



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



**“Diversidad molecular de cepas de *Sinorhizobia*
tolerantes a la salinidad, nodulantes de
Phaseolus filiformis, en el norte de México”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:

Q. F. B. Arturo Medina Malagón

ASESOR DE TESIS:

D. C. José Antonio Munive Hernández

PUEBLA, PUE.

SEPTIEMBRE, 2015

“Los sueños parecen al principio imposibles, luego improbables, y luego, cuando nos comprometemos, se vuelven inevitables”

Mahatma Gandhi

El presente trabajo forma parte del proyecto internacional **ECOS-NORD (M08-A02)** “Genómica comparativa y funcional de poblaciones de rizobia de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.)”; el cual se lleva a cabo en colaboración entre el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana (LEMM), del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, el Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moleculaire (LMBM) en Rabat, Marruecos y el Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes (LSTM) en Montpellier, Francia.

Este proyecto fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante el otorgamiento de una beca durante los dos años de maestría.

La culminación de esta tesis se hizo gracias a la beca otorgada por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP).

AGRADECIMIENTOS

“Hay momentos en la vida que son especiales por sí solos, pero compartirlos con las personas que quieres los convierte en mágicos e inolvidables”

Primeramente gracias a DIOS por permitirme culminar un objetivo más en mi vida; un objetivo que, si bien no fue sencillo, estuvo lleno de sorpresas. Mismas que me ayudaron a madurar y dirigir mi vida al lugar en el que ahora me encuentro.

Gracias a Nico y Luz, mis padres; que me han enseñado a no rendirme nunca, a seguir en la lucha para alcanzar mis sueños. Por su apoyo incondicional y por estar a mi lado siempre. Quiero que sepan que me siento orgulloso de la familia que hemos logrado.

A esa gran familia, Luzma, Tati, Rica, Vertiz, Sofi, Richi, Don Nico, Dianita, Franky y La Pecas; el núcleo principal que siempre me apoya, aconseja y con el que compartimos toda una vida. Gracias por alentarme a terminar esto y por ser la mano que me ayuda a levantarme cuando caigo. De igual manera, gracias al resto de mi familia, que por espacio no escribo (tíos, primos, sobrinos y abuelo), pero siempre llevo en mi corazón.

A mi chaparrita chula. Uno nunca sabe los planes que Dios tiene para cada quien, pero son perfectos. Gracias Gaby por enseñarme a compartir, por crecer conmigo, por aceptar pasar el resto de nuestra vida juntos. Este logro también te lo debo a ti. Eres la pareja perfecta que siempre estás donde más te necesito, siempre dices las palabras exactas y las frases correctas; gracias por las risas, pero sobre todo por los momentos y la felicidad que hemos compartido. TE AMO CHAPARRA. Gracias también por el apoyo y cariño de tus papis, Gabriel y Minerva.

Honor a quien honor merece, gracias también al Dr. Munive por aceptarme en su equipo de trabajo, por guiarme y enseñarme el microscópico mundo de los rizobios. A mi comité, Dra. Paty Lozano, Dr. Jesús Muñoz, Dr. Luis Ernesto y Dr. Antonino Baez, por sus consejos, dudas, correcciones. Al Dr. Jesús Olguín y el Dr. Nacho, gracias por creer en mí, por su apoyo, consejos y enseñanzas. A todos les agradezco sobre todo su amistad. Eso es lo mejor que me llevo.

A los Rizobios, Robert, Lita, Dana, Yuri, Sina, Tlachi, Toñito y David (CEUNI); los Miguelandis Dr. Miguel, Vale, Vicky, Thaly, Lili, Lau, Chucho, Gis y Gama; las Comelibros, Dra. Rebeca, Nancy, Mony y Mayra; mis amigos Guanajuatenses, Juli, Zataraz, Chino, Teban, Charmín, Adrián, Lucy, Choche, Dan, Chumby, Efra, Wizard, Cuellar, Chio, Bómboro y la Sra. Rosalba. Mis amigos en Puebla, Beth, Miriam, Elenita, Gerardo, Netza; los Conacyt's, Joel, Pablo, Migue, Saúl, Carlos, Paco, René, Lalo bueno y malo. A Verito en la biblioteca, Ángeles y Mari en la secretaría, Paty la contadora y todos los doctores y maestros que han contribuido en mi formación. A todos ustedes les agradezco los lazos formados y por hacer de esta aventura, llamada “Maestría”, un momento memorable en mi vida. ¡Gracias infinitas!

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
2.1 LEGUMINOSAS	3
2.1.1 El género <i>Phaseolus</i>	3
2.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO	6
2.3 GENERALIDADES DE LOS RHIZOBIA	7
2.4 TÉCNICAS MOLECULARES DE CLASIFICACION BACTERIANA	8
2.5 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN RHIZOBIA-LEGUMINOSA	9
2.5.1 Quimiotaxis	10
2.5.2 Adhesión celular	11
2.5.3 Curvatura de los pelos radiculares y formación del canal de infección	12
2.5.4 Diferenciación en bacteroides	13
2.6 SALINIDAD	14
III. ANTECEDENTES	16
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. OBJETIVOS	19
5.1 OBJETIVO GENERAL	19
5.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 CEPAS BACTERIANAS	20
6.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN	20
6.2.1 Medios YM y YMA	20
6.2.2 Medio Jensen libre de nitrógeno	20
6.2.3 Agar agua	21
6.3 PRUEBAS DE TOLERANCIA	21
6.3.1 Salinidad	21
6.3.2 Elevadas temperaturas	22
6.3.3 Diferentes valores de pH	22
6.4 ENSAYOS CON PLANTAS	23
6.4.1 Planta de frijol	23
6.4.2 Desinfección y germinación de semillas	23
6.4.3 Preparación del inóculo	23
6.4.4 Siembra e inoculación	23
6.4.5 Evaluación de los parámetros	23
6.4.6 Longitud y peso seco de las plantas	23
6.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES 16S rDNA, <i>glnA</i> y <i>thrC</i>	24

6.5.1	Gen 16S rDNA	24
6.5.2	Gen <i>glnA</i>	24
6.5.3	Gen <i>thrC</i>	25
6.6	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	25
6.6.1	Alineamiento, análisis y generación de árboles filogenéticos	25
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1	PRUEBAS DE TOLERANCIA	27
7.1.1	Tolerancia a la salinidad	27
7.1.2	Tolerancia a temperaturas elevadas	31
7.1.3	Tolerancia a diferentes valores de pH	34
7.2	EFFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN EL DESARROLLO VEGETAL Y LA NODULACIÓN	38
7.2.1	Capacidad infectiva (Formación de nódulos)	39
7.2.2	Longitud y peso de la parte aérea y de la raíz	41
7.3	MLSA	44
7.3.1	Amplificación del gen 16S rDNA y los genes de mantenimiento <i>glnA</i> y <i>thrC</i>	45
7.3.2	Árboles independientes	45
7.3.2.1	Gen <i>atpD</i>	46
7.3.2.2	Gen <i>dnaK</i>	47
7.3.2.3	Gen <i>glnII</i>	48
7.3.2.4	Gen <i>gyrB</i>	49
7.3.2.5	Gen <i>recA</i>	49
7.3.2.6	Gen <i>glnA</i>	50
7.3.2.7	Gen <i>thrC</i>	52
7.3.2.8	Gen 16S rDNA	52
7.3.3	Árboles concatenados	53
VIII.	CONCLUSIONES	57
IX.	BIBLIOGRAFÍA	58

I. RESUMEN

El mayor estrés abiótico que presenta la agricultura a nivel mundial es la salinidad del suelo, dicha condición es tan antigua como la tierra misma y el ser humano ha contribuido a que esta circunstancia se vea agravada a lo largo de toda su historia por las prácticas de cultivo tales como la irrigación y el uso de fertilizantes químicos. Estudios previos han evidenciado que altas concentraciones de sal causan un desequilibrio iónico y un estrés hiperosmótico en la planta, conduciendo a un daño molecular, reducción del crecimiento, raquitismo e incluso la muerte. La sensibilidad a la sal puede ser atribuida a las acumulaciones de iones tóxicos en diferentes tejidos de la planta, los cuales interfieren en algunas actividades enzimáticas. Si bien es cierto que la aplicación de fertilizantes nitrogenados a los cultivos incrementa su tolerancia a la salinidad, también los costos son muy altos y perjudiciales para el suelo. Es por ello, que los estudios sobre la fijación biológica del nitrógeno, sus mecanismos y fenómenos asociados a ella han adquirido una gran importancia en las últimas décadas.

