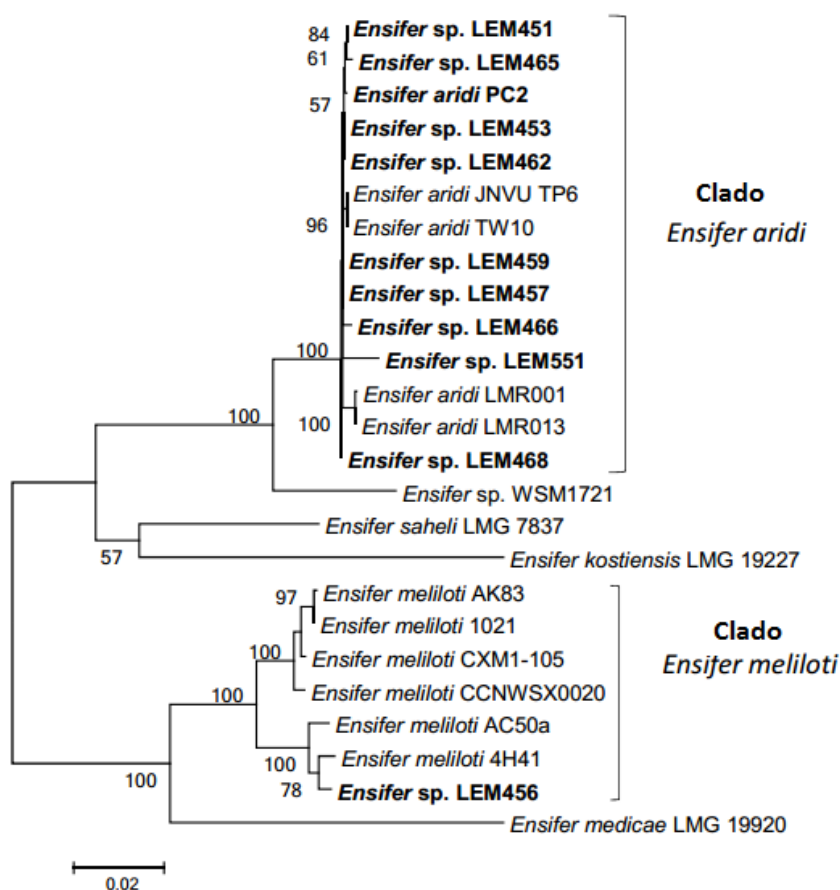


Figura 34. Árbol filogenético generado por el algoritmo Maximum Likelihood de los fragmentos de los genes *atpD*-*glnII*-*recA*-*gyrB*-*rpoB*-*thrC*, que muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de *Ensifer* aisladas de nódulos de *Phaseolus filiformis* (en negritas) y las cepas de referencia. El análisis se basó en la alineación de 3213 nucleótidos. La significancia de cada rama se indica mediante el valor del bootstrap de 500 repeticiones (solo se indican valores superiores al 50%). Barra de escala indica 2% de sustitución por sitio.

Asimismo, se generó un árbol filogenético partiendo del alineamiento obtenido de la concatenación de seis genes (*recA*, *atpD*, *gyrB*, *rpoB*, *glnII* y *thrC*) de las cepas de estudio, en comparación con las cepas de *Ensifer* más cercanas. Se observó que para la rama de este grupo de cepas, posee un valor de bootstrap de 100% (comparten identidad del 98%.9 al 99.9%) y, que en el caso de la cepa LEM456, se mantiene dentro del clado de *E. meliloti* (comparten identidad del 97.5% al 99.3%).

4.1.2. Amplificación y análisis filogenético de los genes *nodC* (N-acetil-glucosaminil-transferasa) y *nifH* (dinitrogenasa reductasa).

Para el gen *nodC* se logró amplificar un fragmento de 900 pb, mientras que para el gen *nifH*, se amplificó un fragmento de 700 pb. El tamaño de dichos fragmentos se determinó usando el marcador molecular de 1Kb GeneRuler™ (Fermentas™), como se muestra en las imágenes de la figura 35.

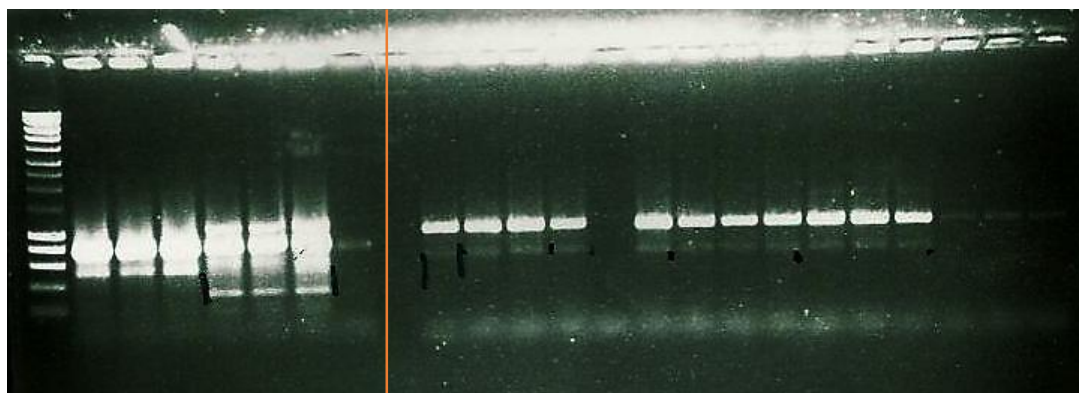


Figura 35. Fotografía que muestra algunos de los productos de la amplificación y purificación de los fragmentos de los genes *nodC* (derecha) y *nifH* (izquierda).

Una vez obtenidos los cromatogramas (figura 27), las secuencias *forward* y *reverse* fueron empalmadas y finalmente se obtuvo una sola secuencia de cada amplificación para cada cepa de *Ensifer aridi* analizada.

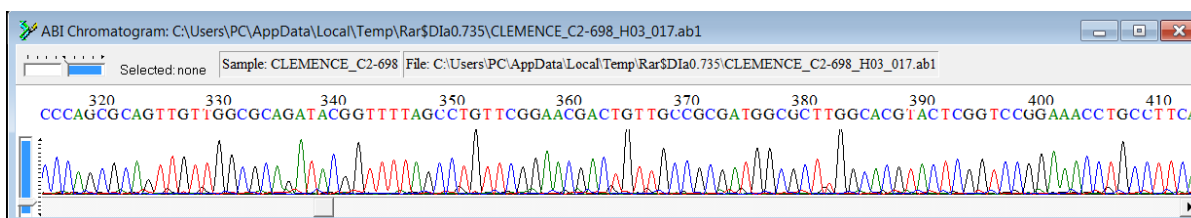


Figura 36. Cromatograma del fragmento de *nodC* de la cepa *Ensifer aridi* LEM453 (secuencia reverse).

Para realizar el análisis filogenético de las secuencias, se hizo uso de diferentes programas computacionales y que fueron mencionados en el apartado de metodología. Así mismo, para hacer el análisis comparativo de las cepas de *Ensifer aridi* (*Phaseolus filiformis*), se utilizaron otras secuencias (referencia) que se encuentran en la base de datos del NCBI y cuyo número de acceso se muestran en el anexo 2.

Como puede observarse en el árbol siguiente, el clúster de las cepas de *Ensifer aridi* LEM se encuentran vecinas a las cepas de *Ensifer* sp. (CHU2, STA2, STA1, CHU1 y ATQ1). Estas cepas fueron aisladas de *Vachellia macracantha* (*Acacia macracantha*), de suelos de distintas regiones de Perú, con valores de pH y salinidad entre neutro y ligeramente alcalinos y salinos (Cordero et al., 2016). Resalta que las zonas de las que fueron aisladas las cepas peruanas, son regiones cálidas, semiáridas y desérticas; similares a aquellas de donde fueron aisladas las cepas de *Ensifer aridi* LEM. Así mismo, las cepas de *Ensifer* sp. (SCAU213 y SCAU191) también fueron aisladas de plantas (*Leucaena leucocephala*) que se cosecharon en zonas áridas y desérticas de la región de Panxi, Sichuan en China (Xu et al., 2013).

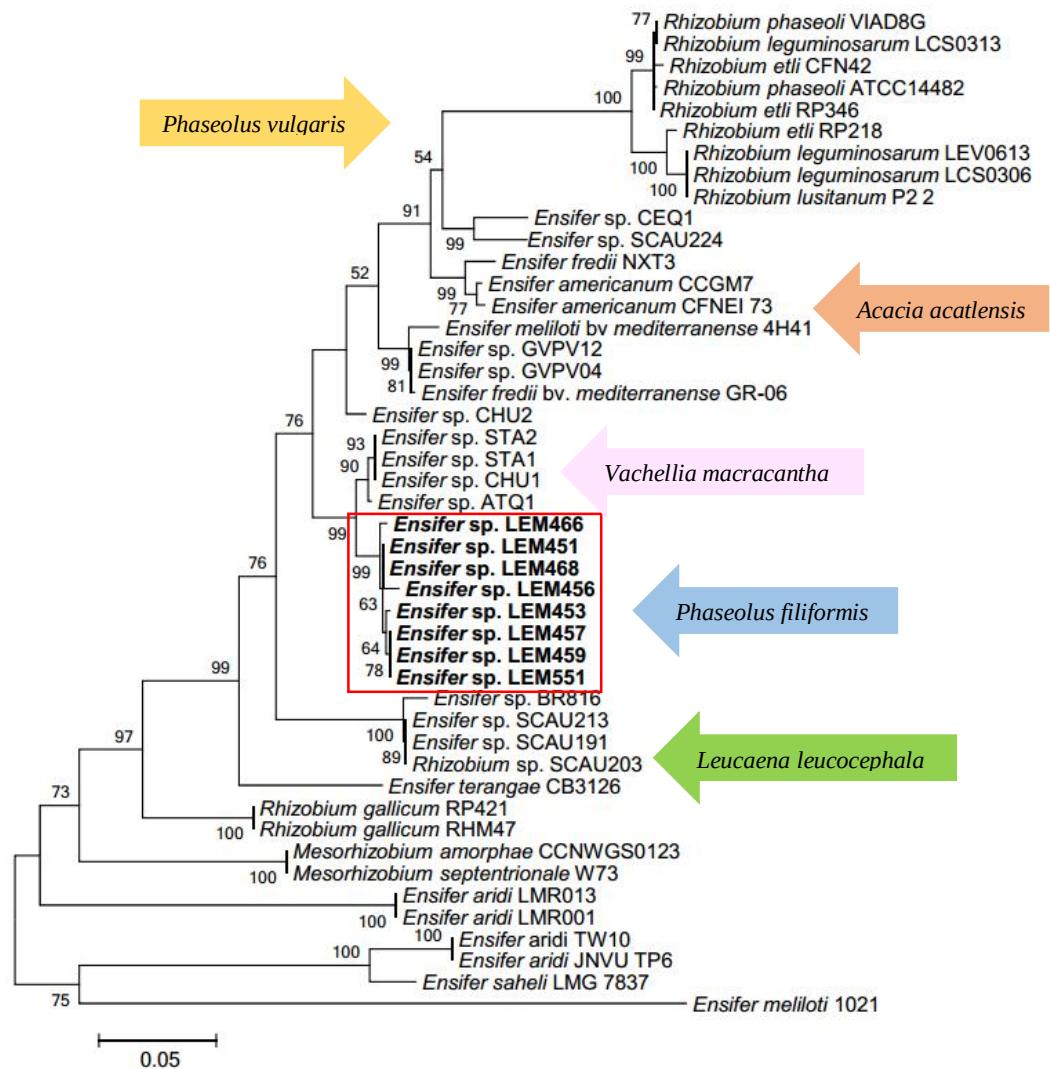


Figura 37. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo Maximum likelihood, basado en las secuencias parciales del gen *nodC*. Muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de *Ensifer aridi* aisladas de *Phaseolus filiformis* en Baja California sur (recuadro en negritas) y otras cepas seleccionadas de la base de datos del NCBI. El análisis se basó en el alineamiento de 722 nucleótidos. En las bases de las ramas se muestran los valores de bootstrap (solo se muestran los valores mayores de 50%), el cual se realizó con un valor de 500 réplicas.

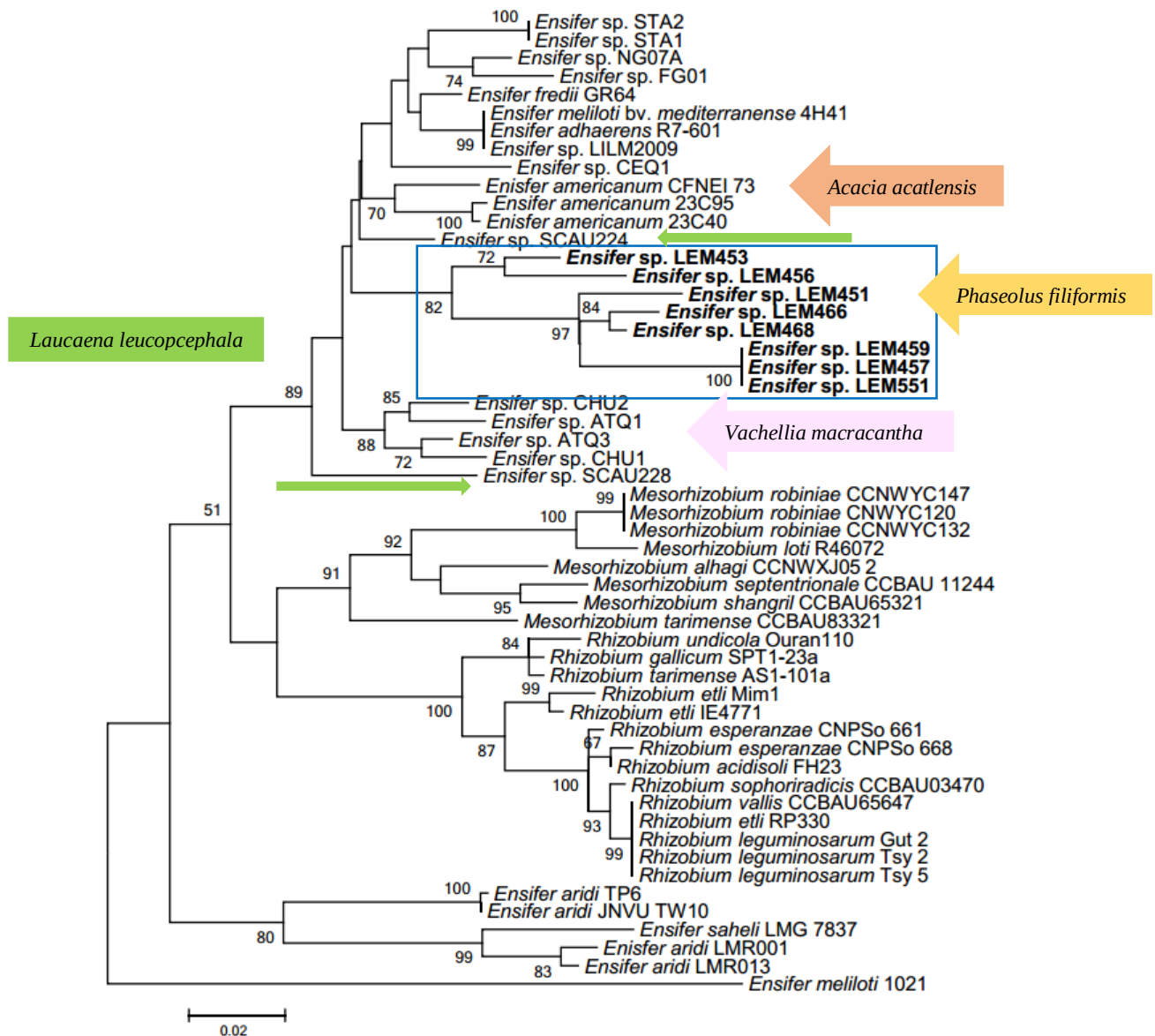


Figura 29. Árbol filogenético generado mediante el algoritmo Maximum likelihood, basado en las secuencias parciales del gen *nifH*. Muestra las relaciones evolutivas entre las cepas de *Ensifer aridi* aisladas de *Phaseolus filiformis* en Baja California sur (recuadro en negritas) y otras cepas seleccionadas de la base de datos del NCBI. El análisis se basó en el alineamiento de 652 nucleótidos. En las bases de las ramas se muestran los valores de bootstrap (solo se muestran los valores mayores de 50%), el cual se realizó con un valor de 500 réplicas.

Como se observa en el árbol filogenético del gen *nifH*, las cepas de *Ensifer aridi* LEM, de manera similar al árbol del gen *nodC*, se mantienen en la vecindad de cepas de *Ensifer* originarias de plantas que habitualmente se encuentran en zonas geográficas

desérticas y/o semiáridas y/o áridas (Xu et al., 2013; Cordero et al., 2016). Sin embargo, en este caso, también se sitúan próximas cepas de *Ensifer americanum*, las cuales fueron aisladas de nódulos de *Acacia acatlensis*, planta oriunda de suelos de México, también de regiones semiáridas (Toledo et al., 2003). Aunque no comparten el mismo hospedero, estas leguminosas y sus simbioses guardan estrecha relación en sus características de hábitat. Finalmente, la alta similitud entre las secuencias de estos genes simbióticos que se encuentran en la rizobia de *P. filiformis*, sugiere que estos genes tienen el mismo origen y divergieron recientemente.

4.1.3. Rango de hospedero.

De las siete leguminosas probadas para este experimento, únicamente las plantas de *Phaseolus vulgaris* (variedades vaquita y alubia) fueron noduladas por las cepas de *Ensifer aridi*, como se muestra en la siguiente gráfica.

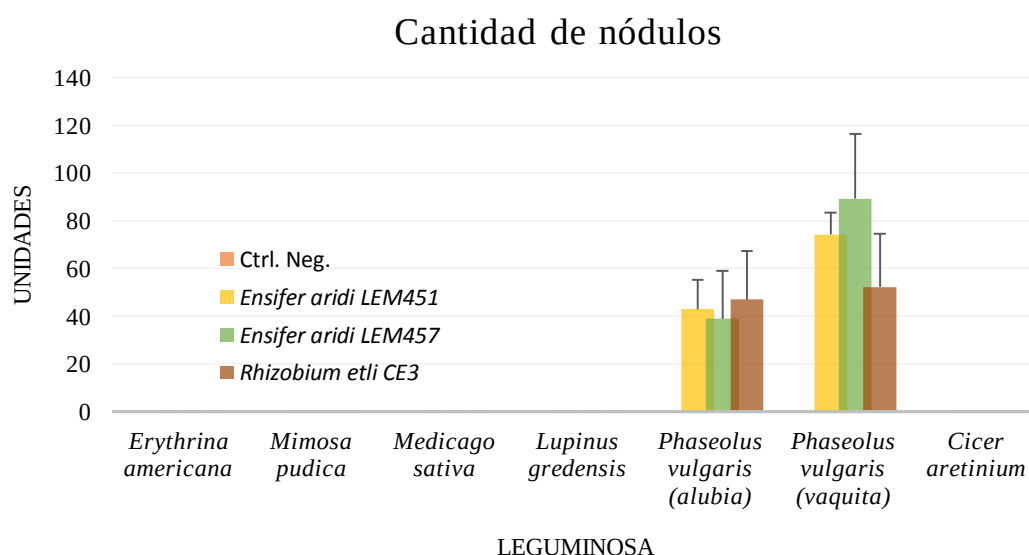


Figura 38. Gráfica en la que se observa la cantidad de nódulos producidos por las cepas de *Ensifer aridi* LEM en diferentes leguminosas probadas.

Es importante resaltar la diferencia que hay entre la cantidad de nódulos de la variedad alubia y vaquita. Aparentemente, existe una mayor afinidad en la interacción *E. aridi* y la

variedad vaquita. La diferencia entre variedades también ha sido reportada con anterioridad (Asfaw, 2011; Campos et al., 2011) y, finalmente, también pudimos comprobarlo.

De trabajos anteriores (Cuéllar-Sánchez, 2011, Rocha, 2012 y Medina, 2014), ya se había reportado que las cepas de *Ensifer aridi* eran capaces de establecer simbiosis con plantas de *Phaseolus vulgaris*, esto a pesar de que son simbiontes naturales de *Phaseolus filiformis*. Sin embargo Cuéllar-Sánchez, reportó que la cepa *E. aridi* LEM457 posee una alta capacidad nodulante en *P.vulgaris*, caso contrario al que Rocha (2012) y Medina (2014) reportaron con sus ensayos a través de la cepa *E. aridi* LEM451, ya que esta mostró tener una capacidad infectiva muy baja.

Los resultados de este ensayo corresponden con los obtenidos del análisis de las secuencias del gen *nodC*, ya que al realizar el análisis de BLASTN, entre las secuencias que presentan homología con las secuencias de *nodC* de *E. aridi* se encuentran simbiontes habituales de *Phaseolus vulgaris*. Se muestra a *Rhizobium etli* (simbionte natural de frijol común en suelos de América), *Rhizobium phaseoli* (algunas cepas de *R. etli* fueron reclasificadas como *R. phaseoli*) y a *Rhizobium leguminosarum* (simbionte de *P. vulgaris*, principalmente en suelos Europeos).

4.1.4. Antibióticos, fuentes de carbono y medios.

Para identificar la cepa que sería la donadora del transposón, primero se realizó un antibiograma y se calculó la CMI para la cepa silvestre.

Tabla 9. CMI de la cepa *Ensifer aridi* LEM451, donde se representa el crecimiento bacteriano con ✓, y el no crecimiento con ✕, a 24 y 48 horas (elaboración propia).

ANTIBIÓTICOS											
24 HORAS						48 HORAS					
Km	Sm	Spc	Tc	Cm	Gm	Km	Sm	Spc	Tc	Cm	Gm
mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
5 ✓	5 ✓	5 ✕	1.7 ✕	1.7 ✓	1.7 ✕	5 ✓	5 ✓	5 ✓	1.7 ✕	1.7 ✓	1.7 ✓
10 ✓	10 ✓	10 ✕	2.5 ✕	2.5 ✓	2.5 ✕	10 ✓	10 ✓	10 ✓	2.5 ✕	2.5 ✓	2.5 ✕
20 ✓	20 ✓	20 ✕	5 ✕	5 ✓	5 ✕	20 ✓	20 ✓	20 ✓	5 ✕	5 ✓	5 ✕
40 ✓	40 ✓	40 ✕	10 ✕	10 ✕	10 ✕	40 ✓	40 ✓	40 ✓	10 ✕	10 ✓	10 ✕
80 ✓	80 ✓	80 ✕	20 ✕	20 ✕	20 ✕	80 ✓	80 ✓	80 ✕	20 ✕	20 ✕	20 ✕
160 ✓	160 ✓	160 ✕	40 ✕	40 ✕	40 ✕	160 ✓	160 ✓	160 ✕	40 ✕	40 ✕	40 ✕
320 ✓	320 ✓	320 ✕	80 ✕	80 ✕	80 ✕	320 ✓	320 ✓	320 ✕	80 ✕	80 ✕	80 ✕

Por la sensibilidad a gentamicina observada en la tabla de la cepa silvestre, se eligió como donadora del transposón a *E. coli* S17.1 pUT-mini-Tn5-Gm. Para esta cepa también se hizo un antibiograma y se calculó la CMI, usando los mismos antibióticos y las mismas concentraciones de los mismos, que se emplearon para la cepa silvestre.

Tabla 10. CMI de la cepa *E. coli* S17.1 pUT-mini-Tn5-Gm, donde se representa el crecimiento bacteriano con ✓, y el no crecimiento con ✕, a 24 y 48 horas (elaboración propia).

ANTIBIÓTICOS											
24 HORAS						48 HORAS					
Km	Sm	Spc	Tc	Cm	Gm	Km	Sm	Spc	Tc	Cm	Gm
mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
5	5	5	1.7	1.7	1.7	5	5	5	1.7	1.7	1.7
10	10	10	2.5	2.5	2.5	10	10	10	2.5	2.5	2.5
20	20	20	5	5	5	20	20	20	5	5	5
40	40	40	10	10	10	40	40	40	10	10	10
80	80	80	20	20	20	80	80	80	20	20	20
160	160	160	40	40	40	160	160	160	40	40	40
320	320	320	80	80	80	320	320	320	80	80	80
✓	✓	✓	✕	✕	✓	✓	✓	✓	✕	✕	✓
✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕	✕

Una vez obtenidos estos resultados, se analizaron diferentes fuentes de carbono y medios de cultivo con la finalidad de determinar, cuál de todos ellos sería el más conveniente para diseñar el medio de selección de las cepas transconjugantes, ya que se buscaba que dicho medio únicamente permitiera el desarrollo de éstas y a la vez inhibiera el crecimiento de las cepas donadora y receptora, de la conjugación biparental. En la siguiente tabla se muestran los resultados de estas pruebas:

Tabla 11. Se indica el resultado del ensayo de las diferentes fuentes y medios de cultivos probados para la elección del medio de selección de las transconjugantes (elaboración propia).

MMK + FUENTE DE CARBONO	Crecimiento bacteriano	
	<i>Ensifer aridi</i> LEM451	<i>E. coli</i> S17.1 pUT mini-Tn5-Gm
Maltosa	Sí	Sí
Succinato	Sí	Sí
Sacarosa	Sí	Sí
Lactosa	Sí	Sí
Malato	Sí	Sí
Glucosa	Sí	Sí
Lactato	Sí	Sí
Acetato	Sí	Sí
Ácido glutámico	Sí	Sí
Ácido málico	Sí	Sí
MEDIOS DE CULTIVO		
Tryptona-Extracto de levadura (TY)	Sí	Sí
Rojo de fenol y Manitol (RFM)	Sí	Sí
Medio mínimo AB (MMAB)	Sí	Sí
Medio M9-Citrato	No	No
Extracto de levadura y Manitol (YMA)	Sí	Sí

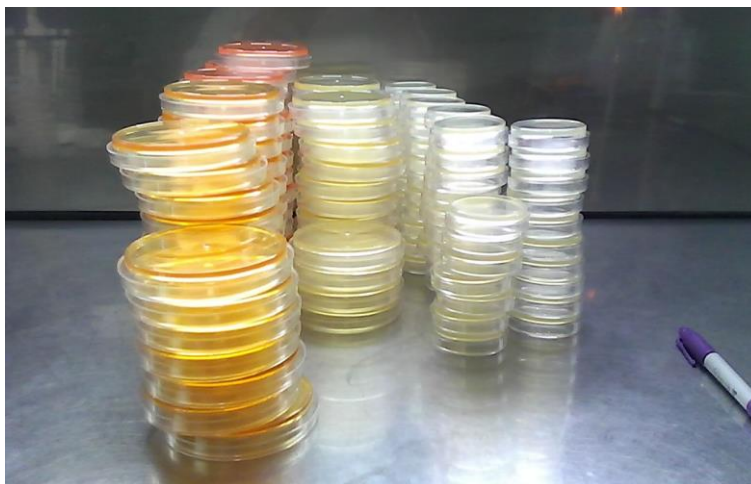


Figura 39. Placas Petri con diferentes medios de cultivo probados para seleccionar el medio más conveniente para la selección de las mutantes.

Finalmente, se eligió como medio de selección al agar TYRF (Tryptona-Extracto de levadura-Rojo de Fenol-Gm (10 µg/ml)-Km (20 µg/ml); rojo de fenol (0.018 g/L). En este medio, las mutantes crecen en 24 h y muestran una coloración tenuamente rosadas. Mientras que las cepas *Ensifer aridi* LEM451 y *E. coli* S17.1, no crecen debido a la presencia de antibióticos que las inhiben.

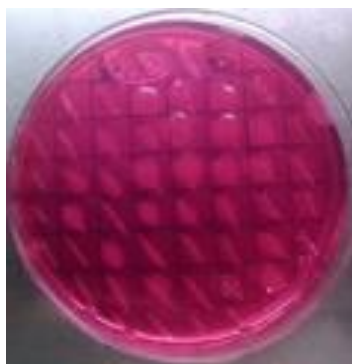


Figura 40. Mutantes de interés seleccionadas en una placa Petri con agar TYRF-Gm-Km.

El plásmido utilizado para la conjugación biparental (pUT-mini-Tn5-Gm), también contiene un cassette de resistencia a ampicilina (Ap), el cual se encuentra en un vector λ pir dependiente, es decir, si la cepa a la que se transfiere el plásmido no produce la proteína λ pir, éste entonces se convierte en un vector suicida. Esta característica nos fue de utilidad porque con ello pudimos asegurar que la transposición solo se había efectuado una sola vez. En el caso de la cepa silvestre, no produce la proteína λ pir, por lo que en una segunda generación de mutantes, el plásmido no será capaz de conservarse en el microorganismo y serán incapaces de sobrevivir en presencia de ampicilina. Así pues, a la par que las mutantes se cultivaron en medio TYRF-Gm-Km, también se sembraron en medio TY-Ap (100 µg/ml). Lo que esperábamos era que las mutantes fueran capaces de crecer en el medio de selección, pero no en el medio de contraselección. Si alguna de ellas hubiese crecido en el medio con Ap, habría entonces sido descartada como candidata a formar parte de la mutateca. En todas las conjugaciones realizadas en este proyecto, ninguna de las cepas mutantes seleccionadas fue capaz de crecer en el medio de contraselección (Figura 34).

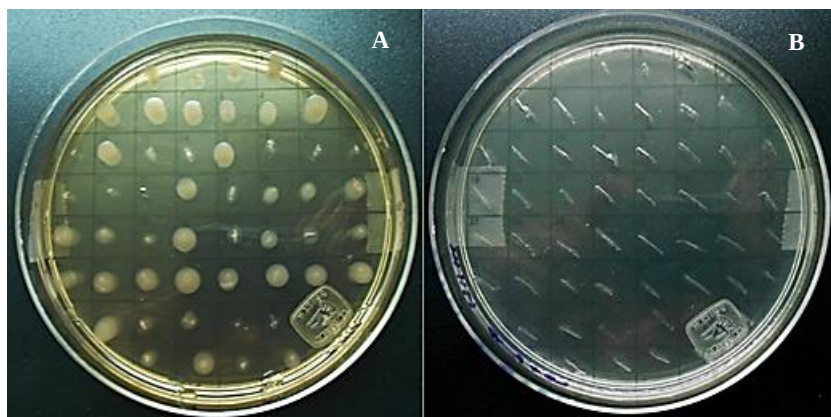


Figura 41. Siembra de mutantes en medio de selección TYRF-Gm-Km (crecen) (A) y de contraselección TY-Ap (no crecen) (B).

De este experimento pudimos concluir que ambos medios (selección y contraselección) fueron altamente eficaces, pues de las decenas de pruebas realizadas, en ninguno de los casos, se aisló una cepa que tuviera un comportamiento anormal a lo esperado.

4.1.5. Conjugación biparental y tasa de mutación.

Después de muchos intentos para llevar a cabo la conjugación bacteriana, finalmente se logró culminar exitosamente, el plásmido empleado en la conjugación (pUT-mini-Tn5-Gm), es práctico en su uso y eficaz, aunque en nuestro modelo, el rendimiento fue relativamente bajo, en los primeros ensayos se obtuvieron alrededor de 25-35 cepas mutantes por ensayo, sin embargo, a lo largo del proyecto, y después de diversos ensayos se logró generar de 50 a 60 cepas mutantes por ensayo. Al hacerse el cálculo de la frecuencia de transposición de este proceso, se determinó que es de 3×10^{-3} .

4.1.6. Construcción de una mutateca (por transposición insercional) de la cepa *Ensifer aridi* LEM451.

Según la ecuación de Clarke y Carbon (1976), para tener el 99% de probabilidad de encontrar un gen con la característica deseada para este proyecto (sensibilidad a salinidad), la cantidad de mutantes que debía conformar la mutateca, debería ser de 30,851 mutantes.

Sin embargo, con la cantidad de mutantes con la que construimos la banca (6400), fue suficiente para poder conseguir mutantes que presentaran el fenotipo deseado para este proyecto, es decir, que se mostraran afectadas en cuanto a su crecimiento bajo estrés salino. Esta banca se encuentra resguardada en placas multipozos, dentro del cepario del Laboratorio de Ecología Molecular del Centro en Investigaciones Microbiológicas-ICUAP-BUAP.

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - a/b)}$$

Donde:

N = Cantidad de mutantes.

P = Probabilidad de encontrar el gen deseado.

a = Tamaño de los fragmentos.

b = Tamaño del genoma (6.7 Mb).



Figura 42. Una de las cajas multipozos en las que se encuentra resguardada la mutateca.

4.1.7. Prueba de tolerancia a la salinidad de las mutantes.

4.1.7.1. Evaluación cualitativa y cuantitativa de las mutantes sensibles a salinidad.

La prueba cualitativa se hizo de manera masiva y por medio de improntas de las cepas mutantes en caldo de cultivo que se encontraban en placas multipozos hacia placas Petri rectangulares mediante el uso de un replicador. Se probaron en medio TY adicionado con 100, 200 y 300 mM de NaCl. Después de la incubación, como se mencionó en el apartado de

metodología, se hizo mediante observaciones bajo el microscopio estereoscópico a 2X y 4X, para examinar con mayor detalle el crecimiento colonial de las mutantes en dichos medios.

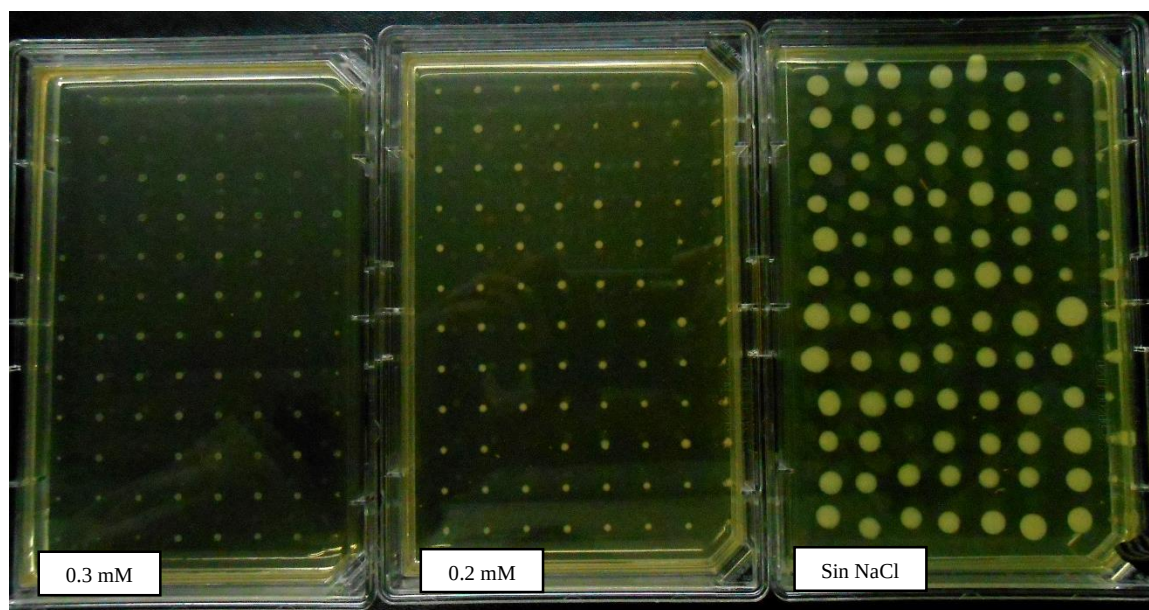


Figura 43. Imagen que muestra el crecimiento de las muantes de la caja 044 en medio TY sin y con NaCl (0.2 y 0.3 mM).

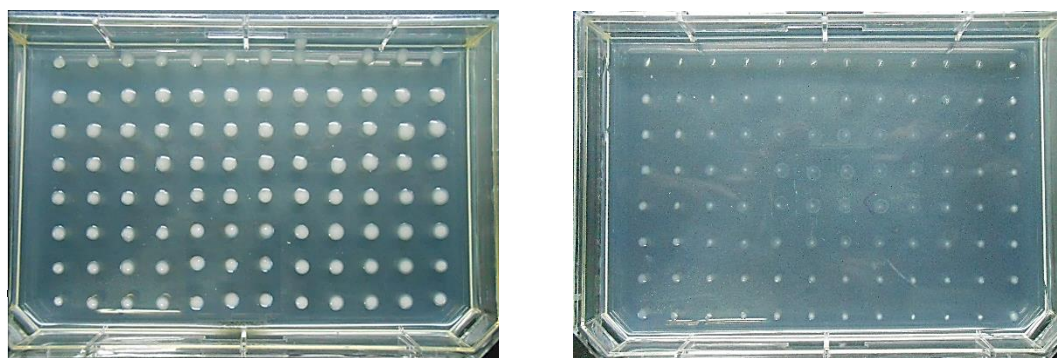


Figura 44. Se muestra la placa 001 que fue improntada con mutantes de *Ensifer aridi* LEM451 en medio TY sin NaCl (izquierda) y con 300 mM de NaCl (derecha). El crecimiento registrado en las imágenes fue de 24 h.

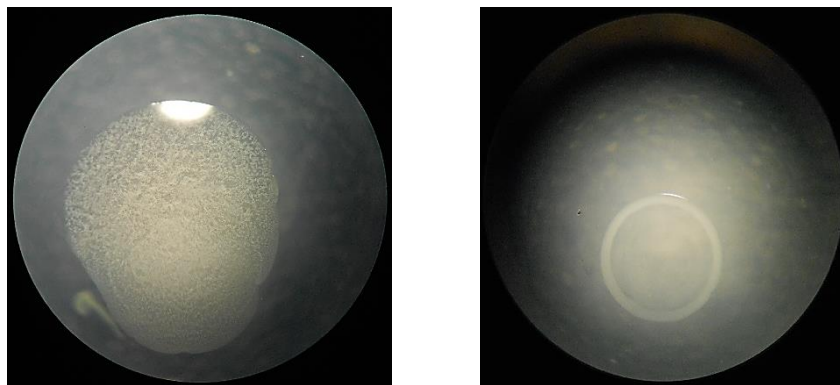


Figura 45. Imágenes resultantes de la observación al estereoscopio (4X) de la mutante 038E6 en medio TY sin sal (izquierda) y en TY con 300 mM de NaCl (derecha). Nótese la reducción de la producción de exopolisacárido. El crecimiento registrado en las imágenes fue de 24 h.