De igual manera, las leguminosas, han tomado una gran relevancia, ya que pueden contribuir a la economía mundial del nitrógeno mediante el establecimiento de una relación simbiótica con especies bacterianas pertenecientes al grupo de los rizobia y, con ello, incrementar la productividad del suelo. No obstante, se sabe que el estrés salino reduce la nodulación de leguminosas al inhibir los eventos simbióticos tempranos. Es por ello que se considera fundamental analizar dicha interacción a diferentes concentraciones de sal, reproduciendo así, las diferentes condiciones que suelen presentar los suelos salinos empleados para la agricultura.

El objetivo principal de este trabajo es la caracterización de un grupo de bacterias pertenecientes al género *Ensifer*, las cuales fueron aisladas de una leguminosa silvestre (*Phaseolus filiformis*) en la playa de Guadalupe en el estado de Baja California, México; empleando, para ello, la amplificación del gen 16S rDNA y los genes de mantenimiento *glnA* y *thrC*, para realizar un análisis multilocus en conjunto con las secuencias de los genes *atpD*, *rpoB*, *gyrB* y *recA* obtenidas de la base de datos. Cabe destacar que en la relación filogenética obtenida, el grupo de bacterias estudiadas las agrupa en un clúster individual muy cercano a *E. saheli*, *E. teranga* y *E. kostiensis* pero sin pertenecer a ninguna de estas especies; por lo que se puede concluir que es una especie nunca antes descrita.

De igual manera, y por el lugar del que provienen los aislados, se decidió analizar la tolerancia que estas bacterias pudieran tener, en vida libre, a diferentes valores de pH, temperatura y salinidad; cuantificándose las UFC mediante la técnica de GSPM, para cada uno de los tres tratamientos. Los resultados sugieren que las condiciones empleadas para los tres tratamientos no afectan el crecimiento bacteriano, a excepción de un pH ácido (5.3) el cual inhibe el crecimiento de algunas de las cepas de interés.

Por último, y partiendo de los resultados anteriores con respecto a la salinidad, se decidió analizar la interacción de estas bacterias con el frijol común (*Phaseolus vulgaris* cv. Jamapa) con las mismas condiciones salinas del tratamiento anterior; cuantificando sólo los parámetros de desarrollo vegetal (longitud y peso de la raíz y parte aérea), así como la formación de nódulos. Los resultados indican que las plantas inoculadas con las cepas de interés son capaces de formar nódulos a una concentración de 0.01 M de NaCl; mientras que las plantas son capaces de sobrevivir por un período de 28 días a una concentración de 0.05 M de NaCl.

II. INTRODUCCIÓN

De manera general, la agricultura como tal, comenzó aproximadamente hace unos 12,000 años en sólo cuatro regiones del mundo, el actual territorio de México fue una de ellas. Es por ello, que México es reconocido como uno de los centros de origen, domesticación y diversificación de especies vegetales fundamentales para la subsistencia humana, aportando un importante número de especies vegetales domesticadas para su uso (Perales y Aguirre, 2008).

La domesticación de plantas es la resultante de un proceso que combina la evolución natural y la selección empírica practicada por el hombre, originando cultivos domesticados a partir de sus progenitores silvestres (Hernández *et al.*, 2013). Actualmente, alrededor de la mitad de las calorías que consumen los mexicanos proviene de especies originarias y domesticadas en el país, como es el caso del maíz, diversos frijoles, calabazas, el aguacate, la vainilla y otras especies importantes.

La mayor parte de lo que se conoce sobre las especies que estuvieron asociadas a los antiguos pobladores del país, proviene de tres sitios: la cueva de Guilá Naquitz cerca de Mitla, en Oaxaca; las cuevas de Coxcatlán y San Marcos cerca de Tehuacán, en Puebla, y las cuevas de Romero y Valenzuela cerca de Ocampo, en Tamaulipas (Smith, 1997) (Fig. 1) (Tabla 1).



Fig. 1. Mapa de México que muestra las áreas geográficas de domesticación de frijol común (//////), maíz (|||||) y calabaza (◇◇◇), así como la ubicación aproximada de las cuevas de Ocampo, Tamaulipas; Tehuacán, Puebla y Guilá Naquitz, Mitla, Oaxaca (Adaptado de Smith,2001; Smith, 2005; Kwak *et al.*, 2009).

Tabla 1. Registro más antiguo (años a. C.) de las principales especies mesoamericanas domesticadas.

Especie	Sitio arqueológico		
	Guilá Naquitz, Oaxaca	Tehuacán, Puebla	Ocampo, Tamaulipas
Maíz <i>Zea mays</i>	6 300	5 500	4 400
Frijol <i>Phaseolus vulgaris</i>	2 100	2 300	1 300
Calabaza <i>Cucurbita pepo</i>	10 000	7 900	6 300
Guaje <i>Lagenaria siceraria</i>	10 000	7 200	6 400

Basado en Smith (2001, 2005)

Para determinar el origen y la domesticación de las plantas suelen utilizarse cuatro tipos de evidencias, de acuerdo con Candolle (1882) (citado por Gepts, 1999), las cuales son, evidencias arqueológicas (más específicamente las arqueobotánicas); las botánicas (por ejemplo, la distribución de las especies silvestres o de sus parientes ancestrales); las históricas (la existencia de registros escritos que documentan la importancia o existencia del cultivo); y las lingüísticas (por ejemplo, la existencia de palabras que designen el cultivo o conceptos relacionados con el cultivo en lenguaje autóctono). Ejemplo de ello es la familia de las leguminosas, la cual se sabe que, a lo largo de la historia, algunas de sus especies fueron cultivadas por los pueblos precolombinos durante miles de años como principal fuente de proteínas. Uno de los principales representantes de esta familia es el frijol común, el cual, según informan los primeros cronistas, en el imperio Azteca e Inca se le daba gran importancia, ya que con este podían pagar tributos. Así, las leguminosas adquirieron una gran importancia económica y, a partir del siglo XIX, una importancia científica con el esfuerzo de la mejora genética concentrada en el frijol.

2.1 LEGUMINOSAS

Las leguminosas son una familia de plantas del orden de las fabales, las cuales son fácilmente reconocibles por su fruto tipo legumbre y muestran una amplia diversidad tanto morfológica como de hábitats; encontrando desde formas herbáceas anuales hasta árboles tropicales; llegando a ser una de las tres familias con mayor riqueza de especies. Se conocen cerca de 19,700 especies clasificadas en 727 géneros (Xu *et al.*, 2009; Lavin *et al.*, 1990) y agrupadas en 40 tribus (Lewis *et al.*, 2005) que se encuentran tanto en climas tropicales como templados. Se divide en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Su domesticación y cultivo data desde hace 5 000 a 2 000 años a. C. Algunos integrantes de esta familia son el frijol común (*P. vulgaris*), el cual contribuye con el 33% del requerimiento proteico de la dieta en humanos; la soya (*Glycine max*) y el cacahuate (*Arachis hypogaeae*) los cuales proveen más del 35% del aceite vegetal procesado en el mundo (Graham y Vance, 2003). Una característica de las leguminosas es que pueden establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, sino que se caracterizan por presentar la enzima nitrogenasa (Zehr *et al.*, 1998).

2.1.1 El género *Phaseolus*

El género *Phaseolus* L., al que pertenece el frijol común, 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. Este género contiene nueve grupos filogenéticos dentro de una sola línea evolutiva general (Delgado-Salinas *et al.*, 1999; Freytag y Debouck, 2002); es parte de la subtribu Phaseolinae y pariente cercano del género *Vigna*, con especies agrícolamente importantes como los frijoles adzuki y mungo de Asia y el cowpea africano (Perales y Aguirre, 2008). De las más de 60 especies silvestres de este género, en México se encuentran por lo menos cincuenta (83%), y de estas, 34 son endémicas. Los estados con mayor riqueza de especies son Oaxaca y Jalisco. Sólo cinco de ellas cuentan con variantes domesticadas, pero algunas de sus variantes silvestres y de otras especies silvestres son utilizadas por diferentes grupos étnicos. Su valor nutritivo y agronómico es reconocido en todo el mundo. Los diferentes cultivares tradicionales y fitotécnicos de estas cinco especies son producto del proceso de domesticación llevado a cabo desde hace más de 5 000 años por diferentes grupos humanos, habitantes tanto de la región mesoamericana como de la región andina en América del Sur. Es importante apuntar que México aún cuenta con variantes silvestres de cuatro de las cinco especies domesticadas (Perales y Aguirre, 2008).

Las especies del género *Phaseolus* son herbáceas volubles y por lo general se encuentran creciendo en espacios abiertos, enredando sus tallos en las ramas de otras plantas postradas sobre el suelo del bosque. Muchas especies son vistosas por sus inflorescencias, con numerosas flores de color violáceo, rosa, blanco o rojo. La mayoría de ellas se desarrollan en suelos con buen drenaje, donde anclan sus raíces gruesas que les permiten vivir por varios años en asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Ensifer* principalmente (Perales y Aguirre, 2008; Martínez-Romero, 2003; Herrera-Cervera *et al.*, 1999). Los frutos o vainas pueden contener desde una hasta cerca de 20 semillas, las cuales son comúnmente expulsadas a varios metros de distancia al separarse violentamente sus valvas elásticas. Mediante la domesticación han resultado plantas con frutos inmaduros (ejotes) y semillas (granos) de dimensiones más grandes (Hernández *et al.*, 2013).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) se originó y domesticó en México, se sabe que también se produjo una domesticación independiente en Sudamérica; la distribución de plantas silvestres de frijol común se conoce desde el noroeste de Argentina hasta el norte de México (Gepts y Debouck, 1991), pero las semillas de las poblaciones mesoamericanas se caracterizan por ser más pequeñas que sus contrapartes sudamericanas. En México también se encuentran más de 50 especies silvestres del género *Phaseolus*; incluyéndose también las cinco especies domesticadas: *P. vulgaris* (frijol común), *P. lunatus* (frijol lima) común en la Depresión del Balsas, la Península de Yucatán y la Planicie Costera del Golfo, *P. acutifolius* (frijol tépari) domesticado en el noroeste de México, *P. coccineus* subsp. *coccineus* (frijol ayocote) y *P. dumosus* = *P. polyanthus* (*P. coccineus* subsp. *darwinianus*) (frijol de año) comunes en regiones templadas (Freytag y Debouck, 2002; Ballesteros, 1999) (Tabla 2).

Tabla 2. Usos y especies domesticadas del género *Phaseolus*.

Especie	Variante silvestre conocida	Nombre común o local	Comestible
<i>P. acutifolius</i>	Sí	Tépari y escumite	Semilla
<i>P. coccineus</i>	Sí	Ayocote, patolas, tecomari y frijolón	Raíz, follaje, flor, fruto y semilla
<i>P. lunatus</i>	Sí	Navajita, frijol lima, ib, ixtapacal, chilipuca, pallares y comba	Semilla
<i>P. dumosus</i> = <i>P. polyanthus</i>	Sí	Frijol de año, ibes	Fruto y semilla
<i>P. vulgaris</i>	Sí	Frijol	Fruto y semilla

Adaptado de Perales y Aguirre, 2008

Dentro de las especies que aún no han sido domesticadas encontramos a *P. filiformis* (frijol Slim-jim); el cual, es una especie de frijol silvestre considerado como planta trepadora, nativa del suroeste de los Estados Unidos y norte de México (Fig. 2)(United States Department of Agriculture, 2013).

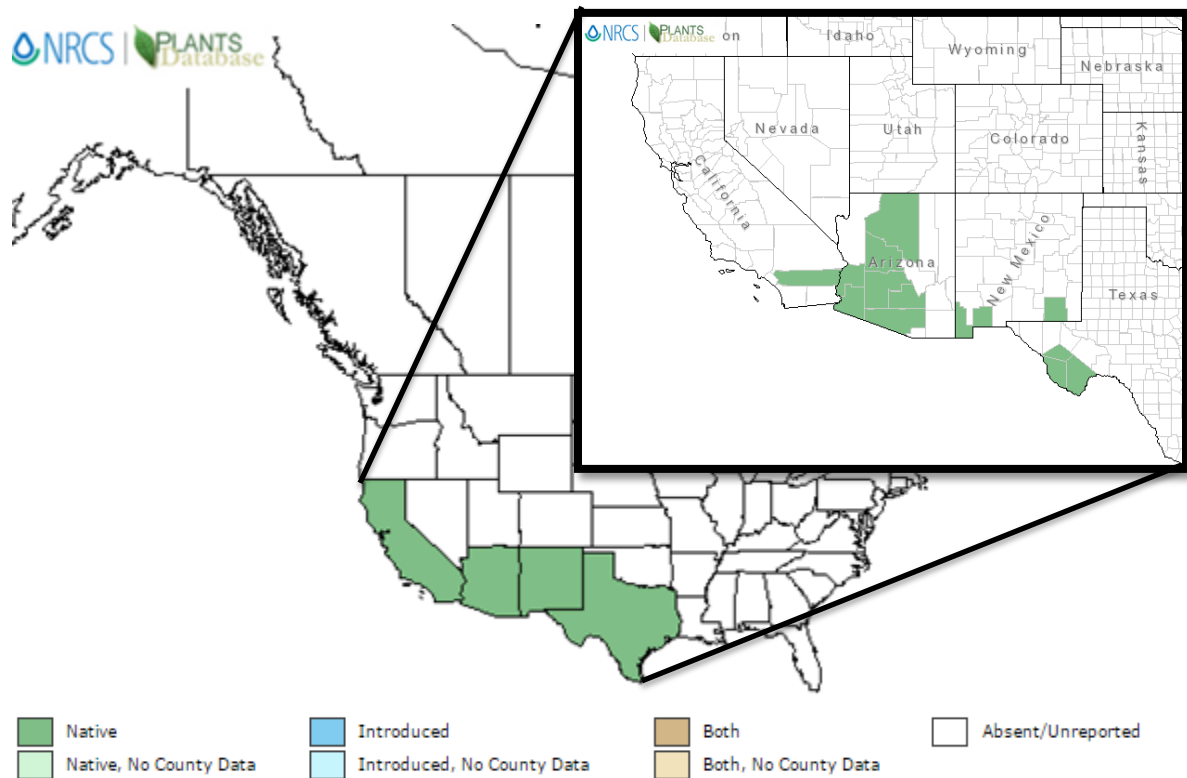


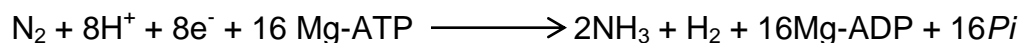
Fig. 2. Mapa de la distribución geográfica de *P. filiformis*, adaptado de la USDA-NRCS (United States Department of Agriculture/Natural Resources Conservation Service, 2013). <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=phfi3>

Sus nombres comunes incluyen a frijol Slim-jim o Phaseolus de Wright (Jepson Herbarium, 2013). Esta planta se asemeja a otros frijoles en apariencia, sus hojas son compuestas de folíolos triangulares lobulados y flores parecidas a guisantes de color rosa. Las pequeñas vainas son de 2.5 a 3.5 cm de longitud y menos de 1 cm ancho, la cual contiene semillas que pueden ser comestibles. Es considerada dicotiledónea anual cuyo crecimiento se da en suelos arenosos y secos, por lo que su principal característica es que se considera una planta resistente a la sequía.