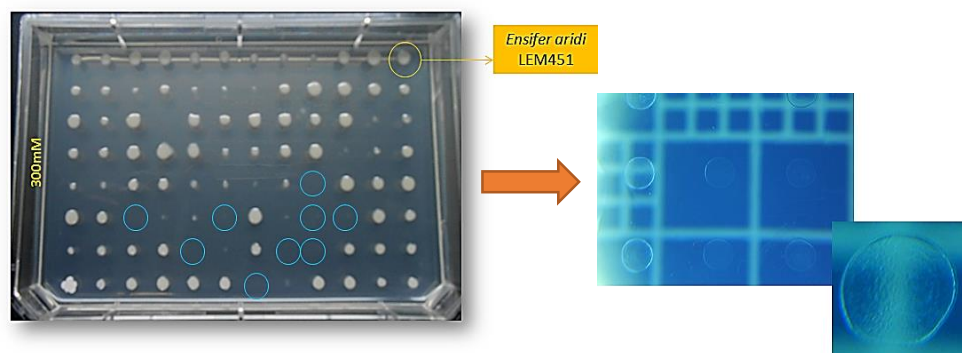


Figura 46. Placa de TY con 300 mM de NaCl (48-36 h) que muestra el crecimiento de algunas mutantes y a *Ensifer aridi* LEM451 (derecha). En los recuadros, se observó a detalle, el crecimiento de algunas de las mutantes señaladas con círculos azules en la placa de la derecha. Se observó que en realidad no hubo inhibición de crecimiento, solo se cambios en la producción de exopolisacárido.

Aquellas que mostraron menor cantidad de exopolisacárido con respecto a la cepa silvestre, se consideraron como sensibles a salinidad (Bruning y Rozema, 2013, Lloret et al., 1995; Lloret et al., 1998; Soussi et al., 2001; Zahran, 1999). Como resultado de esto, se obtuvieron 54 cepas candidatas, las cuales se mencionan a continuación:

Tabla 12. Mutantes de *Ensifer aridi* LEM451 que mostraron resistencia disminuida ante salinidad (hasta 300 mM), en la prueba cualitativa (elaboración propia).

027B6	037F5	027B8	029D4	027B7	003H1	062H3	059A7	058F9
035G11	038E6	041G1	030A12	045E2	054H1	062H8	062F3	062D3
043C12	035H1	033A1	041G12	030B10	046G5	055H2	063E10	063H8
043H1	027D11	033B1	043A1	032B7	003A1	056G11	054G1	056G11
043H2	036B12	034A12	029A1	033E12	003A6	057D1	062H1	057D1
044A1	037F3	036A12	029H12	035H2	003D11	060D10	054H2	059E1

Después, estas 54 cepas se sembraron por estriado en placas Petri con medio TY adicionado con NaCl en 100, 200 y 300 mM (figura 39) para corroborar su comportamiento bajo estrés salino con respecto de *Ensifer aridi* LEM451. De este ensayo se obtuvieron 5 cepas candidatas, y fueron:

Tabla 13. Se enlistan las mutantes sensibles a NaCl y la concentración a la cual presentaron este comportamiento. Estas cepas fueron evaluadas en la prueba cuantitativa (elaboración propia).

Mutantes candidatas	NaCl (mM)
003A6	300
003H1	300
003D11	200 y 300
036B12	300
041G1	200 y 300

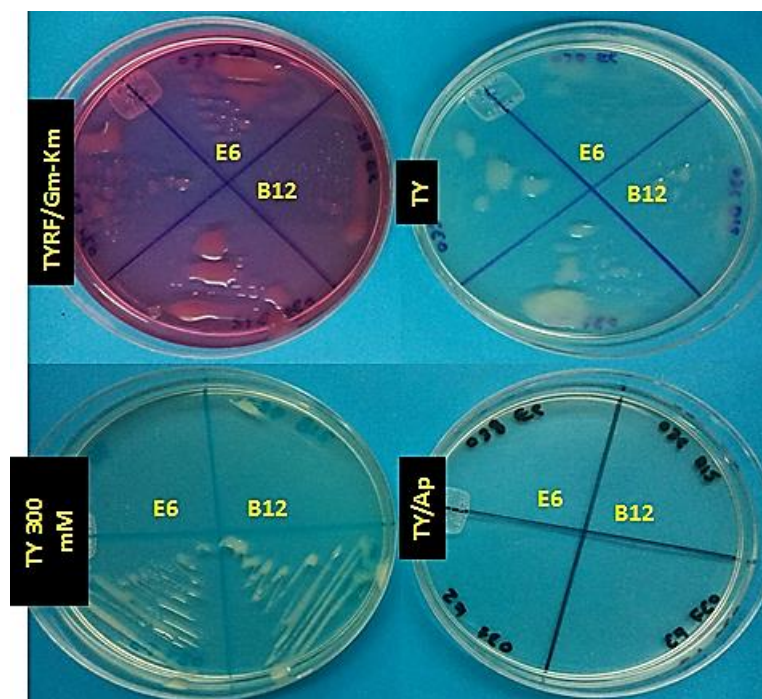


Figura 47. Imagen que resalta el comportamiento de las mutantes 036-B12 y 038-E6 (en algunos de los diferentes medios de cultivo utilizados), sensibles a salinidad.

La evaluación cuantitativa se hizo mediante un ensayo drop-plate, cuantificando el crecimiento bacteriano de las mutantes seleccionadas en la prueba anterior, en placas de medio TY con las siguientes concentraciones de NaCl: 100, 200, 300, 400, 450 mM y también sin NaCl (control). El conteo de las UFC's se hizo a lo largo de 5 días (Wei et al., 2004), se decidió hacer el registro de las UFC's hasta este día ya que, se ha reportado que el estrés salino, también retrasa el crecimiento bacteriano, y efectivamente, ese fue un comportamiento que se observó en este proceso.



Figura 48. Placa con TYRF-Gm-Km y 400 mM de NaCl, durante la prueba de drop-plate, de las mutantes 003D11 y 003H1 (Cortesía D. C. Efrén Rodríguez-Ángel, 2016).

Después de realizar la cuantificación de las UFC's para *Ensifer aridi* LEM451, se determinó que su fase exponencial, para fines prácticos, se presenta cuando alcanza la densidad óptica de entre 0.40-.055 a 600 nm (partiendo de un cultivo ajustado a una D. O. de 0.05 a 600 nm), y que su tiempo de generación es de aproximadamente 3 h y 10 min.

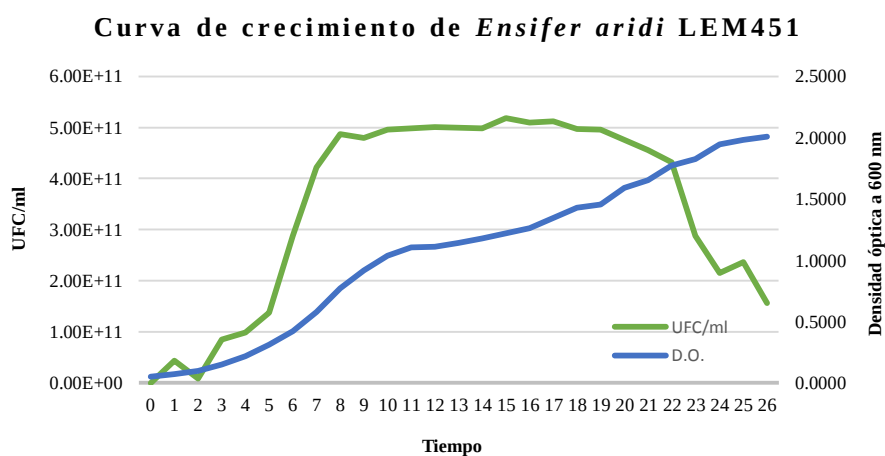


Figura 49. Gráfico que muestra la curva de crecimiento de *Ensifer aridi* LEM451.

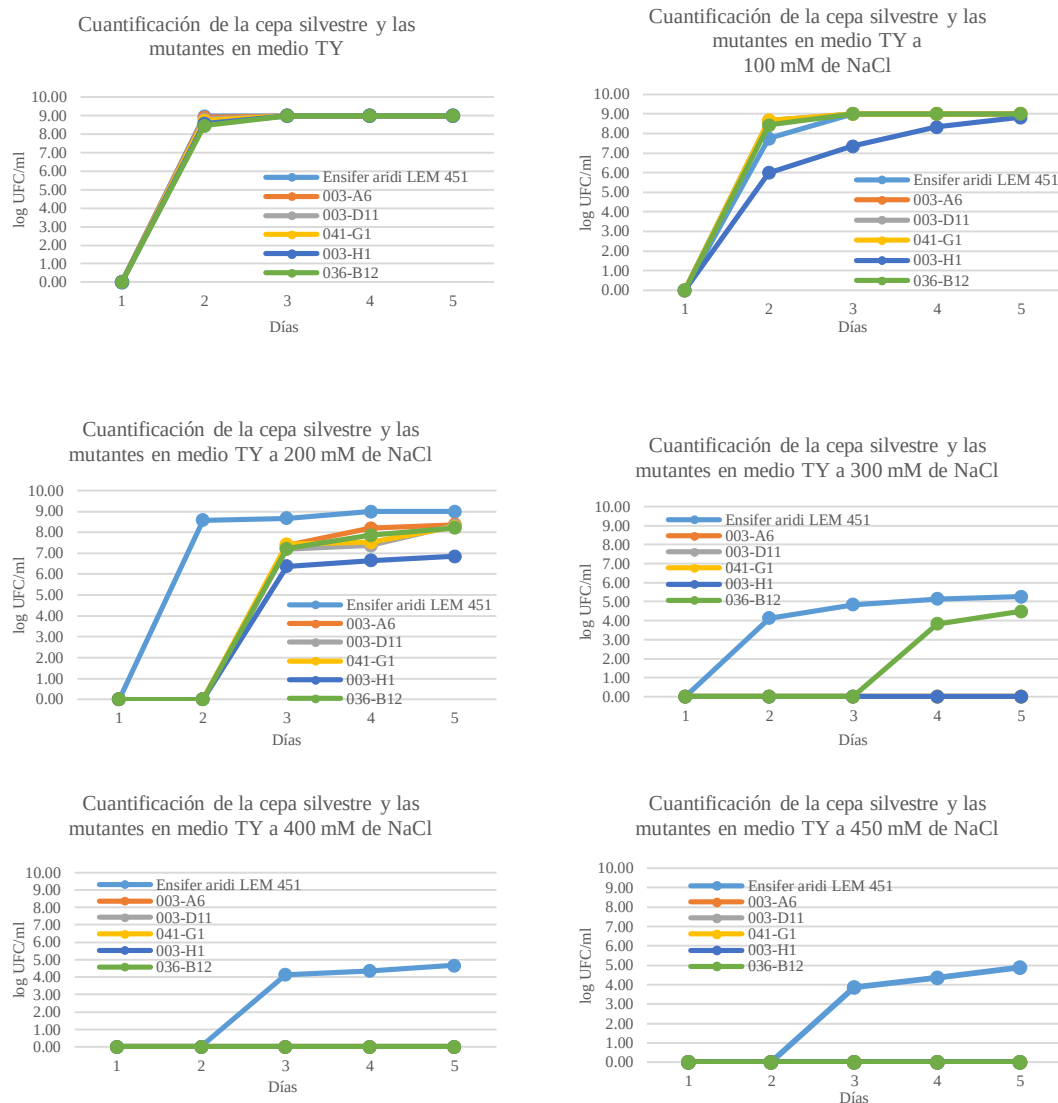


Figura 50. Gráficas que muestran las curvas de crecimiento de *Ensifer aridi* LEM451 y las mutantes sensibles a NaCl seleccionadas de la prueba cualitativa, en condiciones sin y con salinidad (100, 200, 300, 300, 400 y 450 mM).

En las gráficas anteriores se puede observar el comportamiento de las mutantes en comparación con la cepa silvestre, bajo estrés salino en concentraciones crecientes desde 0-450 mM. Dogra y colaboradores en 2013, reportaron la generación de mutantes de *Mesorhizobium ciceri* Ca181 sensibles a sal, ellos las pusieron a prueba en 100 mM y varias de sus mutantes presentaron reducción considerable en su halotolerancia, en el caso de las mutantes de *E. aridi* LEM451, mostraron un rezago significativo en su crecimiento, como se observa en la gráfica, cuando se someten a 200 mM de NaCl, en todas las mutantes se observa

crecimiento hasta un día después en comparación con la cepa silvestre e incluso, es en esta concentración en donde la disminución de las UFCs comienza a ser más notoria.

Cuando se siembran con 300 mM de NaCl, la disminución de las UFC's al final del intervalo de tiempo en el que fueron evaluadas, es notable, como se reportó en 2012 (Rocha, 2012), incluso el crecimiento de LEM451 se ve afectado negativamente por el estrés salino. Únicamente la mutante 036B12, es la que persiste de todas las mutantes ensayadas, no obstante, su crecimiento también se ve rezagado aún más, pues este se hace notorio hasta el tercer día después de su siembra.

En el caso de las dos últimas gráficas, lo que se observa es una inhibición del crecimiento de todas las mutantes, el único crecimiento observable es el de la cepa silvestre, que aunque las UFC's están disminuidas (en la orden de 10^5), persiste. Lo que nos indica que las regiones genómicas que fueron interrumpidas en las mutantes, son necesarias para la supervivencia de las mismas en concentraciones de NaCl desde 300 mM. Probablemente, al tener suprimido un mecanismo que la bacteria utiliza para soportar el estrés, en dicha concentración, éstos tal vez ya no son funcionales y finalmente, las bacterias sucumben ante esta tensión.

4.1.8. Amplificación del gen gentamicina 3-N-acetiltransferasa (*accC1*) en las cepas mutantes.

Con la finalidad de comprobar que las mutantes sensibles a salinidad, en realidad lo eran debido a un evento de trasposición y no a un evento fortuito y espontáneo, se determinó amplificar el cassette de resistencia a Gm que el plásmido transferido a las transconjugantes. Para esto primero se realizó el diseño de un juego de cebadores mediante el programa *Primerselect* de la paquetería Lasergene™. Mediante un primer análisis bioinformático, se determinó que el gen que se incluye en el plásmido, es de 531 pb, así que se pretendió amplificar la mayor parte de él.

Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes:

accC1F (5'-TCC ATG CGG GCT GCT CTT GAT-3')

accC1R (5'-ACC TGG CGG CGT TGT GAC-3')

Se obtuvo un fragmento de 491 pb. El perfil de temperaturas para llevar a cabo la PCR, fue el siguiente:

5' 96°C
30" 94°C
30" 57°C } 30 ciclos
1' 72°C
4' 72°C
∞ 20°C

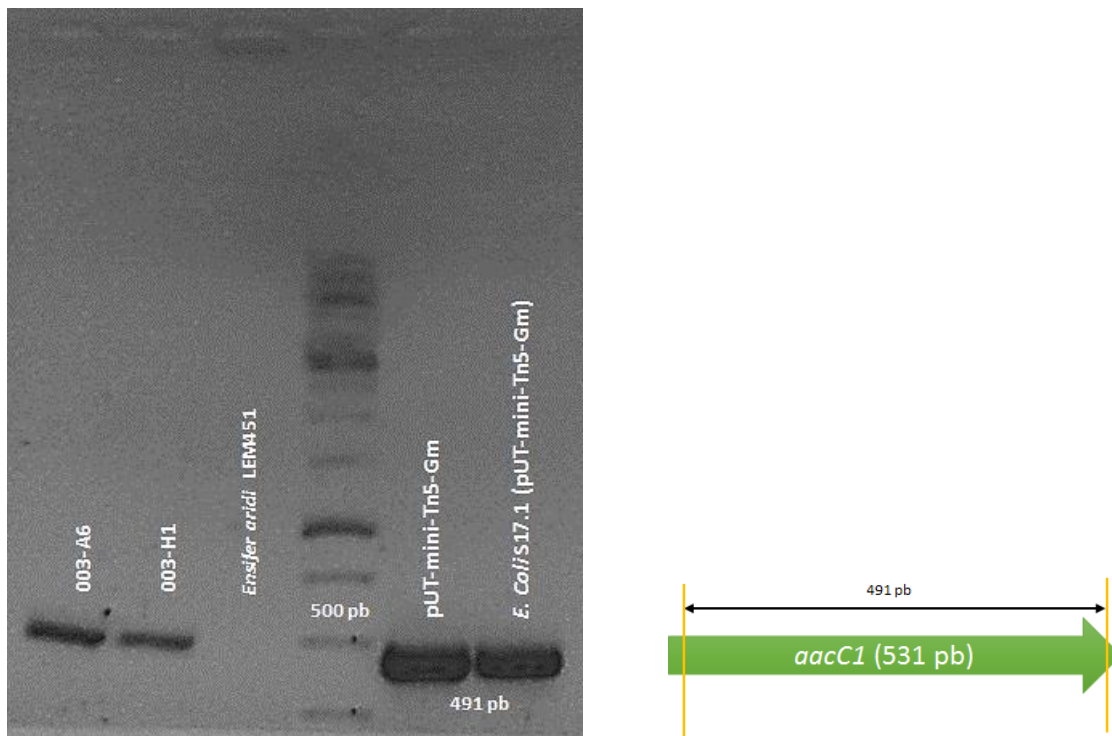


Figura 51. Fotografía de la amplificación del gen *accC1* en algunas mutantes sensibles a sal. Se utilizaron como control negativo a la cepa silvestre y como control positivo al plásmido pUT-miniTn5-Gm y a la cepa donadora del mismo. A la derecha se muestra en un diagrama, la región amplificada de dicho gen (491 pb).

Se hizo un análisis bioinformático, para predecir los cortes que la enzima de restricción *HinfI* haría en el fragmento que habíamos amplificado del cassette de gentamicina, se determinó que esta enzima generaría dos fragmentos, uno de 350 pb y otro de 141 pb. Después de realizar la digestión de este producto de PCR, se revelaron en un gel de agarosa (al 1%), dichos fragmentos, con lo cual, pudimos corroborar que el fragmento amplificado en el proceso anterior, efectivamente se trataba del cassette de gentamicina del transposón.

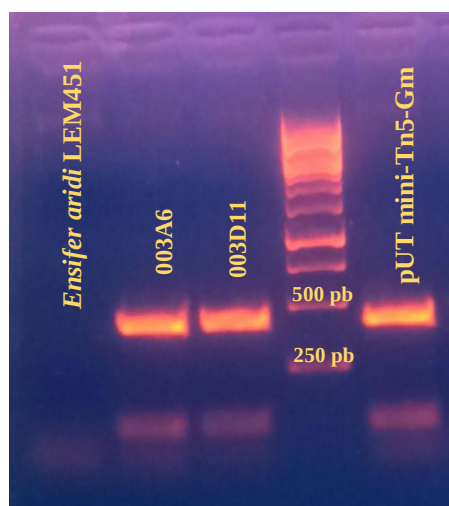


Figura 52. Fotografía del gel agarosa que muestra los productos de la digestión del cassette de gentamicina por *HinfI*.

Estas pruebas, en primera instancia, podrían parecer innecesarias, sin embargo, fueron pensadas y diseñadas con la intención de evitar una posible contaminación o bien, de tratar con mutantes espontáneas; ya que al manipular una cantidad grande de mutantes, esta situación se planteó como muy probable.