2.2 FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

El Nitrógeno es el componente que se encuentra en mayor proporción en la atmósfera de nuestro planeta; y debido a la energía que es necesaria para romper el triple enlace existente entre los átomos de nitrógeno, este no puede ser aprovechado como tal por organismos superiores, convirtiéndolo, paradójicamente, en uno de los principales factores limitantes del crecimiento vegetal (Fassbender y Bornemisza, 1994). Las plantas sólo pueden asimilar formas de nitrógeno combinado, generalmente amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-), que son derivadas del N_2 atmosférico a través del proceso denominado fijación de nitrógeno. Este término incluye la reducción del N_2 hasta sus formas combinadas, bien por procesos fisicoquímicos (naturales o inducidos por el hombre) o por procesos biológicos. La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso enzimático atribuible sólo a algunos microorganismos procariotes de vida libre o en asociación con plantas, los diazótrofos, los cuales son capaces de reducir el N_2 atmosférico hasta amonio (NH_4^+), incorporándolo de este modo a la biósfera en una forma asimilable para las plantas, esta propiedad es responsable de aproximadamente 2/3 del total de nitrógeno fijado en la biosfera (Sanjuán-Pinilla, 2001).

La capacidad de los diazótrofos para fijar N_2 deriva de un complejo enzimático llamado nitrogenasa, cuya estructura y propiedades son muy similares en todas las especies que lo poseen. Este complejo enzimático consta de dos componentes: el componente I caracterizado por tener un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoCo), también llamado ferromolibdenoproteína o dinitrogenasa, el cual es sintetizado por los genes *nifD* y *nifK* (subunidades α y β) (Baca *et al.*, 2000); y el componente II, llamado ferroproteína o dinitrogenasa reductasa, el cual es sintetizado por el gen *nifH* y posee átomos de hierro acomplejados con azufre, este componente es el que en último término lleva a cabo la reducción de N_2 hasta amonio (Sanjuán-Pinilla, 2001). De manera general, la fijación de nitrógeno puede resumirse según la siguiente reacción:



El primer producto de la reacción es NH_3 , pero este es rápidamente protonado, formándose NH_4^+ , el cual es favorecido por el pK (9.25) de la reacción, de tal manera que el amonio es la especie predominante a los pH fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Sprent y Sprent, 1990).

La fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es de considerable importancia en agricultura; ya que, gracias a la acción de estos

microorganismos el empleo de fertilizantes químicos en suelo deja de ser la única opción para enriquecerlo. Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones y pueden crecer bien en zonas con condiciones ambientales desfavorables donde otras plantas no lo harían (sequía, salinidad, baja fertilidad del suelo). Es por ello que leguminosas arbustivas y arbóreas se emplean como plantas pioneras en la reforestación de zonas áridas y semiáridas (Neyra, 1995). Sin embargo, para que esta simbiosis se lleve a cabo, se requiere que, tanto las bacterias como las plantas, sean compatibles debido a que la interacción es altamente específica; lo cual significa que, de manera general, cada especie bacteriana se establece en simbiosis con uno o pocos géneros o especies vegetales (Denarié *et al.*, 1996). De igual manera, necesitan que el medio ambiente del suelo sea el apropiado para el intercambio de señales que preceden a la infección (Hirsch *et al.*, 2003; Leibovitch *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002), ya que, la especificidad del hospedador viene determinada por el tipo de moléculas señal producida por cada pareja bacteria-planta (Denarié *et al.*, 1996).

2.3 GENERALIDADES DE LOS RHIZOBIA

El término “Rhizobia”, originalmente y en su estricto sentido, se utilizó únicamente para los miembros del género *Rhizobium*. Sin embargo, con el paso del tiempo, el término fue acuñado para todas aquellas bacterias que son capaces de nodular y fijar nitrógeno en asociación con leguminosas (Willems, 2006; Zakhia y de Lajudie, 2006).

Diversos estudios basados en características morfológicas y bioquímicas, huellas genéticas (Versalovic *et al.*, 1994), el análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) (Jarvis y Tighe, 1994; Tighe *et al.*, 2000), análisis de la secuencia de genes 16S rRNA (Laguerre *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1998), hibridación DNA-DNA (Willems *et al.*, 2001) y MLSA (Análisis de secuencias Multilocus) (Martens *et al.*, 2008; Vinuesa *et al.*, 2005 a, b) han permitido distribuir a estas bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a leguminosas en 15 géneros y aproximadamente 100 especies (*ICSP Subcommittee on the taxonomy of Rhizobium and Agrobacterium diversity, phylogeny and systematics*, 2012), distribuidas en las subfamilias α y β de las Proteobacteria (Chen *et al.*, 2003; Moulin *et al.*, 2001); las cuales están filogenéticamente relacionadas con otras bacterias de vida libre o patogénicas, como *Rhodopseudomonas*, *Azospira*, *Agrobacterium* y *Brucella* (Willems y Collins, 1993; van Berkum y Eardly, 1998; Sadowsky y Graham, 2002).

Dentro del grupo de las α -Proteobacteria encontramos los géneros *Rhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Neorhizobium* (Abdollah *et al.*, 2014), *Ochrobactrum*, *Pararhizobium* (Abdollah *et al.*, 2015) *Phyllobacterium* y *Shinella*; mientras que en grupo de las β -Proteobacteria están los géneros *Herbaspirillum* (Valverde *et al.*, 2003), *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) y *Cupriavidus* (Vandamme y Coenye, 2004). Cubriendo, de esta manera, un espectro ecológico muy amplio: encontrándose como saprófagos en el suelo y agua dulce; viviendo como rizobacterias en la rizósfera de leguminosas o

formando órganos fijadores de nitrógeno, llamados nódulos, en las raíces o tallos de estas plantas (Brewin, 1998; Long, 1989; van Rhijin y Vanderleyden, 1995; Sadowsky y Graham, 1998).

El género *Sinorhizobium* (actualmente *Ensifer*), se propuso para designar a bacterias de rápido crecimiento aisladas de nódulos de soya. Aunque inicialmente se habían agrupado como *Rhizobium meliloti*, las diferencias en las secuencias del gen 16S rRNA condujo a su separación (Chen *et al.*, 1988). Posteriormente, un análisis filogenético de las α -Proteobacteria agrupó los géneros *Sinorhizobium* y *Ensifer* en un solo clúster, además mostró evidencia de que *Ensifer adhaerens* era miembro del género *Sinorhizobium* (Balkwill, 2005). Esto tuvo importantes consecuencias en la nomenclatura ya que el nombre más antiguo, *Ensifer*, tuvo preferencia; por lo que, el comité taxonómico propuso que todas las especies de *Sinorhizobium* deberían ser transferidas al género *Ensifer*, quedando correctamente escrito el nombre *Ensifer adhaerens* en lugar de *Sinorhizobium adhaerens* (Young, 2003). Así, el género *Ensifer* quedó descrito como bacilos que miden 0.5-1.0 x 1.2-3.0 μm , gram negativos, aerobios; con una temperatura óptima de crecimiento entre 25 y 30 °C; pH 6-7 y poseen movilidad mediante flagelos (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). Está compuesto de 15 especies las cuales crecen rápidamente y producen ácido en medio YMA. Su arquitectura genómica está constituida por un cromosoma circular y varios plásmidos (Freiberg *et al.*, 1996; Galibert *et al.*, 2001; González *et al.*, 2003). La mayoría de los genes necesarios para establecer la nodulación y fijación de nitrógeno se localiza en uno de los plásmidos, denominado plásmido simbiótico.

2.4 TÉCNICAS MOLECULARES DE CLASIFICACIÓN BACTERIANA

En la actualidad, la clasificación de bacterias es polifásica e implica técnicas que toman en cuenta tanto características fenotípicas como genotípicas (Vandamme *et al.*, 1996). De los métodos genotípicos, la secuenciación del gen 16S rRNA y la hibridación genómica DNA-DNA han sido la columna vertebral para la determinación de especies bacterianas desde hace un par de décadas (Stackebrandt y Goebel, 1994; Willems y Collins, 1993; Young y Haukka, 1996; Yanagi y Yamasato, 1993; Young *et al.*, 2001).

La hibridación DNA-DNA (DDH) es un método ampliamente recomendado para delinear nuevas especies; y actualmente, con esta técnica, una especie puede definirse como un grupo de cepas que cuentan con aproximadamente el 70% o más de relación DNA-DNA. Sin embargo, en la práctica, los resultados obtenidos de la DDH son diferentes debido a la variación entre laboratorios y los diversos métodos empleados para obtenerlos (Goris *et al.*, 2007; Lindström *et al.*, 2015).

De igual manera, el gen 16S rRNA es considerado como un adecuado marcador molecular para análisis filogenéticos, donde el análisis de su secuencia ha demostrado un alto poder de resolución para medir el grado de relación entre organismos, con utilidad para jerarquías taxonómicas superiores al nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994). Se ha visto que organismos con una relación genómica total mayor al 70% (evaluado por hibridación DNA-DNA), por lo general, comparten más del 97% de similitud en la secuencia del gen 16S rRNA (Stackebrandt y Goebel, 1994).

No obstante, en años recientes, diversos estudios han mostrado que los genes rRNA de rhizobia están sujetos a una alta frecuencia de transferencias laterales y recombinaciones genéticas, resultando en una secuencia mosaico (Eardly *et al.*, 1996, 2005; Sullivan *et al.*, 1996; van Berkum *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005). Aunado a esto, una de las principales desventajas de la filogenia del gen 16S rDNA es que las especies relacionadas estrechamente no siempre pueden ser distinguidas debido a su alto nivel de conservación de secuencia, esto hace que, a diferencia de la hibridación DNA-DNA, el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA carezca de un poder de resolución en el nivel de especie (Olsen y Woese, 1993).

Para superar estas limitaciones, se han sugerido marcadores filogenéticos alternativos, los cuales son genes que codifican para proteínas con un nivel más alto de divergencia en sus secuencias que los genes rRNA, pero suficientemente conservados para retener la señal filogenética y permitir a los primers ser diseñados (Stackebrandt *et al.*, 2002). Así, cada vez más se ha estado utilizando el Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) como una técnica de clasificación bacteriana, la cual usa las secuencias de múltiples genes, que codifican para proteínas con características antes mencionadas, y elucidar relaciones taxonómicas entre especies; para así, obtener una caracterización genotípica de un grupo de bacterias (Gevers *et al.*, 2005; Wertz *et al.*, 2003; Adékambi y Drancourt, 2004; Christensen *et al.*, 2004; Holmes *et al.*, 2004; Naser *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005).

2.5 BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN RHIZOBIA-LEGUMINOSA

El establecimiento de una simbiosis entre los rhizobia y las leguminosas da como resultado la generación de un nuevo órgano llamado nódulo, el cual se forma en los pelos radiculares de la planta o, en algunos casos, en los tallos de la misma (Suzuki *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2011) como en el caso de *Sesbania* (Boivin *et al.*, 1997) y *Aeschynomene* (Miché *et al.*, 2010), entre otras; el tipo de nódulo formado dependerá de la planta, pudiendo ser indeterminado (alargado) cuando hay una zona meristemática persistente, o determinado (circular) cuando no existe dicha zona de división celular activa (Hisch, 1992).

El proceso de la formación de los nódulos es el resultado de un continuo y adecuado intercambio de señales entre los simbioses (Broughton *et al.*, 2000), produciendo una interacción altamente específica. Este aspecto ha promovido gran cantidad de estudios para identificar las señales implicadas en este primer paso, el cual comienza incluso antes de que los simbioses entren en contacto físico. Por otro lado, existen ejemplos de bacterias con amplio rango hospedero, capaces de nodular a un elevado número de géneros de leguminosas (Sanjuán-Pinilla, 2001). Aunque pueda parecer que no existe una aparente correlación entre especie bacteriana y plantas hospedadoras, la especificidad del hospedero viene determinada por el tipo de moléculas señal producidas por cada pareja bacteria-planta (Denarié *et al.*, 1996). Este proceso global de la interacción puede resumirse en cuatro etapas:

2.5.1 Quimiotaxis

Antes de llevarse a cabo la infección de las raíces de leguminosas por los rizobia, debe de haber un crecimiento bacteriano en la rizósfera (Hirsch *et al.*, 1992), inducido por compuestos exudados por las raíces de la planta y cuya composición puede variar dependiendo de la planta hospedadora, su estado de desarrollo y de factores medioambientales. Entre estos compuestos destacan ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, flavonoides y otras moléculas de bajo peso molecular. De especial importancia durante las etapas iniciales son los compuestos de tipo flavonoide, que cumplen varias funciones (Dowling *et al.*, 1986; Gaworzewska *et al.*, 1982):

1. Quimioatrayendo a las bacterias hasta las raíces de plantas leguminosas (Caetano-Anollés *et al.*, 1988).
2. Estimulando el crecimiento bacteriano alrededor de la raíz (Luteolina) (Hartwig *et al.*, 1991).
3. Induciendo la activación de genes de nodulación bacterianos (Sánchez *et al.*, 1991; Barbour *et al.*, 1991).

En respuesta a la señal de la planta, las bacterias responden sintetizando otras señales específicas, los factores Nod; estos son dirigidos hacia la planta hospedadora e inducen la formación de nódulos (Lloret y Martínez, 2005) (Fig. 3).

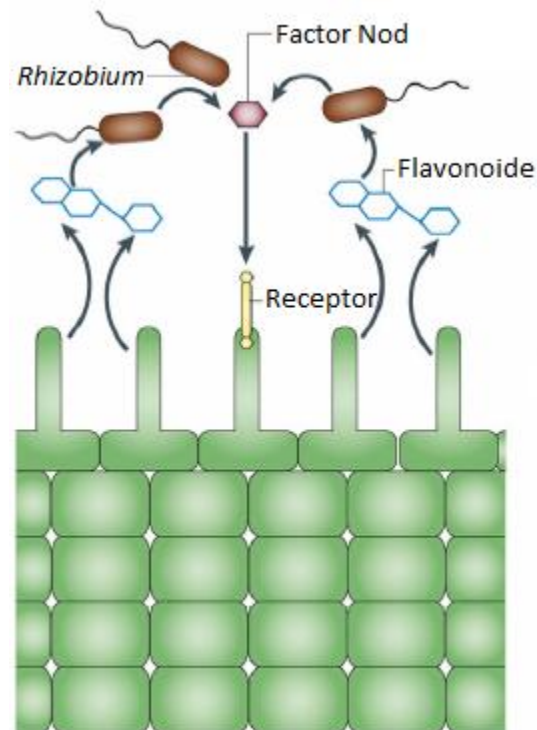


Fig. 3. Representación esquemática del diálogo de señalización inicial entre la planta hospedadora y la bacteria fijadora de nitrógeno (Adaptado de Jones *et al.*, 2007).

Los factores Nod (también llamados LCOs; del inglés: lipochitin oligosaccharides) son oligómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos por

enlace β 1-4 y que llevan unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor (Fig. 4).

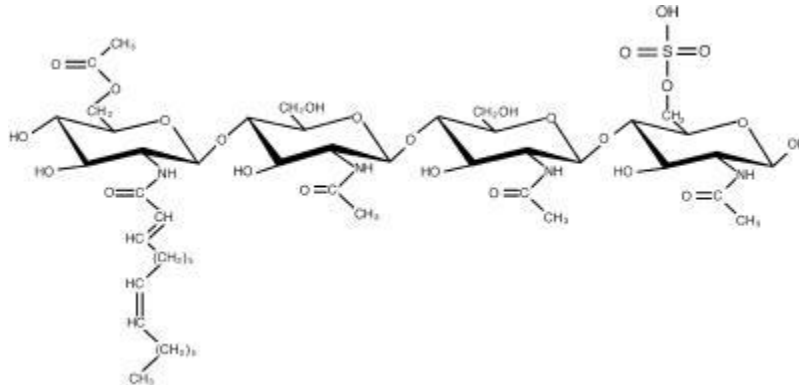


Fig. 4. Estructura del factor Nod de *E. meliloti* (Lerouge *et al.*, 1990)

Los genes de la bacteria implicados en la síntesis de los factores Nod son los genes *nod* (nodulación). Estos genes, a excepción de *nodD*, no se expresan si no se encuentra la señal inductora adecuada de la planta. El gen *nodD* se expresa constitutivamente y la proteína NodD tiene la capacidad de reconocer los flavonoides específicos secretados por la leguminosa.