4.1.9. Amplificación del gen 16S rRNA y ARDRA y amplificación del gen rpoB y RFLP.

Como primer paso de este proceso, se hizo un análisis bioinformático para determinar cuántos cortes y de qué tamaño se producirían estos mismos si se digirían los fragmentos amplificados de los genes 16S rRNA y rpoB. Se utilizó como control a la cepa silvestre y a

las cepas *E. coli* S17.1 pUT mini-Tn5-Gm. Lo que se observó al revelar los geles de agarosa, fue lo mismo que se predijo en el análisis bioinformático. El perfil de las cepas mutantes debía ser igual al de la cepa silvestre y diferente de la *E. coli*.

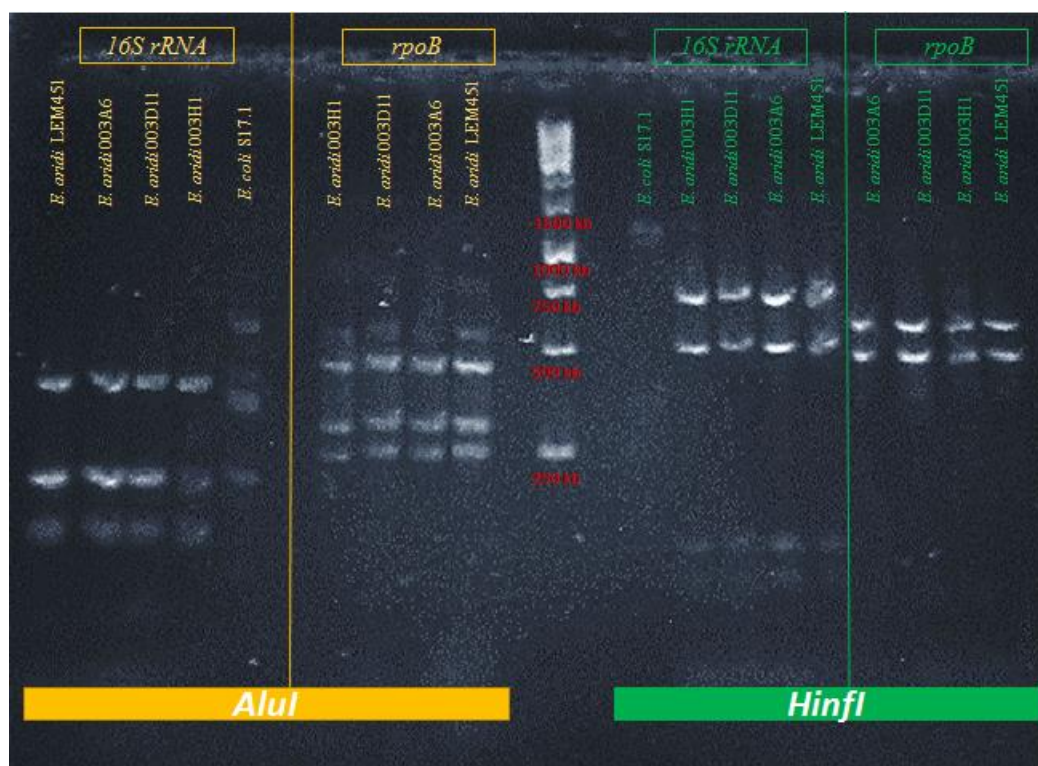


Figura 53. Fotografía del gel de agarosa donde se revelaron los fragmentos productos de la digestión de los genes 16SrRNA y *rpoB* con las enzimas *AluI* y *HinfI* de las cepas silvestre, *E. coli* S17.1 y mutantes sensibles a sal.

Como se puede observar en la fotografía anterior, las mutantes efectivamente, fueron generadas a partir de LEM451, pues tanto el perfil de ARDRA y de RFLP de las mutantes y la cepa silvestre, fueron los mismos. La finalidad de estas pruebas fue asegurarnos de que en todo momento se conservaban las cepas apropiadas y no alguna generada por contaminaciones cruzadas.

4.1.10. Análisis bioinformático e identificación de la región interrumpida por el transposón en el genoma de las mutantes sensibles a sal.

La AP-PCR para identificar la región interrumpida por el transposón, se realizó en las mutantes 003A6, 003H1, 003D11, 036B12 y 041G1. Después de múltiples intentos para amplificar la región de interés, únicamente se logró en la mutante 003A6.

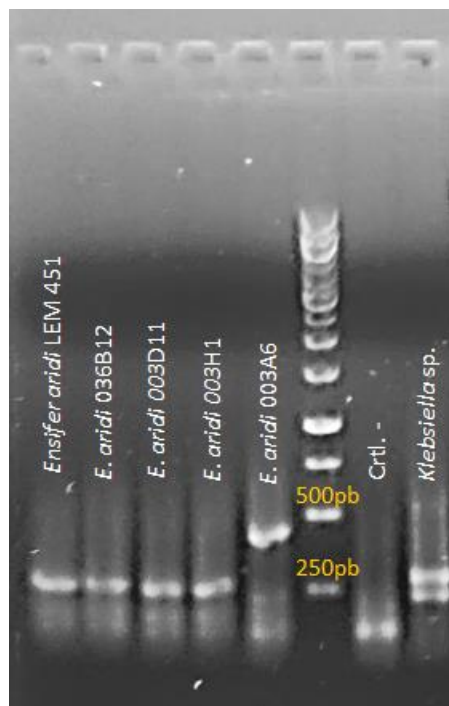


Figura 54. Fotografía de los productos de la AP-PCR de cepas mutantes sensibles a salinidad. Se empleó como control negativo, una muestra sin ADN molde y como control positivo a una cepa de *Klebsiella* sp. que, en los estudios de Rodríguez-Andrade (2014, datos no publicados); ya se había reportado como una cepa a la en la cual sí se había podido amplificar la misma región “O” que posee el transposón usado en nuestras mutantes. Agradecemos al M. C. Osvaldo Rodríguez Andrade por proporcionarnos dicha cepa.

Como se puede observar en la imagen anterior, se obtuvo un producto de PCR de aproximadamente 250 pb para la cepa silvestre, esto no debió ser buena señal, pues en la cepa silvestre no se encontraba ningún transposón insertado, asimismo, en las otras mutantes (excepto 003A6), mostraron una banda similar a la que presentó la cepa silvestre, por lo que supusimos que no se había logrado amplificar la región de interés sino que los cebadores, probablemente se habían apareado entre sí o bien, que habían logrado amplificar una región

homóloga a estos. Sin embargo, con la mutante 003A6, sí se logró amplificar un producto de aproximadamente 500 pb. Todas las bandas resultantes se enviaron al laboratorio de servicios genómicos “*Langebio*” del CINVESTAV para su secuenciación.

Al hacer el análisis de la secuencia amplificada, se hizo la búsqueda en la zona amplificada de la región “O” del pUT, ésta presentó algunas disparidades ya que al tratarse el inicio de una secuenciación, generalmente las señales tienen ruido y no son muy claras, esta región se localizó aproximadamente, dentro de los primeros 20 nucleótidos de la secuencia; y a continuación, se encontró la región genómica que fue interrumpida por el transposón.

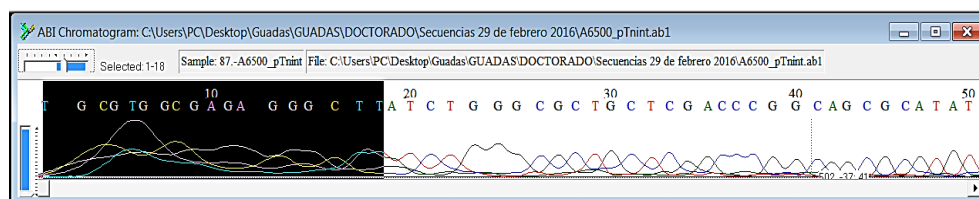


Figura 55. Cromatograma resultante de la secuencia amplificada del producto de la AP-PCR de la mutante 003A6.

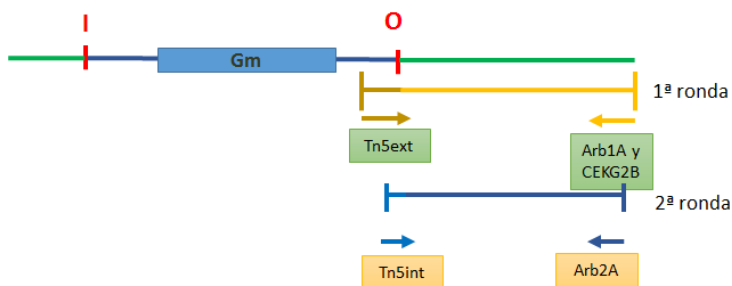


Figura 56. Diagrama de la región “O” del transposón que fue identificada en la secuencia de la mutante 003A6.

De la mutante 003A6 se obtuvo una secuencia de 422 pb: De dicha secuencia se hizo la búsqueda en el genoma de la cepa *E. aridi* LEM451 y, efectivamente dicha región pertenecía a la cepa silvestre. También se hizo otro análisis de la secuencia mediante BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool [nucleotide-nucleotide]), se identificó que

se muestra un diagrama que representa las regiones contiguas a la secuencia de interés y el sentido de las mismas.

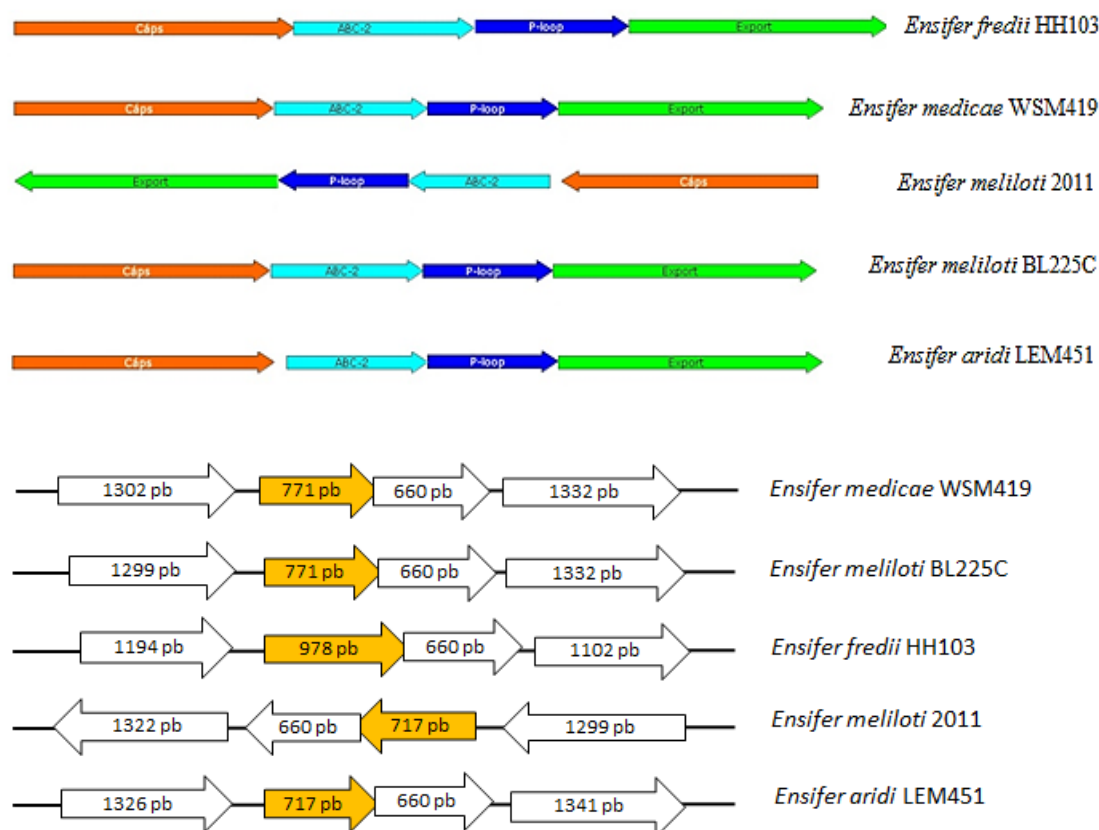


Figura 59. Diagramas de las secuencias y sentido de los genes vecinos del gen transportador ABC en diferentes especies de *Ensifer*.

Se observó que en todas las especies analizadas, se repetía la misma estructura genética, así mismo, se hizo un análisis bioinformático para determinar los posibles promotores de esas secuencias (anexo 3), se determinó que en realidad, se trataba de un operón de una longitud aproximada de 5056 pb.

Con respecto a la secuencias del resto de las mutantes y de LEM451, se identificó que los fragmentos amplificados en la AP-PCR, correspondían efectivamente, a una región dentro del genoma de *E. aridi* LEM451 que presuntamente codifica para una metalo-beta-lactamasa. Estas secuencias son exactamente las mismas en el resto de las mutantes (anexo 6).

4.1.11. Germinación de variedades de frijol bajo estrés salino.

La interacción rizobia-leguminosa, es afectada directamente por la salinidad. En todas las etapas de la nodulación y de fijación de nitrógeno se han reportado los efectos que la misma ejerce sobre ellas. Nuestro principal objetivo de este ensayo fue observar e identificar los efectos que podrían presentarse entre la interacción de una mutante sensible a sal con plantas de *Phaseolus vulgaris*, bajo estrés salino.

Phaseolus vulgaris se ha reportado como una planta sensible a salinidad, y además, la tolerancia que las diferentes variedades de frijol han mostrado en otros estudios es diferente entre ellas (Campos et al., 2011), decidimos partir de un ensayo de germinación de diferentes variedades de frijol común y en diferentes concentraciones de NaCl y con los resultados obtenidos de este experimento, se diseñaría el ensayo tipo invernadero.

- Porcentaje de germinación

$$PG = \left(\frac{N}{N_t} \right) \times 100$$

PG = Porcentaje de germinación.

N = Número de semillas germinadas.

N_t = Total de semillas.

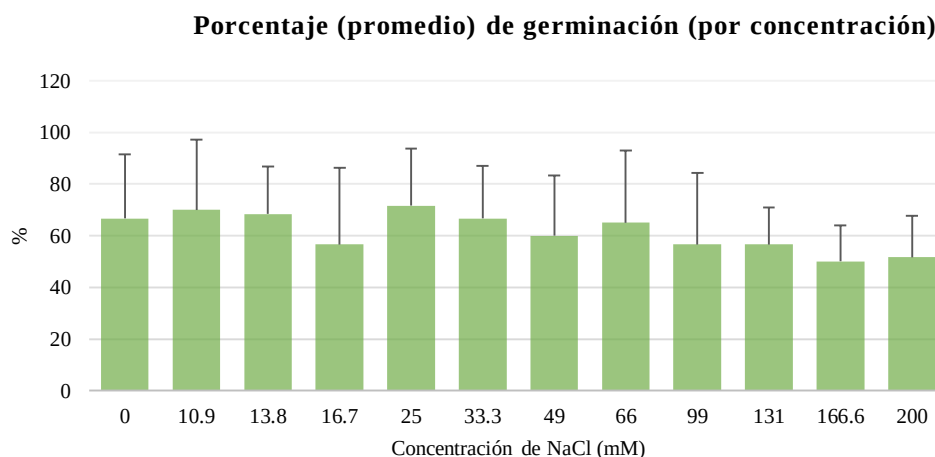


Figura 60. Gráfica que representa el porcentaje de germinación (con base en las diferentes concentraciones de NaCl).

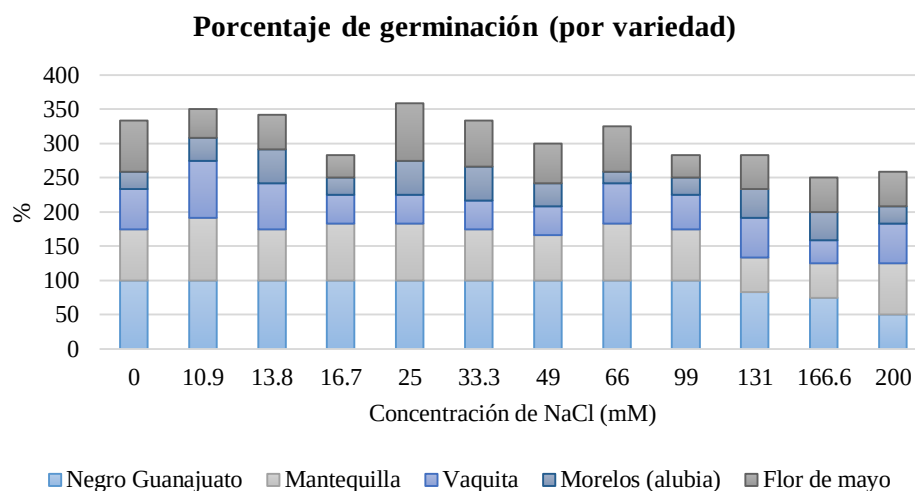


Figura 61. Gráfica que muestra el porcentaje de germinación de las semillas (con base en las variedades empleadas durante el ensayo).

Como se puede observar en las gráficas anteriores, la salinidad disminuye considerablemente el porcentaje de germinación de las semillas de frijol de las variedades vaquita, Morelos y flor de mayo; mientras que las variedades mantequilla, y sobre todo, negro Guanajuato, conservan un porcentaje de germinación más uniforme.

- Velocidad media de germinación

$$VMG = \sum \left(\frac{n_i}{t_i} \right) \text{ Semillas germinadas por día}$$

VMG: Velocidad media de germinación.

n_i = Número de semillas germinadas en el total de días.

t_i = Tiempo de germinación desde la siembra hasta el último día de germinación.

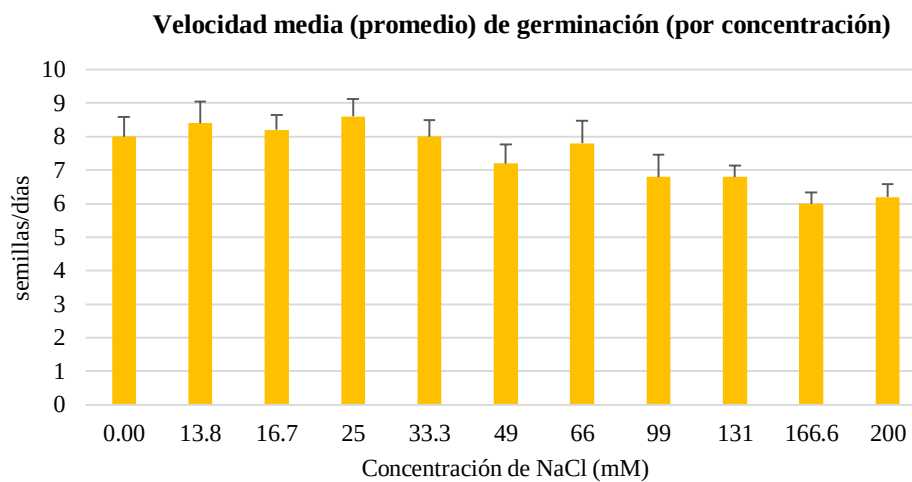


Figura 62. Gráfico que muestra la VMG de las semillas (con base en las diferentes concentraciones de NaCl empleadas).