Los operones de los genes *nod* están precedidos por un promotor que contiene una secuencia consenso. A esta secuencia consenso se le llama caja de nodulación (o caja *nod*) y que es reconocida por la proteína NodD. Una vez activada por los flavonoides, la proteína NodD a su vez, va a activar la transcripción de los genes de la nodulación mediante su unión a las cajas *nod*, llevando a la síntesis del factor Nod.

Los factores Nod purificados son capaces de inducir en la planta reacciones similares a las que producen los rizobias. De modo significativo, son capaces de inducir la división en células ya diferenciadas del cortex de la planta. Es por ello que a los factores Nod se les llama morfógenos y se ha sugerido que su estructura pueda imitar a señales u hormonas de la propia planta, aún no identificadas.

2.5.2 Adhesión celular

Tras la colonización de la superficie de la raíz, las células se adhieren fundamentalmente a los pelos radiculares jóvenes. Se sabe que comienza con una unión débil inicial, seguida por un anclaje con filamentos de celulosa sintetizados por la bacteria (Smit *et al.*, 1987).

En este proceso de adhesión pueden estar implicados componentes superficiales de los rizobias, como exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), antígenos capsulares (CPS) y proteínas superficiales, como ricadhesina y B_j38. Por parte de la planta, son necesarios compuestos como lectinas o un homólogo de vitronectina (Swart *et al.*, 1994). Estas lectinas estarían implicadas en la adhesión utilizando los componentes superficiales bacterianos como sitios de unión (Díaz *et al.*, 1996; Dazzo y Truchet, 1987; Kijne *et al.*, 1997) (Fig 5).

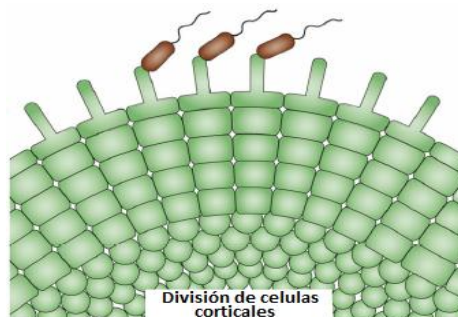


Fig. 5. Adhesión celular a los pelos radiculares. Los factores Nod (10^{-7} a 10^{-9} M) se encargan de promover la división de las células corticales en la planta (Adaptado de Jones *et al.*, 2007).

Las condiciones ambientales pueden afectar la capacidad de los rizobia de adherirse a los pelos radiculares; tal es el caso del pH en el suelo y la limitada disponibilidad de elementos como manganeso, nitrógeno y oxígeno (Swart *et al.*, 1994).

2.5.3 Curvatura de los pelos radiculares y formación del canal de infección

La adhesión de estas bacterias a los pelos radiculares jóvenes provoca la primera respuesta microscópicamente visible: la deformación y curvatura del pelo radical. Se sabe que la presencia de los factores Nod en concentraciones del orden 10^{-12} M es suficiente para que en la planta se produzca tal deformación en los pelos radiculares (Lerouge *et al.*, 1990; Heidstra *et al.*, 1994). Esta curvatura se produce por una estimulación local del crecimiento del extremo apical del pelo radical y no por una inhibición del crecimiento.

Cuando las bacterias inducen la curvatura de los pelos radiculares, algunas quedan atrapadas en ella, desencadenando el proceso de infección, que comienza con una hidrólisis muy localizada de la pared celular vegetal en el punto de curvatura del pelo radical. De este modo, se origina una invaginación de la membrana plasmática del pelo, formando así los primordios del canal de infección, estructura a través de la cual las bacterias van a transitar por la raíz hasta llegar al nódulo (Fig. 6). El crecimiento continuo de esta estructura origina el hilo de infección. A lo largo de todo el canal, existe una matriz glucoproteica cuyos componentes proceden tanto de la planta como de la bacteria (Broughton *et al.*, 2000).

Ya en el interior, las bacterias comienzan a dividirse activamente en los espacios intercelulares hasta tener acceso a las células corticales y luego a las células del meristemo (Brewin *et al.*, 1992), donde los rizobia penetran, se encapsulan en polisacáridos extracelulares (Leigh y Walker, 1994; Reuhs *et al.*, 1995) y se convierten en simbiontes intracelulares.



Fig. 6. Esquema del proceso de la formación del hilo de infección en la simbiosis Rhizobia-leguminosa (Jones *et al.*, 2007).

2.5.4 Diferenciación en bacteroides

El proceso termina con la liberación de las bacterias al interior de las células del primordio, el cual ocurre mediante un mecanismo de endocitosis específico, por el que las bacterias son liberadas al citoplasma rodeadas de una membrana de origen vegetal, la membrana peribacteroidal, misma que sirve de intermediario de señales, metabolitos y nutrientes entre la bacteria y la planta.

Una vez dentro de la célula vegetal, los rhizobia pueden dividirse una o pocas veces más. La membrana peribacteroidal se divide en sincronía con la división de la bacteria, por lo que finalmente cada bacteria queda encerrada en su propia membrana formando la unidad simbiótica denominada simbiosoma. En el simbiosoma cesa la multiplicación de las bacterias, que se transforman en los llamados bacteroides, de mayor tamaño (de cuatro a siete veces su tamaño original) y con una morfología irregular (Fig. 7). En el bacteroide se lleva a cabo la reducción del nitrógeno hasta amonio, el cual es exportado a la célula vegetal.

Aunque hasta hace poco se pensaba que el amonio era exportado directamente, estudios recientes indican que el producto de la nitrogenasa es exportado desde el bacteroide en forma de alanina (Waters *et al.*, 1998), o bien a través de la membrana peribacteroidal donde ha sido caracterizado un canal de amonio que podría estar implicado en la transferencia de nitrógeno fijado a la célula hospedadora (Kaiser *et al.*, 1998).

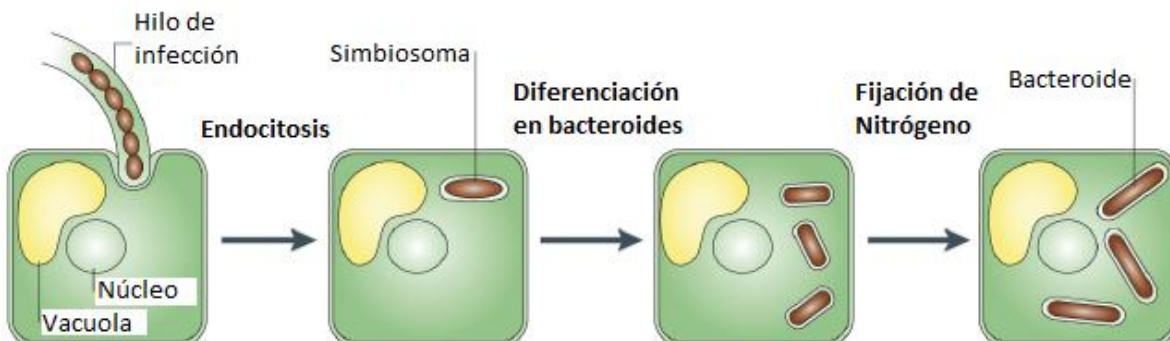


Fig. 7. Proceso de liberación de bacterias al interior de la célula, formación del simbiosoma y diferenciación a bacteroides, donde se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno (Jones *et al.*, 2007).

2.6 SALINIDAD

El suelo es considerado un recurso natural frágil y no renovable, debido a que resulta difícil y muy costosa su recuperación e, incluso, mejorar sus propiedades. Es indispensable para la producción de alimentos y el crecimiento vegetal, almacena minerales, materia orgánica, agua y otras sustancias químicas. Sin embargo, el ambiente árido, la cercanía de la costa, la altura sobre el nivel del mar y diversas prácticas agrícolas como la irrigación, han provocado que hoy en día la salinidad sea la causa más grande de la degradación del suelo (Zhu, 2001), causando dispersión de la arcilla y degradación de los agregados, con la consecuente reducción en permeabilidad, porosidad y conductividad eléctrica (Amézketa, 1999), provocando con ello la declinación en el rendimiento de los cultivos y la consecuente disminución de la producción agrícola (Madueño-Molina *et al.*, 2006), al inhibir el crecimiento de las plantas de diferentes maneras:

- Disminución del contenido de agua en la planta, ya que el Na^+ (compuesto altamente higroscópico) atrapa las moléculas del agua del suelo, disminuyendo así su hidratación,
- Acumulación de iones en cantidades tóxicas y,
- Reducción de la disponibilidad de nutrimentos, al afectar la estructura del suelo y disgregar sus partículas (Kuiper, 1984; Ashraf, 1994).

Por otro lado, la salinidad provoca que se reduzca la absorción y traslocación de K^+ y Ca^{2+} , que son elementos necesarios para mantener la selectividad e integridad de la membrana celular de la raíz (Jones y Lunt, 1967; Fageria, 1983). De igual manera, se sabe que las sales sódicas, en particular el NaCl, provocan un mayor estrés salino en comparación con otras sales y es este compuesto una de las sales más comunes presentes en zonas agrícolas (Levitt *et al.*, 1980).

La salinidad afecta drásticamente la fotosíntesis en los vegetales (Seeman y Sharkey, 1986; Soussi *et al.*, 1998), el contenido de nitrógeno (Cordovilla *et al.*, 1994; Mansour, 2000; Santos *et al.*, 2002), y el metabolismo del carbón (Balibrea *et al.*, 2003); también provoca disturbios en la nutrición mineral y acumulación de sodio (Na^+) en diversos tejidos (Cordovilla *et al.*, 1995a; Grattan y Grieve, 1999; Mengel y Kirkby, 2001).

Particularmente, tanto la simbiosis establecida entre los rhizobia y las leguminosas, así como la formación de nódulos, son mucho más sensibles al estrés salino que las bacterias por sí solas, ya que el estrés salino inhibe las etapas iniciales de la simbiosis (Zarhan, 1999), como la supresión de la deformación del pelo radicular a una concentración de 210 mM de NaCl (Tu, 1981). De igual manera, se ha observado que a una concentración de 0.3 M de NaCl, se produce una disminución drástica de la producción de EPS, manifestándose con cambios morfológicos coloniales (colonias no mucoides), afectando la colonización de los pelos radiculares y el proceso de nodulación (Lloret *et al.*, 1998).

El estrés salino también acelera la senescencia de los nódulos (Martínez-Salazar *et al.*, 2009) y reduce el contenido de leghemoglobina dentro de ellos, lo

que provoca la ineffectividad de éstos (Delgado *et al.*, 1993). Sin embargo, algunas especies de leguminosas (también catalogados como cultivos de cobertura o abonos verdes) manifiestan tolerancia a la salinidad durante algunas etapas tempranas del desarrollo, lo cual es importante para la supervivencia en estas condiciones ambientales; si alguna de ellas logra mantener la simbiosis, podrían mejorar las características físicas del suelo, tales como la infiltración de agua (Cassman y Rains, 1986), la agregación y porosidad (MacRae y Mehuys, 1985) y la reducción de la formación de corteza en el suelo (Mitchell *et al.*, 2000). También lo enriquece gracias a su contribución biológica con el nitrógeno, ya que reduce el requerimiento de fertilizantes nitrogenados (Perret *et al.*, 2000; Spanik, 2000).

Es por ello que, desde hace tiempo, se conocen los beneficios obtenidos al utilizar esta interacción a nivel de campo; ya que *Rhizobium* fue la primera bacteria producida a gran escala y se ha añadido como inoculante durante 105 años a diversos cultivos agrícolas, con éxito en muchos casos (Tao *et al.* 2004). Debido al interés motivado por estas bacterias para su aplicación en la agricultura, se han realizado investigaciones extensas sobre este sistema simbiótico, incluyendo estudios sobre la diversidad y la taxonomía de los rhizobia.

III. ANTECEDENTES

En la actualidad, hay una creciente necesidad de reducir el uso de fertilizantes químicos nitrogenados y uno de los procedimientos que día a día va tomando mayor auge es el empleo de inoculantes bacterianos, los cuales, han comenzado a desempeñar un papel importante en la mejora de cultivos y técnicas agrícolas. Sin embargo, uno de los grandes problemas que enfrenta este recurso es la presencia de cepas naturales que, por lo general, son más competitivas y se encuentran mejor adaptadas en su entorno, reduciendo la efectividad de la inoculación de los cultivos. Ejemplo de ello es el caso de *Rhizobium etli*, que se ha encontrado en regiones donde el frijol se ha introducido desde inicios del siglo XVI, después del descubrimiento de América; con base a esto, diferentes estudios han revelado que, precisamente, *R. etli* es el microsimbionte que seguramente coevolucionó con el frijol, encargándose de su nodulación de manera natural (Segovia *et al.*, 1993). El género *Phaseolus* se caracteriza por establecer esta simbiosis con un gran número de bacterias, se sabe que *P. coccineus* y *P. vulgaris* comparten microsimbiontes (Piñero *et al.*, 1988; Souza *et al.*, 1994), ya que pueden ser nodulados por diferentes especies del género *Rhizobium* (Silva *et al.*, 1999), y en algunos casos, en la agricultura tradicional, ambas especies de *Phaseolus* son cultivadas en la misma área. Por otro lado, *P. acutifolius* es naturalmente nodulado por *Bradyrhizobium* sp. (Somasegaran *et al.*, 1991) o por *R. etli* (Martínez *et al.*, 1985). Así mismo, *P. lunatus* (frijol Peruano) es nodulado por *Bradyrhizobium* sp., y en algunos casos, por *Sinorhizobium* sp. (Dobert *et al.*, 1992; Ormeño *et al.*, 2003).

Por otra parte, es sabido que, cuando un inoculante es introducido en la agricultura, sólo una pequeña parte de estas bacterias forman nódulos (menor al 5%) y el resto lo forman las cepas nativas. Es por ello que, para descifrar la simbiosis efectiva *Rhizobium*-frijol, en cuya asociación intervienen cepas silvestres, el objetivo del proyecto fue estudiar la diversidad molecular de cepas de *Ensifer* las cuales son tolerantes a la salinidad y capaces de nodular una especie de frijol silvestre, *Phaseolus filiformis*, mismo que proviene del norte de México. Este proyecto tiene, como finalidad, generar inoculantes cuyos componentes sean capaces de competir con bacterias nativas en un campo de cultivo.

Previamente, en el Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana, se obtuvo una colección de cepas de rhizobia, las cuales, fueron aisladas de *Phaseolus* silvestre, obtenidas de diferentes partes de la República Mexicana (Puebla, Veracruz, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos y Baja California), como parte del proyecto ECOS-NORD M08-A02 “Genómica comparativa y funcional de poblaciones de rhizobia simbiosis de frijol silvestre (*Phaseolus* spp.)”, cuya finalidad es la identificación de los determinantes genéticos que participan en una simbiosis efectiva rhizobia-frijol, que permitirán la selección de cepas con potencial biofertilizante como alternativa para el mejoramiento de los cultivos de diferentes variedades de frijol.