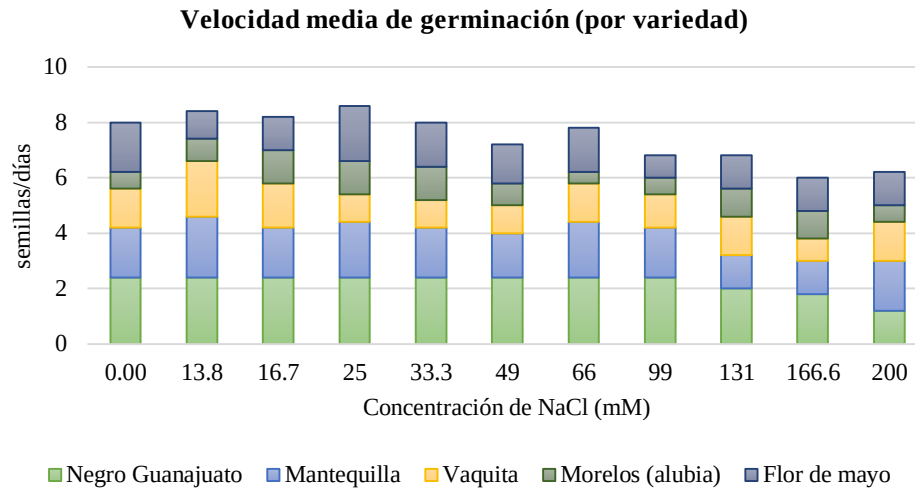


Figura 63. Gráfica de la VMG de las variedades de *Phaseolus vulgaris* empleadas en el ensayo.

De los métodos analíticos determinados en este proyecto (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996), éste representa la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación, que en este caso, fueron 5 días. En el caso de la velocidad media de germinación, sí hubo diferencia notable entre variedades de frijol, en el caso de las semillas Morelos, los valores fueron los más bajos mientras que, la variedad negro Guanajuato, fue la que obtuvo los valores más altos y uniformes.

- Tiempo promedio de germinación

$$T = \frac{\sum(n_i \times t_i)}{\sum(n_i)} \times 100$$

T = Tiempo promedio de germinación.

n_i = Número de semillas germinadas por día.

t_i = Número de días desde de la siembra.

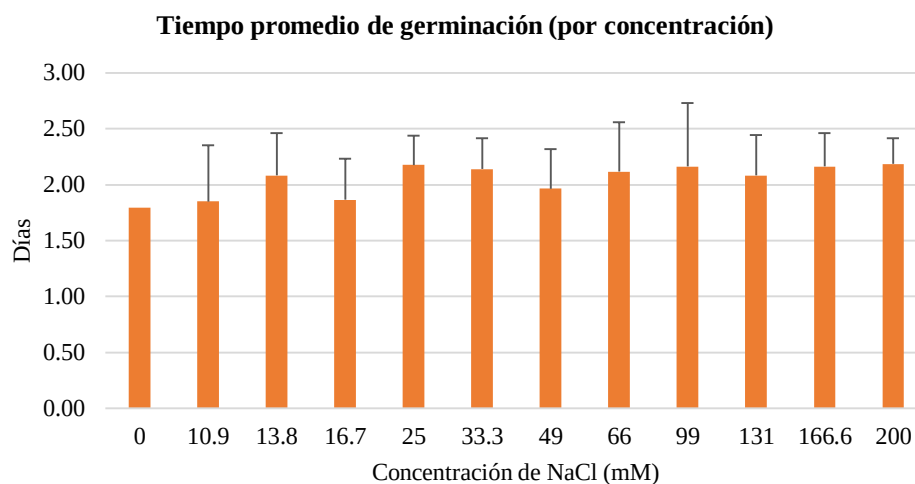


Figura 64. Gráfico que representa el T (tiempo promedio de germinación).

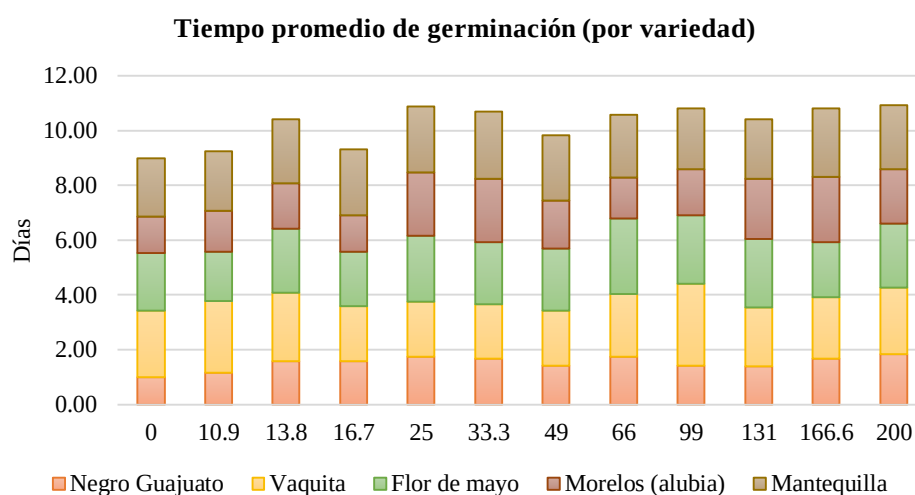


Figura 65. Gráfica que muestra el tiempo promedio de germinación de las variedades de semillas utilizadas en el ensayo.

Esta medida representa el tiempo promedio de germinación que necesitan las semillas para germinar, la variedad a la que le tomó menos tiempo en germinar fue negro Guanajuato, aunque la diferencia no fue profunda.



Figura 66. Semillas de frijol variedad negro Guanajuato, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 67. Semillas de frijol variedad mantequilla, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 68. Semillas de frijol variedad vaquita, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 69. Semillas de frijol variedad Morelos (alubia), al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 70. Semillas de frijol variedad flor de mayo, al tercer día del ensayo de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.



Figura 71. Semillas de frijol variedad negro Guanajuato, después de 5 días de germinación con diferentes concentraciones de NaCl.

Como se puede apreciar en las imágenes y gráficas anteriores, las semillas de la variedad negro Guanajuato fueron las que crecieron con mayor uniformidad. Uno de los contratiempos que se presentaron en todo momento en las semillas de vaquita, mantequilla, Morelos y flor de mayo fue la presencia de hongos, esto nunca ocurrió con las semillas de

negro Guanajuato (en las diversas pruebas previas al experimento), incluso, se contempló incluir a la variedad peruano (semilla certificada), sin embargo, estas semillas nunca pudieron germinar sin manifestar la presencia de hongos (evidencia no presentada), por ello es que fueron descartadas del experimento. Argumentamos que posiblemente, el tiempo de almacenamiento de las semillas también fue determinante en los resultados de la germinación, pues las variedades que habían presentado contaminación por hongos tenían un tiempo mucho mayor de almacenamiento (aproximadamente 6 años) que las de la variedad negro Guanajuato (1-2 años), en el caso de las semillas de peruano contaban con incluso, más de 6 años almacenadas.

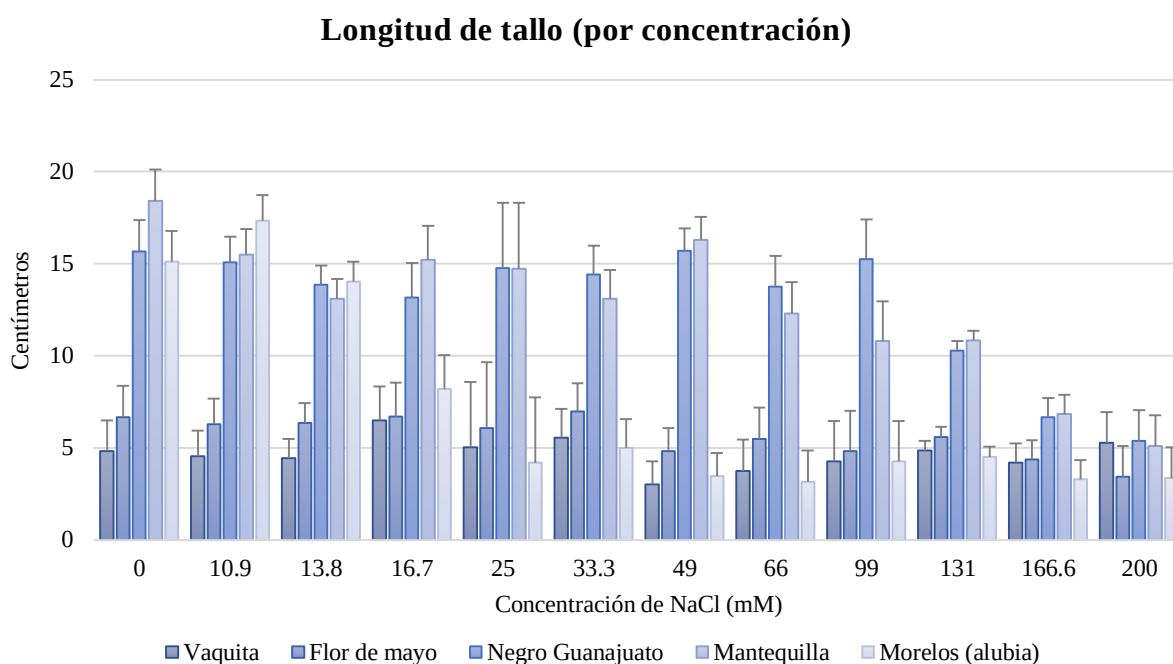


Figura 72. Gráfica que muestra la longitud de tallos de los germinados, sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.

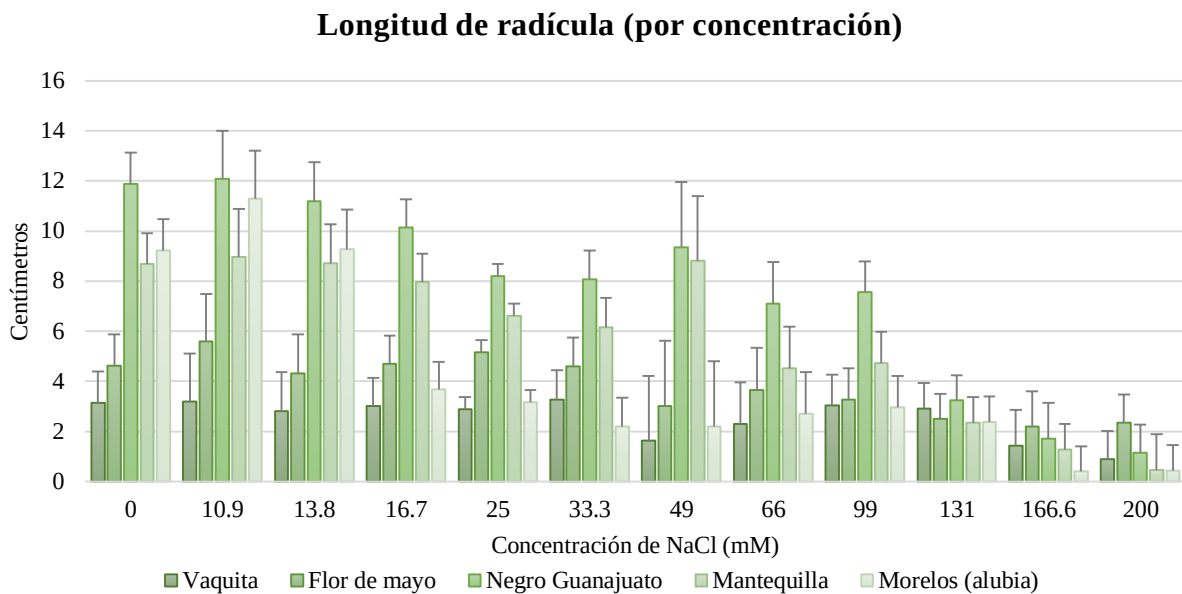


Figura 73. Gráfica que muestra la radícula de los germinados, sometidos a diferentes concentraciones de NaCl.

Nuevamente, la variedad negro Guanajuato, presentó mayor uniformidad y mayores longitudes de la radícula en comparación con el resto de las semillas. Finalmente, se concluyó que las semillas de la variedad negro Guanajuato serían empleadas para el ensayo en tubo y utilizando la concentración de 33.3 mM de NaCl. La concentración se determinó considerando tres factores, el primero de ellos fue que, como se muestra en la figura 66, los brotes de *Phaseolus vulgaris* se ven afectados negativamente de manera significativa con respecto al desarrollo de la radícula. El segundo fue que en el porcentaje de germinación, 33.3 mM fue la concentración con la cual, las semillas de la variedad elegida se mantuvieron relativamente constantes y; el tercer factor fue que en la bibliografía de diversos autores y organismos agrícolas, han reportado a *Phaseolus vulgaris* como un cultivo sensible a la salinidad, que incluso, en concentración de 30 mM el rendimiento de esta planta se ve seriamente afectado reduciéndose alrededor del 34% (Partida-Ruvalcaba, 2006; Can-Chulim et al., 2014).

4.1.12. Interacción de las mutantes de *Ensifer aridi* LEM451 sensibles a sal con plantas de *Phaseolus vulgaris*, en condiciones de salinidad.

Una vez elegida la variedad de frijol común y la concentración de NaCl, se llevó a cabo el ensayo de nodulación en tubo, como se explicó en el apartado de metodología.

Las siguientes imágenes, muestran las evidencias de los resultados del ensayo de la determinación de la capacidad infectiva de la mutante 003A6 a plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato sometidas a estrés salino (33.3 mM de NaCl)



Figura 74. Tubos de ensayo con las semillas germinadas (izquierda). Experimento en tubos mostrando plantas ya con hojas verdaderas (derecha).



Figura 75. Plantas sin estrés salino (izquierda) y con estrés salino (derecha).

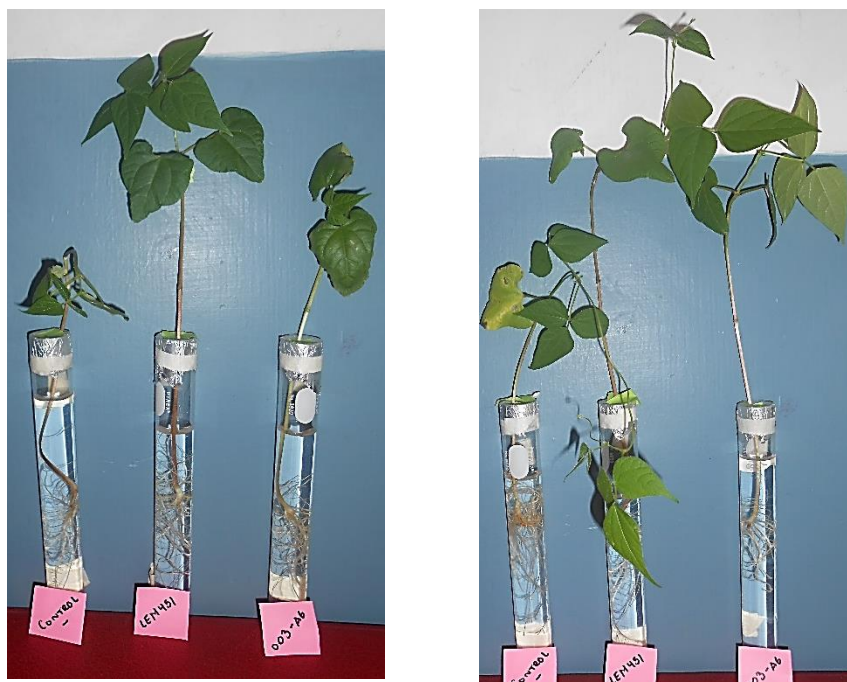


Figura 76. Plantas sin estrés salino (izquierda) y con estrés salino (derecha), nótese la decoloración de las hojas en la planta que no fue inoculada, característico en plantas con carencia de nitrógeno.

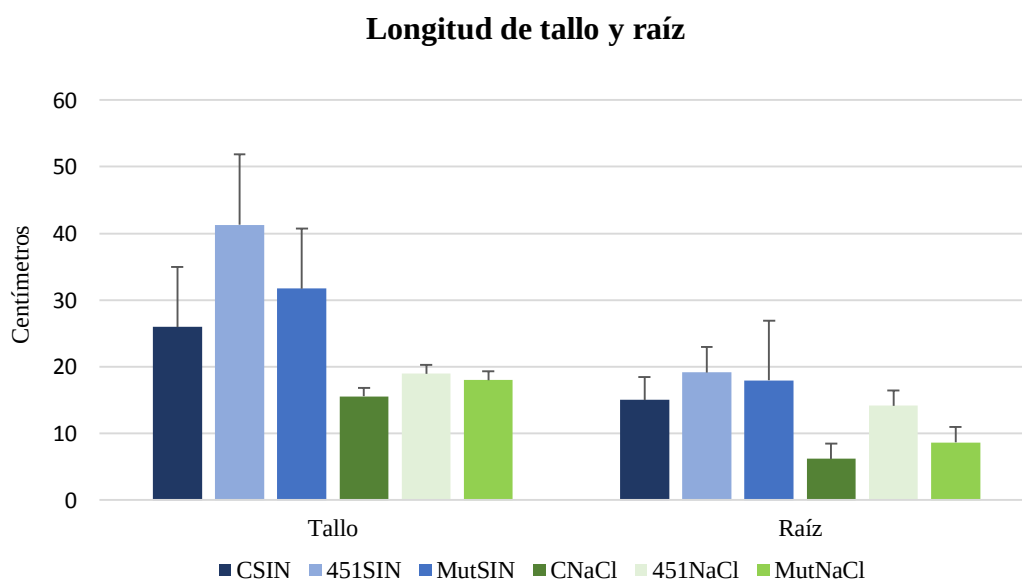


Figura 77. Gráfica que muestra las longitudes de tallos y raíces de las plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato.

Con respecto a la longitud de tallos y raíces, encontramos que en condiciones no salinas, las plantas inoculadas con la mutante, no son significativamente diferentes. La diferencia notoria se evidenció en la longitud de los tallos en condición no salina y salina.



Figura 78. Raíz de planta inoculada con la cepa silvestre y sin condiciones de salinidad (izquierda). Raíces de plantas inoculadas con la mutante 003A6 y en condiciones de salinidad (derecha). Se observó que las raíces de las plantas sometidas a estrés salino, producen menos raíces secundarias, más cortas y también se deforman por engrosamiento de las mismas.

Como se observa en la figura 71, las raíces de las plantas que crecieron bajo estrés salino, se deformaron y se engrosaron, además de que en algunas zonas tanto de tallo como de raíz, los tejidos de los mismos presentaban deshidratación, lo cual influyó en el peso de ambos.

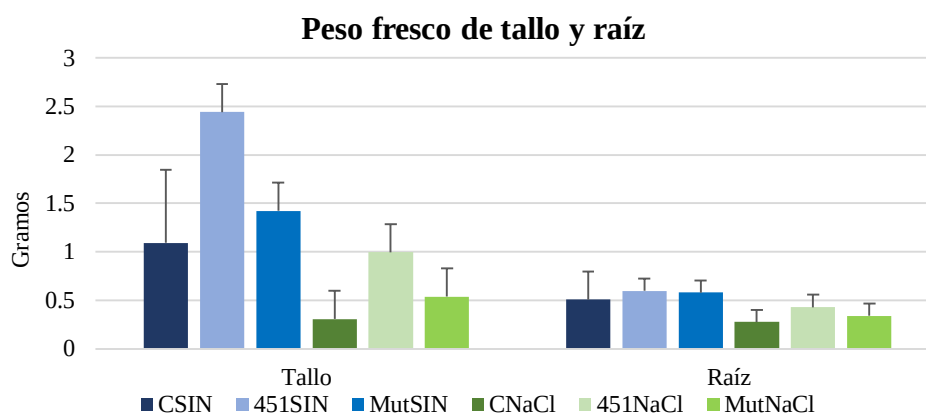


Figura 79. Gráfica que muestra los pesos frescos de tallos y raíces de las plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato.

Al hacer los pesajes de tallo y raíz, observamos que el peso de los tallos en condición no salina fue mayor que en condición salina; algo similar sucedió al comparar el peso de los tallos de las plantas inoculadas con la cepa silvestre con los de la mutante, los inoculados con *E. aridi* LEM451 mostraron un peso mayor. Con respecto al peso de raíz, no hallamos diferencia significativa.

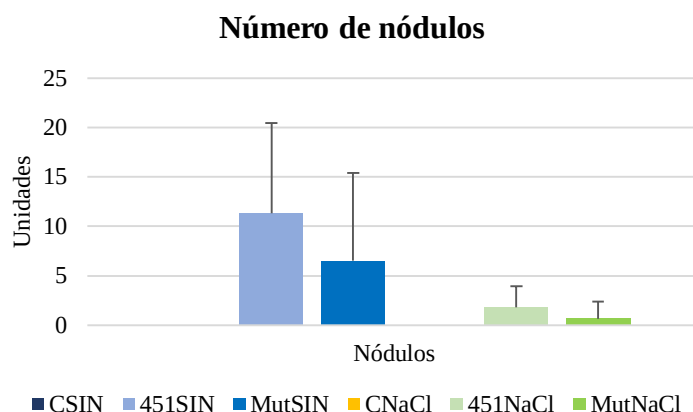


Figura 80. Representación gráfica del número de nódulos producidos por las plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato.

Antes de cuantificar los nódulos, esperábamos que en la caso de las plantas inoculadas con la mutante, no los presentaran, sin embargo, al revisar las raíces para identificar la presencia de los mismos, notamos que sí había sido capaz de nodular en ambas condiciones. Aunque no perdió su capacidad infectiva, sí se vio afectada, pues la cantidad de nódulos fueron menos que los producidos por la cepa silvestre.

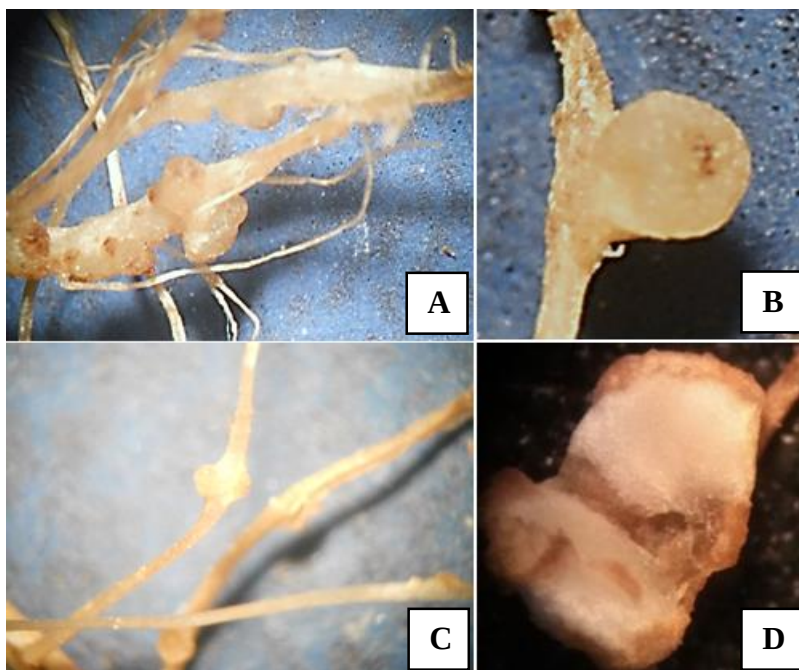


Figura 81. Nódulos producidos por la mutante 003A6 sin estrés salino (A), nódulos producidos por la misma mutante con estrés salino (C). Nódulo generado por *Ensifer aridi* LEM451 sin estrés salino (B), nódulo producido por *Ensifer aridi* LEM451 con estrés salino (D), en éste último puede observarse la falta de coloración rojiza, lo que puede indicar la ineficiencia del nódulo.

Rocha (2012) y Medina (2014), reportaron que *Ensifer aridi* LEM451, es una cepa que no posee alta capacidad infectiva y, presuntivamente, tampoco posee una alta capacidad de fijación de nitrógeno, pues en ambos casos, al igual que en este proyecto, se reportó la presencia de nódulos, a simple vista, blanquecinos. Esto lo observamos en los nódulos producidos por ambas cepas.

Como se muestra en la figura 74, notamos que la morfología de los nódulos producidos por la mutante era diferente con respecto a los nódulos generados por la cepa silvestre, ya que mientras los nódulos de LEM451 son determinados y redondeados, los de la mutante son más pequeños y amorfos. Dogra y colaboradores (2013), generaron una mutante en un transportador tipo ABC de *Mesorhizobium ciceri* Ca181 de la cual, también fue evaluada su capacidad infectiva con plantas de chícharo, y al también reportaron la formación de una menor cantidad de nódulos, deformes y mucho más pequeños que los producidos por la cepa silvestre.

La mutación en este tipo de transportadores ha sido reportado anteriormente por otros autores, se ha referido su participación en la osmorregulación de rizobia, de otros géneros bacterianos (Wood, 2011) e incluso, hasta de plantas (Chen et al., 2018). En *Ensifer meliloti*, se identificó que el gen *exsA*, codifica una proteína de un transportador de tipo ABC el cual, a su vez está involucrado en la biosíntesis de exopolisacárido (Becker et al., 1995), tal vez esa sea una de las razones posibles por las que la mutante 003A6, mostró el fenotipo de la disminución de producción de exopolisacárido a la vez que se redujo también su halotolerancia con respecto de la cepa silvestre. Aunado a esta característica, la capacidad de infección de 003A6, se vio afectada por este defecto en la producción de exopolisacárido (Battisti et al., 1992; Djordjevic et al., 1987; Sapink, 2000).

La tolerancia a la salinidad, presume ser una red muy compleja de diversos mecanismos que poseen los organismos (producción y/o acumulación de osmolitos y osmoprotectores, modificaciones de las bombas de protones, cambios en los patrones y producción de exopolisacáridos y lipopolisacáridos, formación de biofilms, entre otros) (Miller y Wood, 1996; Gouffi et al., 1998, Gouffi et al., 1999, Nogales et al., 2002; Alloing et al., 2006; Wood, 2011; Bremer y Krämer, 2019. Esto es comprensible y razonable desde el punto de vista de que todos los seres vivos tenemos la misma finalidad: sobrevivir.

Capítulo 5

5.1. Conclusiones

De los rizobia aislados de *P. filiformis* estudiados en este proyecto, una de las cepas está relacionada con *E. meliloti*, mientras que el resto de ellas, se agruparon dentro del clado de *E. aridi*.

Las filogenias basadas en genes simbióticos (*nodC* y *nifH*) no presentan congruencia con las que se obtuvieron con las secuencias generadas por los genes housekeeping. Esto sugiere que el intercambio de estos genes se llevó a cabo mediante transferencia lateral.

La especie bacteriana recién descrita, *Ensifer aridi* es capaz de nodular plantas de *Phaseolus vulgaris* variedades Morelos (alubia), vaquita y negro Guanajuato; a pesar de haber sido aislada de *Phaseolus filiformis*.

Las cepas de *Ensifer aridi* LEM, mostraron a través de un análisis filogenético de un fragmento del gen *nodC*, ser filogenéticamente cercanas a cepas de *Ensifer* aisladas de leguminosas localizadas en zonas áridas y semiáridas (*Vachellia macracantha*, *Leucaena leucocephala* y *Acacia acatlensis*), regiones con características similares de las que se colectaron las plantas de *Phaseolus filiformis*, de cuyos nódulos fueron aisladas.

Las cepas de *Ensifer aridi* LEM, mediante el análisis filogenético a partir de fragmentos de secuencias del gen *nifH*, se presentaron formando un cluster, que de manera similar al análisis del gen *nodC*, fue cercana a cepas de *Ensifer* aisladas de leguminosas ubicadas en regiones desérticas (*Vachellia macracantha*, *Leucaena leucocephala* y *Acacia acatlensis*) como lo fueron las cepas de estudio.

Se construyó una mutateca por transposición, la cual está integrada por 6400 mutantes de *Ensifer aridi* LEM451. Y aunque no se constituyó con la cantidad de especímenes que fueron calculados mediante la ecuación de Clarke y Carbon (1976), fueron suficientes para que se presentara el fenotipo que buscábamos.

El tiempo de generación de la cepa *Ensifer aridi* LEM451, es de aproximadamente 3 hora y 10 minutos. Mientras que la frecuencia de transposición fue de 3×10^{-3} .

Se identificaron y cuantificaron cinco mutantes sensibles a salinidad (003A6, 003D11, 041G1, 003H1 y 036B12); que presentaron reducción en el crecimiento de las mismas, bajo condiciones salinas. El crecimiento de todas ellas se observó inhibido a partir de la concentración de 300 mM de NaCl.

La región genómica de la mutante 003A6 interrumpida por el transposón, fue un gen que codifica para una proteína de un transportador tipo ABC-2. Estos transportadores han sido reportados por diferentes investigadores y diversos trabajos que están relacionados directamente con la osmoadaptación y osmorregulación en el género *Ensifer*.

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato, germinadas bajo diferentes niveles de estrés salino, mostraron mayor uniformidad en el porcentaje de semillas germinadas, tiempo de germinación, velocidad media de germinación y longitud de radículas; bajo estrés salino.

Las plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato que fueron inoculadas con la mutante 003A6, presentaron nódulos más escasos, blanquecinos y amorfos en comparación con los producidos por *Ensifer aridi* LEM451.

La mutación del gen que codifica para un transportador ABC en la mutante 003A6, modificó la capacidad infectiva de la misma. Este gen, probablemente, también esté relacionado con la producción de exopolisacárido de la mutante.

Referencias bibliográficas

- Alcalde, M. T. (2007). Alimentos usados en formulación cosmética. *Offarm*. 26(3). 1-140.
- Alloing, G., Travers, I., Sagot, B., Le Rudulier, D. y Dupont, L. (2006). Proline Betaine Uptake in *Sinorhizobium meliloti*: Characterization of Prb, an Opp-Like ABC Transporter Regulated by both Proline Betaine and Salinity Stress. *J. Bacteriol.* 188(17); 6308-6317.
- Asch, F., Dingkhuhn, M., Wittstock, C. y Doerffling, K. (1999). Sodium and potassium uptake of rice panicles as affected by salinity and season in relation to yield components. *Plant soil*. 207(2); 133-145.
- Asfaw, K. W. (2011). The Response of Some Haricot Bean (*Phaseolus vulgaris*) Varieties for Salt Stress during Germination and Seedling Stage. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* 3(4): 282-288.
- Aykroyd, W. R., Doughty, J. y Walker, A. (1982). Legumes in human nutrition. In: FAO food and nutrition paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. Italia.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J. y Larher, F. (1999). Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Sci.* 145(2); 83-91.
- Baldwin, B. G., Boyd, S., Ertter, F. J., Patterson, R. W. Rosatti, T. J. y Wilken, D. H. (2012). Jepson manual: vascular plants of California. Berkeley. E. U. A. UC Press.
- Basurto-Sotelo, M., Núñez-Barrios, A., Pérez-Leal, A. y Hernández-Rodríguez, O. A. (2009). Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Synthesis*. 48(1); 1-5.
- Battisti, L., Lara, J. C. y Leigh, J. A. (1992). Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(12); 5625-5629.
- Bayuelo-Jiménez, J. S., Debouck, D. G. y Lynch, P. (2002). Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop. Sci.* 42(6), 2184-2192. DOI: 10.2135/cropsci2002.2184.
- Beyra, Á. y Reyes, G. (2004). Revisión taxonómica de los géneros *Phaseolus* y *Vigna* (Leguminosae-Papilionoideae) en Cuba. *A. J. Bot. de Madrid*. 61(2), 135-154.

- Boscari, A., Mandon, K., Dupont, L., Poggi, M. C. y Le Rudulier, D. (2002). BetS Is a Major Glycine Betaine/Proline Betaine Transporter Required for Early Osmotic Adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J. of Bacter.* 184(10); 2654–2663.
- Bremer, E., y Krämer, R. (2019). Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annu. Rev.* 73(1); 1-22. DOI: 10.1146/annurev-micro-020518-115504.
- Brewin N., Downie, J. y Young, J. (1992). Nodule formation in legumes. En Martin, A., Bloom, B., Hopwood, D., Hull, R., Iglewski, B., Laskin, A., Oliver, S., Schaechter, M. y Summers, W. *Encyclopedia of Microbiology*. (239-248). Academic. Press. Inc. New York. U. S. A.
- Brewin, J. (2004). Plan cell wall remodeling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Crit. Rev. in Plants Sci.* 23(4);293-316. DOI: 10.1080/07352680490480734.
- Bruning, B. y Rozema, J. (2013). Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agricultura. *Environ. and Exp. Bot.* 92(1); 134-143. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2012.09.001.
- Bruning, B., Van Logtestijn, R., Broekman, R., De Vos, A., Parra-González, A. y Rozema, J. (2015). Growth and nitrogen fixation of legumes at increased salinity under field conditions: implications for the use of green manures in saline environments. *AoB Plants*. 7(plv010); 1-8. DOI:10.1093/aobpla/plv010.
- Ca-Chulim, Á., Cruz-Crespo, E., Ortega-Escobar, H. M., Sánchez-Bernal, E. I., Madueño, A., Bojórquez-Serrano, J. I. y Mancilla-Villa, Ó. R. (2017). *Phaseolus vulgaris* response to salinity generated by NaCl, Na₂SO₄ and NaHCO₃. *Rev. Mex. de Cs. Agr.* 8(16), 1287-1300. Recuperado de: <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v8i6.294>.
- Campos, G., García, M., Pérez, D. y Ramis, C. (2011). Respuesta de 20 variedades de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) ante el estrés por NaCl durante la germinación y la fase plantular. *Bioagro*. 23(3); 215-224.
- Can-Chulim, A., Ramírez-Guerrero, L. G., Ortega-Escobar, H. M., Cruz-Crespo, E., Flores-Román, D., Sánchez-Bernal, E. I., y Madueño-Molina, A. (2014). Germination and seedling growth of *Phaseolus vulgaris* L. in saline conditions. *Rev. Mex. de Cs. Agr.* 5(1); 753-763.

- Castrejón, F. A., Corona, L., Rosiles, R., Martínez, P., Lorenzana, A., Arzate, L. G., Olivos, P., Guzmán, S...Carrillo, S., (2017). Características nutrimentales de gramíneas y leguminosas y algunas arbóreas forrajeras del trópico mexicano: fracciones de proteína (A, B1, B2 y B3 y C), carbohidratos y digestibilidad in vitro. Ciudad de México, México. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial.
- Chen, N., Song, B., Tang, S., He, J., Zhou, Y., Feng, J., Shi, S. y Xu, X. (2018). Overexpression of the ABC transporter gene *TsABCG11* increases cuticle lipids and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biotech. Rep.* 12(5); 303-313.
- Chen, W. X., Yan, G. H. y Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 38(4), 392-397.
- Chen, W., Laevens, M., Lee, S., Coenye, T. M., Vos, T., Mergeay, P. y Vandamme, P. (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 51(5), 1729-1735.
- Clarke L, Carbon J. (1976). A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell.* 9(1), 91-9.
- Cooper, J. E., Feil, E. J. (2004). Multilocus sequence typing - what is resolved? *Trends Microbiol.* 12, 373-377.
- Cordero, I., Ruiz-Díez, B., Coba de la Pena, T., Balaguer, L., Lucas, M. M., Rincón, A. y Pueyo, J. J. (2016). Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. *Soil Biol. and Biochem.* 96(1); 39-54.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16(22); 10881-10890.
- Corral-Lugo, A. (2010). Determinación de genes de resistencia a desecación, por mutagénesis al azar, en *Kelbsiella variicola* T29A2 del tipo PGPR. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Cuéllar-Sánchez, A. (2011). Estudio poblacional de rhizobia simbioses de frijol silvestre *Phaseolus* spp. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Dangeard, P. A. (1926). Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses. *Botaniste.* 16(1), 1-275.

- Das, S., Noe, J., Paik, S. y Kitten, T. (2005). An improved arbitrary primed PCR method for rapid characterization of transposon insertion sites. *J. of Microbiol. Meth.* 63(1), 89-94. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.02.011.
- Das-Chatterjee, A., Goswami, L., Maitra, S., Dastidar, K. G., Ray, S. y Majumder, A. L. (2006). Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEMS Lett.* 580(16), 3980-3988.
- De Felipe, M. R. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En Bedmar, E. J., González, J., Lluch, C. y Rodelas, B. Fijación de nitrógenos: fundamentos y aplicaciones. (9-16). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- De la Peña, C. y Pueyo, J. (2011). Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agro. for Sust. Develop.* 32(1), 65-91. DOI: 10.1007/s13593-011-0024-2.
- De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M. D., Dreyfus, B., Kersters, K. y Gillis, M. (1994). Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov.; *Sinorhizobium saheli* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 44(4), 715-733.
- De las Rivas, B., Marcobal, A. y Muñoz, R. (2006). Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiol.* 152(1), 85-93. DOI 10.1099/mic.0.28482-0.
- Debouck, D. G. e Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común. En López, M., Fernández, O. Fernando, y Schoonhoven, A. (Ed.). Frijol: Investigación y producción. Programa de las Naciones Unidas (PNUD); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). (7-41). Cali. Colombia.
- Del Campo y Mantilla, M. (2013). Pervivencia de los remedios vegetales tradicionales americanos en la terapéutica española actual. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid, España.

- Delgado, M. J., Garrido, J. M., Ligeró, F. y Lluch, C. (1993). Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol Plant.* 89(4); 824-829.
- Delgado, M. J., Ligeró, F., Lluch, C. (1994). Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. and Biochem.* 26(3), 371-376.
- Delgado-Salinas, A., Bibler, R. y Lavin, M. (2006). Phylogeny of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae): A recent Diversification in an Ancient Landscape. *Syst. Bot.* 31(4), 779-791. DOI: 10.1600/036364406779695960.
- Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A. y Lavin, M. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). **System. Bot.** 24(3), 438-460.
- Djordjevic, S. P., Chen, H., Batley, M., Redmond, J. W. y Rolfe, B. G. (1987). Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 169(1); 53-60.
- Dogra, T., Priyadarshini, A., Kanika, Kumar, A. y Singh, N. K. (2013). Identification of genes involved in salt tolerance and symbiotic nitrogen fixation in chickpea rhizobium *Mesorhizobium ciceri* Ca181. *Symbiosis.* 61(3); 135-143. DOI 10.1007/s13199-013-0264-9.
- Dong, R., Zhang, J. Huan, H., Bai, C. y Chen, Z. y Liu, G. (2017). High Salt Tolerance of a *Bradyrhizobium* Strain and Its Promotion of the Growth of *Stylosanthes guianensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 18(8); 1-17. DOI:10.3390/ijms18081625.
- Duque, E., Molina-Henares, A. J., De la Torre, J., Molina-Henares, M. A., Del Castillo, T., Lam, J. y Ramos, J. L. (2007). Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain KT2440. En Ramos, J. L. y Filloux, A. *Pseudomonas. A model system in Biology.* (227-251). Springer Science+Business Media. Dordrecht, Países bajos. DOI: 10.1007/978-1-4020-6097-7.
- Fernández-Mata, I.; Rodríguez-Gamiño, M. L.; López-Blanco, J. y Vela-Correa, G. (2014). Dinámica de la salinidad de los suelos. *Rev. Dig. E-BIOS.* 5(1); 26-35.

- Fox, M. A. White, J. P. Hosie. A. H. F. Lodwig, E. M. y Poole. P. S. (2006). Osmotic Upshift Transiently Inhibits Uptake via ABC Transporters in Gram-Negative Bacteria. *J. of Bacter.* 188(14); 5304–5307.
- Fox, M. A., Karunakaran, R., Leonard, M. E., Mouhsine, B., Williams, A., East, A. K., Downie, J. A. y Poole, P. S. (2008). Characterization of the quaternary amine transporters of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol Lett.* 287(2); 212-220.
- Freytag, G., Debouck, F. y Daniel, G. (2002). Taxonomy, Distribution, and Ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. E. U. A. Sida, Botanical Miscellany.
- Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Macgilp, S. y Young, J. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51(6), 2037-2048.
- Gevers, D., Cohan F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E...Swings, J. (2005) Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(9), 733-739. DOI:10.1038/nrmicro1236.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169(1); 30-39.
- Gómez-Padilla, E., López-Sánchez, R. C., Eichler-Loebermann, B., Fernández-Pascual, M., Alarcón-Barreroa, K. y Argentel-Martínez, L. (Octubre de 2009). Salt Stress Effects on Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) Varieties at Different Growing Stages. En S. A. (Presidencia), Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development. Tropentag 2009. Hamburgo, Alemania.
- González-Zertuche, L. y Orozco-Segovia, A. (1996). Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*. *Bol. Soc. Bot.* 58(1), 15-30.
- Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P. y Tiedje, J. M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(1), 81-91. DOI:10.1099/ijs.0.64483-0.

- Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V. y Blanco, C. (1999). Disaccharides as a new class of nonaccumulated osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. and Environ. Microbiol.* 65(4); 1491-1500.
- Gouffi, K., Pichereau, V., Rolland, J., Thomas, D., Bernard, T. y Blanco, C. (1998). Sucrose is a nonaccumulated osmoprotectant in *Sinorhizobium meliloti*. *J. of Bacteriol.* 180(19); 5044-5051.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Herrera-Cervera, J. A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H. V. Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J. y Sanjuan, J. (1999). At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30(1); 87-97.
- Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae. En Krieg, N. R. y Holt, J. C. (Ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. (234–236), Baltimore. E. U. A.: The Williams and Wilkins Co.
- Judd, W. S., Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. y Donoghue, M. J. (2002). *Plant systematics: a phylogenetic approach*, Sinauer Associates. Massachusetts. E. U. A. 287-292.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes. (2008). The genus name *Sinorhizobium* Chen *et al.* 1988 is a later synonym of *Ensifer Casida* 1982 and is not conserved over the latter genus name, and the species name *Sinorhizobium adhaerens* is not validly published. Opinion 84. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(8), 1973. DOI: 10.1099/ij.s.0.2008/005991-0.
- Kader, M. (2005). A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data. *Jour. & Proceed. of the Royal Soc. of New South Wales.* 138(1), 65–75.
- Kasinathan, V. y Wingler, A. (2004). Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 121(1);101-107.

- Kaymakanova, M. Effect of Salinity on Germination and Seed Physiology in Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Biotechnol. & Biotechnol. Equip.* 23(1), 326-329. DOI: 10.1080/13102818.2009.10818430
- Kinfemichael, G. A. (2011). The Response of Some Haricot Bean (*Phaseolus vulgaris*) Varieties for Salt Stress during Germination and Seedling Stage. *Curr. Res. Journal of Biol. Sci.* 3(4), 282-288.
- Kingman, S. M. (1991). The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations. *Nutr Res. Rev.* 4(1), 97-123.
- Knight, C. D., Rossen, L., Robertson, J. G., Wells, B. y Downie, J. A. (1986). Nodulation Inhibition by *Rhizobium leguminosarum* Multicopy *nodABC* Genes and Analysis of Early Stages of Plant Infection. *J. of Bacteriol.* 166(2); 552-558.
- Krebs, J., Goldstein, E. y Kilpatrick, S. (2013). Lewin's genes XI. Distrito Federal. México. McGraw-hill/Interamericana de México.
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R. y Clark, W. A. (1992). International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code: American Society for Microbiology. Washington, D. C. E. U. A. ASM Press.
- Laranjo, M. y Oliveira, S. (2011). Tolerance of *Mesorhizobium* type strains to different environmental stresses. *Anton. Leeuw.* 99(3), 651-662.
- Le Quéré, A., Tak, N., Gehlot, H. S., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., Rath, S., Sakrouhi, I., Rocha, G... Munive, J. A. (2017). Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. *BMC Genomics.* 18(1), 85. DOI:10.1186/s12864-016-3447.
- Lei, Y., Xu, Y., Hettenhausen, C., Lu, C., Shen, G., Zhang, C., Li, J., Song, J., Lin, H. y Wu, J. (2018). Comparative analysis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) leaf transcriptomes reveals genotype-specific salt tolerance mechanisms. *BMC Plant Biol.* 18(1); 35-49. DOI: 10.1186/s12870-018-1250-4.
- Llamas, F. y Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *AmbioCiencias.* 14(1); 5-18. DOI: 10.18002/ambioc.v0i14.5542.

- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M. M., Peart, J. M., Brewin, N. J., Bonilla, I. y Rivilla, R. (1995). Ionic Stress and Osmotic Pressure Induce Different Alterations in the Lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* Strain. *Appl. and Environ. Microbiol.* 61(10); 3701-3704.
- Lloret, J., Wulff, B. B. H., Rubio, J. M., Downie, J. A., Bonilla, I. y Rivilla, R. (1998). Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(3), 1024-1028.
- Lloret, L., Ormeño-Orrillo, E., Rincón, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M.A. y Martínez-Romero, E. (2007). *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new specie nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst. and Appl. Microbiol.* 30(1), 280-290.
- López, T. M. (2008). El regaliz. Actividad farmacológica, indicaciones y consejos para su uso. *Offarm.* 27(1), 11-96.
- Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. y 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*). *Int. J. of Sys. and Evol. Microbiol.* 58(1), 200-214. DOI: 10.1099/ijs.0.65392-0
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. y Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Inter. Jour. of Syst. and Evol. Microbio.* 57(3), 489-503.
- Martínez, V. N., López, V. C. A., Barsuto, S. M. y Pérez, L. R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Medio amb. y Des. Sust.* 5(3), 156-161.
- Marzocca, Á. (Septiembre, 2001) Malezas medicinales. Confederación Farmacéutica Argentina. La Materia Médica Argentina: El tránsito del siglo XX al XXI. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina.
- Medina. A. (2015). Diversidad molecular de cepas de *Ensifer* tolerantes a la salinidad, nodulantes de *Phaseolus filiformis*, en el norte de México. (Tesis de maestría). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Menna, P., Barcellos, F. G., Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on Multilocus Sequence Analysis of the

- 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2934-2950.
- Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., Domergue, O., Coopman, R., Bekki, A., Mars, M., Willems, A. y De Lajudie, P. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *Int. Journal of Syst. and Evol. Microbiol.* 60(3), 664-674.
- Miller, K. y Wood. J. (1996). Osmoadaptation by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50(1); 101-136. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.101.
- Miranda, E. V. (2018). Tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil utilizando peroxidasas del frijol de soya. (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma De México. Ciudad de México. México.
- Moreira, F. (2013). Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. En Moreira, F., Jeroen, E. y Bignell, D. E. (Ed.). Manual de biología de suelos tropicales. Ciudad de México, México. Instituto Nacional de Ecología.
- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C., y Stepkowski, T. (2004). Phylogenetic analysis of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 30, 720-732.
- Moulin, L., Munive, J. A., Dreyfus, B. y Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature*. 411(6840), 948-50.
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Lavire, X, N, C., Vial, L., Paulin, L., De Lajudie, P. y Lindström, K. (2014). Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. and Appl. Microbiol.* 37(3), 208-215.
- Nadeem, M. Li, J. Yahya, M., Wang, M., Ali, A., Cheng, A., Wang, X. y Ma, C. (2019). Grain Legumes and Fear of Salt Stress: Focus on Mechanisms and Management Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 20(4), 799. DOI: 10.3390/ijms20040799.
- Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., Deerfield, D. W., Nicholas, H. B. J. y Gauch, H. (2009). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Recuperado de: <https://genedoc.software.informer.com/2.7/>.

- Nick, G., De Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. y Lidstrom, K. (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *Int. Journal of Syst. Microbiol.* 49(4), 1359-1368.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. y Sanjuan, J. (2002). *Rhizobium tropici* Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient Nitrogen-Fixing Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *The Amer. Phytopathol. Soc.* 15(3), 225-232.
- Olivares, J. (2006). Nitrogenasa. Enzima clave en la fijación. En Bedmar, E. J., González, J., Lluch, C. y Rodelas, B. Fijación de nitrógenos: fundamentos y aplicaciones. (29-34). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). Granada. España.
- Østerås, M., Boncompagni, E., Vincent, N., Poggi, M. C. y Le Rudulier, D. (1998). Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon: Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(19); 11394-11399.
- Pajuelo, E., Rodríguez-Llorente, I. D., Lafuente, A. y Caviedes, M. Á. (2011). Legume–*Rhizobium* Symbioses as a Tool for Bioremediation of Heavy Metal Polluted Soils. En Khan, M. S., Zaidi, A., Goel, R. y Musarrat, J. Biomanagement of Metal-Contaminated Soils. (95-123). Springer Science+Business Media. Londres. Reino Unido. DOI: 10.1007/978-94-007-1914-9.
- Parker, M. A. (2002). Bradyrhizobia from Wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* Species in Northern Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4); 2044-2048. DOI: 10.1128/AEM.68.4.2044-2048.2002.
- Partida-Ruvalcaba, L., Velázquez-Alcaraz, L., Acosta-Villegas, T. J., Angulo-Gaxiola, B., Eduardo, C. (2006). Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de dos suelos salinos y de soluciones. *Terra Lat.* 24(1); 83-89.
- Payakapong, W., Tittabutr, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., Singleton, P. W. y Borthakur, D. (2006). Identification of two clusters of genes involved in salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3. *Symbiosis.* 41(1), 47-53.
- Perales, H., Aguirre J. (2008). Biodiversidad humanizada, en Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Distrito federal. México. Conabio.

- Phillips, R. D. (1993). Starchy legumes in human nutrition, health and culture. *Plant Foods Hum. Nutr.* 44(3), 195-211.
- Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E. y Martínez-Romero, E. (2009). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(1), 255.
- Rocha, G. (2012). Identificación y caracterización de cepas de *Sinorhizobium* del estado de Baja California sur y de cepas de *Rhizobium* del estado de Tlaxcala con potencial biotecnológico, y aisladas de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Rome, S., Fernández, M. P., Brunel, B., Normy, P. y Cleyet-Marel, J. C. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. Journal of Syst. Bacteriol.* 46(4), 972-980.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34(1), 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248.
- Rüberg, S., Tian, Z., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S. y Becker, A. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptative gene expression. *J. Biotech.* 106(2-3); 255-268.
- Ruiz, C., Martínez, M. de J., Romero, J. y Ríos, A. V. (2012). Primer reporte de *Specularius impressithorax* (Pic) (Coleoptera: Bruchidae) alimentándose de semillas de *Erythrina americana* miller en los Estados de Veracruz y Morelos, México. *Acta Zool. Mex.* 28(3).
- Sairam, R. y Tyagi, A. (2004). Physiology and molecular Biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86(3); 407-421.
- Sakrouhi, I., Belfquih, M., Sbabou, L., Moulin, L., Bena, G., Filali-Maltouf, A. y Le Quéré, A. (2016). Recovery of symbiotic nitrogen fixing acacia rhizobia from Merzouga Desert sand dunes in South East Morocco - Identification of a probable new species of *Ensifer* adapted to stressed environments. *Syst. Appl. Microbiol.* 39(2), 122-131.

- Santos, D., Lima-Bittencourt, C. I., Chartone-Souza, E. y Amaral, A. M. (2007). Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34(7), 463-473. DOI: 10.1007/s10295-007-0219-3.
- Schlegel, F. M. (1996). Ecología y enseñanza rural: nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas. Estudio FAO. Roma. Italia.
- Scholla, M. H. y Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. Journal of Syst. Bacteriol.* 34(1), 484-486.
- Secretaría de Economía. (2012). Análisis de la cadena de valor del frijol. Recuperado de: https://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/analisis_cadena_valor_frijol.pdf.
- Shamseldin, A., Nyalwidhe, J. y Werner, D. (2006). A proteomic towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Curr. Microbiol.* 52(5); 333-339.
- Soto, M. J., Sanjuán, J. y Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiol.* 152(11); 3167-3174. DOI: 10.1099/mic.0.29112-0.
- Soussi, M., Lluch, C., Ocana, A. (1999). Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress. *J. of Exp. Bot.* 50(340); 1701-1708.
- Spaink, H. (2000). Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54(1); 257-258. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.257.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A., Kämpfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rosselló-Mora, R... Whitman, W. B. (2002). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(3), 1043-1047. DOI: 10.1099/ijs.0.02360-0.
- Stepkowski, T., Czaplińska, M., Miedzinska, K. y Moulin, L. (2003). The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *proteobacteria*. *System. Appl. Microbiol.* 26(4), 483-494.
- Tak, N., Awasthi, E., Bissa, G., Meghwal, R. R, James, E. K., Sprent, J. S. y Gehlot, H. S. (2016). Multi locus sequence analysis and symbiotic characterization of novel *Ensifer*

- strains nodulating *Tephrosia* spp. in the Indian Thar Desert. *Syst Appl Microbiol.* 39(8); 534-545. DOI: 10.1016/j.syapm.2016.08.002.
- Tao, H., Brewin, N. J. y Noel, H. D. (1992). *Rhizobium leguminosarum* CFN42 lipopolysaccharide antigenic changes induced by environmental conditions. *J. Bacteriol.* 174(7), 2222–2229. DOI: 10.1128/jb.174.7.2222-2229.1992
- TeChien, C., Maundu, J., Cavaness, J., Dandurand, L. y Orser, C. (1992). Characterization of salt sensitive mutants of *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* strain C1204b. *FEMS. Microbiol. Lett.* 90(2); 135-140.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *N. Ac. Res.* 25(54); 4876-4882.
- Toledo, I., Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanum* sp.nov. a new *Sinorhizobium* species nodulating *Acacia* spp. in Mexico. *Syst. and Appl. Microbiol.* 26(1), 54-64.
- Toledo, I., Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a New *Sinorhizobium* Species Nodulating Native *Acacia* spp. in Mexico. *System. Appl. Microbiol.* 26(1), 54-64
- Trigo, M. M. y García, I. (1990). Morfología polínica de plantas ornamentales: leguminosas. *Acta Bot. Malacitana.* 15(1), 45-68.
- Tu, J. C. (1981). Effect of salinity on *Rhizobium*-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* 61(2); 231-239. DOI: 10.4141/cjps81-035.
- Valverde, Á., Velázquez, E., Gutiérrez, C. Cervantes, E., Ventosa, A. y Mariano, J. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Inter. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 53(6), 1979-1983.
- Valverde, Á., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A. E igual, J. M. (2003). *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. of Syst. and Evol. y Microbiol.* 53(6), 1979-1983.
- Vázquez, J. y Berrón, S. (2004). Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.* 22(1), 113-1120.

- Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M., Izaguirre-Mayoral, M., Bedmar, E. y Martínez-Romero, E. (2005). Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* 28(1), 702-716.
- Walter, E. D. (1941). Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from Soybeans. *Am. Chem. Soc.* 63(12). 3273-3276.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C...Trüper, H. G. (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37(4), 463-464.
- Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, M. E., Zhu, M. E. y Chen, W. X. (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *Int. Journal of Syst. and Evol. Microbiol.* 52(6), 2231-2239.
- Wei, W., Gu, Z. J., Zhang, B., Wang, L. y Yang, S. S. (2007). Cloning and complementation analysis of *greA* gene involved in salt tolerance of *Sinorhizobium meliloti*. *Annals of Microbiol.* 57(2); 289-291.
- Wei, W., Jiang, J., Li, X., Wang, L. y Yang, S. S. (2004). Isolation of salt-sensitive mutants from *Sinorhizobium meliloti* and characterization of genes involved in salt tolerance. *Lett. in Appl. Microbiol.* 39(3), 278-283.
- Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N. y Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal transfer *Ensifer adhaerens* Cassida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. *Int. Journal of Syst. and Evol. Microbiol.* 53(4), 1207-1217.
- Wood. J. (2011). Bacterial Osmoregulation: A Paradigm for the Study of Cellular Homeostasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 65(1); 215-238.
- Xu, K. W., Penttinen, P., Chen, Y. X., Chen, Q. y Zhang, X. (2013). Symbiotic efficiency and phylogeny of the rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala* in arid-hot river

- valley area in Panxi, Sichuan, China. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(2); 783-793. DOI: 10.1007/s00253-012-4246-2.
- Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al 1988 and *Sinorhizobium morelense* Wang et al 2002 is a junior synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination “*Sinorhizobium adhaerens*” (Casida 1982) Willems et al 2002 legitimate? Request for an opinion. *Inter. Journal of Syst. and Evol. Microbiol.* 53(6), 2107-2110.
- Young, J. P. W. y Haukka, K. E. (1996). Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133(1), 87-94.
- Zahran, H. H. (1992). Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *J. Basic Microbiol.* 32(4), 279-287.
- Zahran, H. H., Sprent, J. I. (1986). Effects of sodium-chloride and polyethylene-glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta.* 167(3), 303-309.
- Zakhia, F. y De Lajudie, P. (2001). Taxonomy of rhizobia. *Agron.* 21(6), 569-576. DOI: 10.1051/agro:2001146.
- Zhenghao, X. y Meihua, D. (2017). Identification and control of common weeds. Volume: 2. China. Zhehijan University Press.
- Zhu, J. K. (2001). Plant tolerance. *Trends plant Sci.* 6(2), 66-71.

Anexos

Anexo 1

Medios de cultivo.

Base-K	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1.67 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.87 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.29 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.48 g
Agar	10 g
Ácido málico ($C_4H_6O_5$)	4.5623 g
Ajustar a pH 6.9 con hidróxido de potasio (KOH)	

Base-K modificada	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1.67 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.87 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.29 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.48 g
Agar	10 g
Fuente de carbono	A 35 mM
Ajustar a pH 6.9 con hidróxido de potasio (KOH)	

Tryptona-Extracto de levadura	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Tryptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	13 g /10 ml
Agar	10 g

Extracto de levadura-Manitol	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Manitol ($C_6H_{14}O_6$)	10 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	0.66 g
Glutamato de sodio	0.5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.05 g
Sol'n T (Sulfato de magnesio ($MgSO_4$))	10 ml (10 g/L)
Sol'n U (Cloruro de calcio ($CaCl_2$))	1 ml 0.04 g (10 g/L)
Sol'n V (Cloruro de hierro ($FeCl_3$))	1 ml 0.004 g (4 g/L)
Extracto de levadura	1 g
Agar	10 g
Ajustar a pH 7.5 con ácido clorhídrico (HCl) (0.1N)	

Rojo de Fenol y Manitol	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Peptona de caseína	10 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5 g
Manitol ($C_6H_{14}O_6$)	5 g
Rojo de fenol	0.018 g
Agar	10 g

MM9-Cit	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Citrato de sodio ($Na_3C_6H_5O_7$) (0.2M)	100 ml
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	1 ml
Citrato de hierro ($Fe(C_6H_5O_7)$)	1 ml
10X (M9)*	10 ml
Agar	10 g
H ₂ O mineral	500 ml
H ₂ O	c. b. p.

*10X M9	
Reactivos	Cantidad (para 10 ml)
Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	0.7 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.3 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.05g
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	0.1 g

Luria-Bertani (LB)	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Agar	10 g

MMAB	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	3 g
Fosfato disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	1 g
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	1 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0.3 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.15 g
Cloruro de calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.01 g
Sulfato de hierro ($FeSO_4$)	0.0025 g
Microelementos 100X	10 ml
Agar	10 g

Microelementos 100X	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.25 g
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.07 g
Sulfato de cobalto ($CoSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.014 g
Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.0125 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.003 g
Molibdato de sodio ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.05 g

Solución nutritiva Jensen (libre de nitrógeno)	
Reactivos	Cantidad (para 1L)
Sol'n P:	10 ml
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	20 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	20 g
Sol'n Q:	10 ml
Cloruro de sodio ($NaCl$)	20 g
Sol'n R:	20 ml
Fosfato dicálcico ($CaHPO_4$)	20 g
Sol'n D:	10 ml
Cloruro de hierro ($FeCl_3$)	4 g
Oligoelementos (1X):	1 ml
Ácido bórico (H_3BO_3)	2.26 g
Sulfato de Manganeso ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	2.03 g
Sulfato de zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.22 g
Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.08 g
Molibdato de sodio ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.09 g
H ₂ O destilada	949 ml

Anexo 2

Números de acceso y cepas utilizadas para el análisis filogenético de los fragmentos de los genes *nodC* y *nifH*.

Cepa	Número de acceso (<i>nodC</i>)
<i>Rhizobium phaseoli</i> VIAD8G	KF638394.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LCS0313	JF792202.1
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	AF217268.1
<i>Rhizobium phaseoli</i> ATCC14482	HM441255.1
<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>phaseoli</i> RP346	DQ413008.1
<i>Rhizobium etli</i> RP218	DQ413007.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LEV0613	JF792204.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> LCS0306	JF792203.1
<i>Rhizobium lusitanum</i> P2-2	HM852100.1
<i>Ensifer</i> sp. CEQ1	KM192239.1
<i>Ensifer fredii</i> NXT3	CP024309.1
<i>Ensifer americanum</i> CCGM7	CP013053.1
<i>Ensifer americanum</i> CFNEI 73	APG93270.1
<i>Ensifer meliloti</i> bv <i>mediterraneanse</i> 4H41	ABC67303.1
<i>Ensifer</i> sp. GVPV12	FJ462796.1
<i>Ensifer</i> sp. GVPV04	FJ462797.1
<i>Ensifer</i> sp. SCAU224	JX073925.1

<i>Ensifer fredii</i> bv. <i>mediterraneanse</i> GR-06	AF217269.1
<i>Ensifer</i> sp. CHU2	KM192238.1
<i>Ensifer</i> sp. STA2	KM192236.1
<i>Ensifer</i> sp. STA1	KM192235.1
<i>Ensifer</i> sp. CHU1	KM192237.1
<i>Ensifer</i> sp. ATQ1	KM192232.1
<i>Ensifer</i> sp. BR816	AJ518946.2
<i>Ensifer</i> sp. SCAU213	JX073921.1
<i>Ensifer</i> sp. SCAU191	JX073914.1
<i>Rhizobium</i> sp. SCAU203	KF613160.1
<i>Ensifer teranga</i> CB3126	KJ128398.1
<i>Rhizobium gallicum</i> RP421	DQ413005.1
<i>Rhizobium gallicum</i> RHM47	JQ085262.1
<i>Mesorhizobium amorphae</i> CCNWGS0123	JF907686.1
<i>Mesorhizobium septentrionale</i> W73	JF730159.1
<i>Ensifer aridi</i> LMR013	KP993273.1
<i>Ensifer aridi</i> LMR001	KP993269.1
<i>Ensifer aridi</i> TW10	KT803837.1
<i>Ensifer aridi</i> JNVU TP6	KT803816.1
<i>Ensifer sahelii</i> LMG 7837	GU994073.1
<i>Ensifer meliloti</i> 1021	GQ507335.1

Cepa	Número de acceso (<i>nifH</i>)
<i>Ensifer</i> sp. STA2	KM192245.1
<i>Ensifer</i> sp. STA1	KM192244.1
<i>Ensifer</i> sp. NG07A	KJ921066.1
<i>Ensifer</i> sp. FG01	KJ921062.1
<i>Ensifer fredii</i> GR64	JN034672.1
<i>Ensifer meliloti</i> bv. <i>mediterraneanse</i> 4H41	DQ333890.1
<i>Ensifer adhaerens</i> R7-601	KR075968.1
<i>Ensifer</i> sp. LILM2009	FJ792815.1
<i>Ensifer</i> sp. CEQ1	KM192248.1
<i>Enisfer americanum</i> CFNEI 73	CP013109.1
<i>Ensifer americanum</i> 23C95	JN624732
<i>Enisfer americanum</i> 23C40	JN624728.1
<i>Ensifer</i> sp. SCAU224	JQ362368.1
<i>Ensifer</i> sp. CHU2	KM192247.1
<i>Ensifer</i> sp. ATQ1	KM192241.1
<i>Ensifer</i> sp. ATQ3	KM192243.1
<i>Ensifer</i> sp. CHU1	KM192246.1
<i>Ensifer</i> sp. SCAU228	JQ362361.1
<i>Mesorhizobium robiniae</i> CCNWYC147	EU849574.1
<i>Mesorhizobium robiniae</i> CNWYC120	EU849574.1
<i>Mesorhizobium robiniae</i> CCNWYC132	EU849573.1

<i>Mesorhizobium loti</i> R46072	FR850769.1
<i>Mesorhizobium alhagi</i> CCNWXJ05 2	FJ481882.1
<i>Mesorhizobium septentrionale</i> CCBAU11244	EU130419.1
<i>Mesorhizobium shangrilense</i> CCBAU65321	EU872234.1
<i>Mesorhizobium tarimense</i> CCBAU83321	EU252608.1
<i>Rhizobium undicola</i> Ouran110	JF738072.1
<i>Rhizobium gallicum</i> SPT1-23a	KJ790195.1
<i>Rhizobium tarimense</i> AS1-101a	KJ790194.1
<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> Mim1	EU386142.1
<i>Rhizobium etli</i> bv. <i>mimosae</i> IE4771	AY907497.1
<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSo 661	KY748058.1
<i>Rhizobium esperanzae</i> CNPSo 668	KY748056.1
<i>Rhizobium acidisoli</i> FH23	KJ921065.1
<i>Rhizobium sophoriradicis</i> CCBAU03470	KM396547.1
<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU65647	GU211767.1
<i>Rhizobium etli</i> RP330	DQ413018.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Gut 2	AB740522.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Tsy 2	AB740513.1
<i>Rhizobium leguminosarum</i> Tsy 5	AB740514.1
<i>Ensifer aridi</i> JNVU TP6	JN571912.2
<i>Ensifer aridi</i> JNVU TW10	KT803836.1
<i>Ensifer saheli</i> LMG 7837	LNQB01000089.1

Ensifer aridi LMR001

KP993264.1

Ensifer aridi LMR013

KP993267.1

Ensifer meliloti 1021

AE006469.1

Anexo 3

Secuencia completa del gen gentamicina 3-N-acetyltransferasa (*accC1*).

```
atgttacgcagcagcaacgatgttacgcagcagggcagtcgccctaaaacaaagttaggtggctcaagtatgggcatcattcgcac  
atgtaggctcggccctgaccaagtcaatccatgcgggctgctcttgatctttcggtcgtgagttcggagacgtagccacctactcc  
caacatcagccggactccgattacctcggaacttgctccgtagtaagacattcatcgcgcttgctgccttcgaccaagaagcgggt  
gttggcgctctcgggcttacgttctgccagggttgagcagccgcgtagtgagatctatatctatgatctcgagctccggcgagc  
accggaggcagggcattgccaccgcgctcatcaatctcctcaagcatgaggccaacgcgcttggtgcttatgtgatctacgtgcaa  
gcagattacggtgacgatcccgagtggtctctatacaaagtgggcatacgggaagaagtgatgcactttgatatcgaccaagt  
accgccacctaa
```

Amplificación del cassette de gentamicina en diferentes transconjugantes.

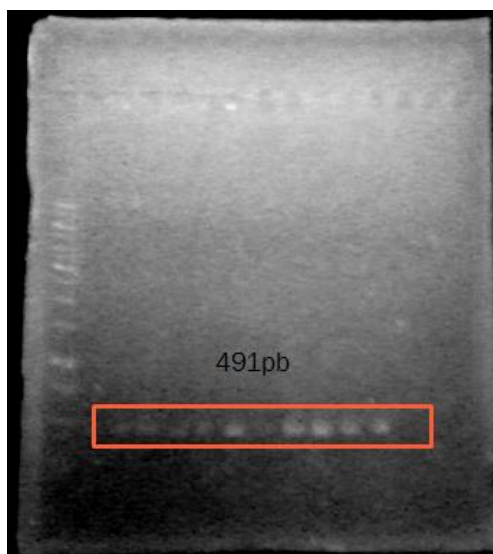


Figura 82. Fotografía de un gel de agarosa, donde se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 500 pb, correspondiente al cassette de gentamicina incluido en el transposón del pUT-mini-Tn5-Gm.

Anexo 4

Predicción de promotores.

Resultado de la predicción de promotores generado mediante un análisis bioinformático mediante la aplicación *GeneQuest* de la paquetería DNASTAR Lasergene, versión 15.3.

```
> test sequence
Length of sequence-      5056
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      9
Promoter Pos:   4832 LDF-   3.95
-10 box at pos.   4817 acctataat Score    69
-35 box at pos.   4800 ttagcgc  Score     9
Promoter Pos:   3117 LDF-   1.90
-10 box at pos.   3102 gactattat Score    57
-35 box at pos.   3081 ttgagc   Score    21
Promoter Pos:    583 LDF-   1.88
-10 box at pos.    568 ttctaaaat Score    74
-35 box at pos.    550 tgtaca   Score    10
Promoter Pos:   1610 LDF-   1.65
-10 box at pos.   1595 ctctatcct Score    49
-35 box at pos.   1575 ttttcgc  Score    28
Promoter Pos:   3666 LDF-   1.34
-10 box at pos.   3651 gaccaatat Score    24
-35 box at pos.   3628 tttaaca  Score    47
Promoter Pos:   2649 LDF-   1.18
-10 box at pos.   2634 cggaatgct Score    28
-35 box at pos.   2617 tttctgc  Score    28
Promoter Pos:   1930 LDF-   0.98
-10 box at pos.   1915 agctatttt Score    49
-35 box at pos.   1890 tttatc   Score    17
Promoter Pos:   1046 LDF-   0.73
-10 box at pos.   1031 acctacgat Score    37
-35 box at pos.   1014 tcgaga   Score     6
Promoter Pos:    169 LDF-   0.66
-10 box at pos.    154 tggtacaac Score    40
-35 box at pos.    135 tcaaca   Score     6
```

Anexo 5

Secuencia del fragmento de 5056 pb del operón del transportador ABC de *Ensifer aridi* LEM451.

cagtcgatcgagactgcatattcgtgctgctcacttactaactacagtcgcccttcgcacaaactaaagttccttcgagggattgccgaagaccaggac
cgccgactcatcgaggcgtggccacgggatcaacatcgtttaccgcttggtacaacatcctaacgaggcctatgtaaaggcgcgctactcgaagcacttcga
aatcaccgaggatgcgctcacatggatgatcgatcgaccgagcatcttcaccgcatcatcgaggcgatctgcaacgagcgtctgactgctgtggccagtcg
agccgccccaaactgacgttctcgtcgcggttgggaccgccccgcgacgtcgccaggcgctagcgctccagcgcgcaagcctcggaatctcaa
gctgcttctcgggggatgctatggcttgcgagggagttaaagcagatctcccgctgcttatggaaacggggggtggaggcatgtgctgaaactac
gcgaataaagactagcggataagtgccgcaaatgtacatagcagtcgaccttctaaatttgatgccgaaagcagtgacagggcagcacacgagcaccgc
agaaggaccaaaggttttggttactggccccgcgcaacagcgaggcaggtgatgaccttgcgctcatgcaacggaatggaagaggcctttctcgag
cgatatttctgatcgatgcttccactccctcaaaggcgcttaccgatcgggatattgagcagatttggcgccgcgacttctcgaggagcaatgcgagt
tcttcgttggggcccgagttacctcggcattcgccgcgctgcaacggcgcgagacattcccgctcgtgtcatagaggacgggttctcgctcgccacgc
gccagcgccagcgcacccctccctctcgctggcgctcgacagccgcacgcctatttcgactgctgcaaggcatccgacctcgagacgctgtcaacacc
tacgatttcgagggggatcagccgctgatggcgctgcccggggcgccataaagctcctcttgagcggggtattagcaatacaatgacgcgcgaccaa
acggcagaagaggcctatggcgaaaagacacgcaagcgctgtgtcatcgggcaagtgaggatgatgcctcgattcgctatggttccttaccgcatg
agcaacaacgacctggtcgggctcgcccgggagcagcccgctcgcgagatccttacaacccgacccggacggttttgagtcgttaccccggcgaa
gtccgaccccccggaagtcgcacatctctcgccgatctgacggaaggctgcccgtctcagaggcgctgctgacggtcgacctatgtctatacgtacgtc
gcttgcgggttcgaggcgattctccgcgcatcgaggtgacgaccgcgctgccccttttactccggatggggactgacggacgatcgccagccaaaccc
acgtcgcgacgcgcttgagcatagaggcgcttttcgccggcgctatctctctatctcgtacttcgatccgaaacggagcgcaaacatcattcgaag
caaccgtcgccgaatcaaaaagcaactcggggagcaagaggcatggtctgcccacacccgagcatggggcggtggggccttacggcttctcgg
ctggcgccatctctgaccgcccgcgtcgaccggcgatccggcatctggggaatgaccgcatgctgaggatttcagagccgatcccatccgcttctccgc
agcctctcgaccgaggtcaggattatcgccgcattctttatcccttcgggtgactgacgtgagctattttccactcatgtccgtgtcgtcgccgcgcttctg
tgcgagagatgtccacgcttcgggtcaaaagccggcggtatctggcgctgctgacccggcagcgcatatctgctgatgacgttcatcttcaggcg
atcgcccgacgcccggcgctcggtaccagcttcgcttcttcgccaccggctatatgccttcagttctatcaggcgatgaccggctatttgaatagcgcg
gtccgcgcaaaaggcgctgctcagctaccgaatgtcgcgccatcgacacgcgtcgcgcttcatctccagggtgctgaccaccactctggtcgctt
tcactgtcgtcgccaccatcgtcgacatcggggtgaaaccaacctccattggcgctccatcctggaagccgtggcgatggcgtcctcttcggccttggc
gtagcgatgatcaatgccgtgctgttctcaaataccgctttatgagcaggtctttggaatcgtaacgcccgtcttctctatctccggtgtcttctctgcccga
ttctattccgaatccctaccgggatctcgtcgtcgtcaatccgctcgtccacatcatcatgggcttcgacaggggttctatccggaatatcgggcaatcgccctc
gacatggattacctttacggaatcgcttttgacattgttttcggaatgcttgtgtccctctcccgaagacgctgagaaacgaatgatccggttcgaacag
gcgacgaatatgccccacaaaaggcatcaagaagccgatcatcgaggatgcctccctgacccctcaacgggggcaagagcgtggccttctcgccgcaa
cggcgccggcaagtcgacgctgctccggctgattgcggcgctatcaagctcgacaaaggccgaatctcccgccggtgaagatctcctggcctcggcctt
cgccggcagtttcaaggctcgatgacaggcgaacagaatgtcgattcgtcgctcgatctacggcgtcgatacggagcaattgatcgcttacgtcgaggatt
tcgccgagctcgccggttcttcaaggcgccgtcgccacatctcctcgccgatgaaggcgccgctcgcttcgggtgagcatggcgctaaacttcgactat
tatctcgtcgacgaattaccgcggttggtgactcaaatttaagaaaaaatgtcaggctgtcttcgagaccaagctccaggattccgacgtaatcatggtttcgca
cagaccggcacgatccgcaactattgtactgcggcgctgctggtgaaaaaggaaagctgacttattatgaagatgtcgaagacgcatccgcgacgacga

cagaaacatgaggggaatttagatggccgtgagtaacgaggggaatcgaacagattcggaaaccgcgcgcccgaacgataccatgacggccaacggc
gatgccaaaagcaaggggtattgccattcttgaggggctgctcggcgagagagtgaccgggtcattccgtgctgcgagcggcacgataggatcgagccggt
tgaaacagttggagtggaagcccacctggctgaagaagctgcgcctgcgccacacgatcatggcgccctccttcttgcccttgccggcaacgttc
gcctcgctttacatggccttcacgcgcggaccaatatcacagcacgacgtcttttgcggtgcgagcatcgaaggcggcgtttcgaccgacattctcggcatg
ttcactcaggcttcggcgcgagcacggtttcgacagctacatcctaattgactacatactgagcgagcggtggctgcggatgccgaccgtcggttcaaa
ggaggatgtctacgccaccccgggctcgtactatttctacggcatcggctccgacctgcgagcaggacaagctcgcctattggcgcatatggtgagcgtc
aacttcgaccacgcctccggcatcatgcaggaaccgtcaaggccttcgacccgaacaggcgcaagcgatttcgagttcatcgtcaaccagagcgacaac
ctcgttaacagcctctcgtttccgcgtaacgacgtgctgagagccgcgagggacgaggtgctggcgggcgagggcgcccttcgaaggcgctcggc
gctgcgcgactaccgcgacaagtctcaggaaatcagtcggaagaaggcgcaagctcgcctgcaattgatcggcggcctagagggagaactgacgaag
ctgaacgcagaccttgccgcggccaaaagccagatgagcgagggcacaccacgcacccgcgtgctcaagaccgcacgcagagccttgagcaccagatcg
ccgttgagcgccagcggctcgggtgcggcgaaaggaaacagctatccaccgcagacgacgctaattccgcggatgtcgcggccgcacgcctcagttgag
gagctggaaactgaacgcgaattcgccgagcgtgcttataccgcgcgtaggggtctcttgagaaagctcgcacgcagggcgaacaatcgccaacgctac
gcctcttcacgcagccaacgctttccgaattggcgcaatatccgagccggttgctgaacgtattgcttgacgcttgccctccttttgctggggaatcggagt
aatgagttattacaattatcgcgatcgggcttagttcttgctgagaagaacccccaccacgaggcctcgttgagatcttctccgcgatggcgagggcga
atctacgccttaattcggctgaaggtaacgaatgagtggtgcgacgttagcgtggctcattccgacctataatcgaacatcactcttacgaagagcactcaat
cagtcgccagcaaacctcagagcggccgaagtaatcatcgttgacgattgttcgagagcgtaattcttgaagaggtgaggtcaatcgttctgattttcgtc
gcgcctcagcgtcagattgatcgtcaacgagacaaatagcggcgcaaatcattcaaggaataagggaattttcgcgcgaccggccgttacgtg