En la búsqueda de bacterias eficientes en fijación de nitrógeno, se realizó un ensayo de tipo invernadero, utilizando plantas de diferentes variedades de frijol común (pinto, peruano y negro Jamapa). Para evaluar el potencial biofertilizante de las cepas, se cuantificó el peso seco y la longitud de raíces y partes aéreas de la planta, así como el peso seco y cantidad de nódulos. Así mismo, se cuantificó la

actividad reductora de acetileno (ARA) de los nódulos producidos. En los resultados se encontró que la cepa LEM457 mostró un alto potencial biofertilizante. Posteriormente, mediante un análisis de secuencias parciales del gen 16SrDNA, se determinó que esta cepa, junto con otras aisladas de la misma región, pertenece al género *Ensifer*. Por lo que, el cepario quedó conformado por 66% de cepas del género *Rhizobium*, 15% de *Ensifer*, 15% de *Bradyrhizobium* y el 4% de *Ochrobactrum* (Cuellar, 2011).

Las cepas que conforman el bloque de *Ensifer* fueron aisladas de plantas de *P. filiformis* en una playa del norte de México. Y, por el lugar del que provienen los aislados, fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la salinidad. Esta prueba se dividió en dos partes: una cualitativa y otra cuantitativa. Para la primera prueba, se sembraron de manera masiva todas las cepas en medio YMA (8.5×10^{-4} M de NaCl) a diferentes concentraciones de cloruro de sodio: 0.02 M, 0.1 M y 0.3 M; mientras que para la segunda, se realizó la técnica de Goteo por Sellado en Placa Masivo (GSPM) (Corral-Lugo *et al.*, 2012) y las bacterias fueron inoculadas en placas con medio YMA a diferentes concentraciones de NaCl: 0.4 M, 0.6 M, 0.8 M y 1.0 M. Observándose que las cepas con mayor resistencia fueron la LEM451, LEM456, LEM465 y LEM466, para la primera determinación; así como la LEM451 y LEM466, quienes lograron tolerar hasta 1.0 M de sal en la segunda determinación (Rocha *et al.*, 2015).

Partiendo de estos resultados, se evaluó la capacidad infectiva (formación de nódulos) y efectiva (fijación de nitrógeno) de las cepas hipertolerantes al estrés salino (LEM451, LEM456, LEM465 y LEM466) en un ensayo de invernadero con semillas de *P. vulgaris* crecidas en medio YM a diferentes concentraciones salinas (8.5×10^{-4} , 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 M); sólo las plantas inoculadas con las cepas LEM451 y LEM466 soportaron dichas condiciones de estrés, observándose senescencia en la mayoría de ellas (Rocha *et al.*, 2015).

Por último, se llevó a cabo un MLSA empleando, para ello, seis genes de mantenimiento (*atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *recA* y *rpoB*) de las 11 cepas aisladas de *P. filiformis*, mediante los métodos *Neighbor-Joining* (NJ), Máxima Parsimonia (MP) y *Maximum Likelihood* (ML), con la finalidad de identificar la especie a la que pertenecen estas cepas. Así pues, el análisis genético arrojó que la cepa LEM456 se clasificó como *E. meliloti*, mientras que la cepa LEM463 se agrupó en el género de *Rhizobium*. Por otro lado, las cepas LEM451, LEM453, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466, LEM468 y LEM551 formaron un grupo que se encuentra estrechamente relacionado a *E. saheli* pero sin formar parte de este clúster. En base a estos resultados, se concluyó que las cepas de *Ensifer* tolerantes a la salinidad, y aisladas de *P. filiformis* en el norte de México no pertenecen a ninguna de las especies de *Ensifer* utilizadas en ese análisis (Rocha *et al.*, 2015).

IV. JUSTIFICACION

El nitrógeno es el factor limitante para el crecimiento de las plantas en los agroecosistemas mundiales. En el caso de las leguminosas, este puede ser obtenido gracias a la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) a través de una simbiosis con bacterias del grupo de los rhizobia.

El frijol común (*P. vulgaris*), es una de las principales fuentes proteicas para los países de América del Sur, Centroamérica, el sur de Norteamérica, El Caribe, Asia y África; siendo México uno de los principales productores de frijol en el mundo. Esta facilidad de cultivo se da gracias a la interacción simbiótica, fijadora de nitrógeno, que presentan, con *R. leguminosarum*, bv. *phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardinii* y *E. fredii*, principalmente; permitiendo así su óptimo crecimiento.

Por otro lado, no solo se obtienen beneficios económicos del cultivo de este tipo de leguminosas, sino que también se presentan beneficios ecológicos; ya que actualmente se emplean como biorremediadores en suelos que presentan erosión o inclusive altas concentraciones de sales. Se sabe que la superficie agrícola de riego está afectada por sales en un 10% y se registra que anualmente 10 millones de hectáreas se dejan de sembrar por los bajos rendimientos relacionados con los problemas de salinidad. Los suelos agrícolas afectados por sales en México se han dividido en cinco regiones: Región noroeste con el 20% de su superficie afectada por sales; Región Centro Norte con el 16.6%; Noroeste y Lerma-Balsas con el 12% cada una y la Región Sureste con el 6.6%. Siendo el estado de Baja California el que tiene el mayor problema de salinidad con un 45.3%, seguido por Sinaloa 17.1%, Sonora 13% y Nayarit 0.2%.

La identificación, caracterización y determinación del potencial biofertilizante de cepas adaptadas a estas condiciones salinas nos permitirá, en un futuro, el diseño de un inoculante óptimo para ser aplicado bajo estas condiciones agrícolas.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la diversidad molecular de cepas de *Ensifer* tolerantes a la salinidad, nodulantes de *Phaseolus filiformis*, en el norte de México.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar la relación filogenética de las cepas de *Ensifer* mediante un análisis individual de los genes de mantenimiento *atpD*, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *dnaK* y *gyrB*, así como un MLSA en conjunto con los genes *glnA*, *thrC* y 16S rDNA.
- Analizar la tolerancia de las cepas de *Ensifer* a diferentes condiciones de salinidad.
- Analizar la tolerancia de las cepas de *Ensifer* a diferentes condiciones de temperatura.
- Analizar la tolerancia de las cepas de *Ensifer* a diferentes condiciones de pH.
- Cuantificar los parámetros de desarrollo vegetal y de nodulación de las cepas de *Ensifer* a diferentes concentraciones de NaCl.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 CEPAS BACTERIANAS

Para este estudio, se seleccionaron un total de 11 cepas (LEM451, LEM453, LEM551, LEM456, LEM457, LEM459, LEM462, LEM463, LEM465, LEM466 y LEM468) de una colección perteneciente al laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; las cuales fueron aisladas de nódulos de *Phaseolus filiformis* de la región de la Bahía de Santa María, en la playa de Guadalupe, Los Cabos, Baja California Sur, ubicada a 22°55'51.5" N, 109°48'55.3" O y 9.5 msnm (Cuellar, 2011), mismas que pertenecen al género *Ensifer* y se caracterizan por tener resistencia a la salinidad y presentar un potencial biofertilizante en estudios hechos en *P. vulgaris* (Rocha *et al.*, 2015). También se emplearon la cepas *Rhizobium etli* CE3 y *Sinorhizobium saheli* ORS611 como control positivo en los ensayos de invernadero y a diferentes tipos de estrés.

6.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN

6.2.1 Medios YM y YMA

Las cepas de *Ensifer* fueron cultivadas rutinariamente a 28 °C en condiciones aerobias y en medio Levadura Manitol (YM) (Vincent, 1970) o en su variedad con agar (YMA) (Bergersen, 1961), cuya composición es:

Manitol.....	10 g
Extracto de levadura.....	1 g
K ₂ HPO ₄ cristalizado.....	0.66 g
Glutamato de sodio.....	0.5 g
NaCl.....	0.05 g
Solución T (MgSO ₄ •7H ₂ O 10 g/L).....	10 mL
Solución U (CaCl ₂ 40 g/L).....	1 mL
Solución V (FeCl ₃ •6H ₂ O 4 g/L).....	1 mL
Agar (para medio sólido).....	18 g

El pH se ajustó a 6.8 con HCl al 10%, posteriormente se esterilizó a 15 psi durante 15 minutos.

6.2.2 Medio Jensen libre de nitrógeno

Para la experimentación con plantas, se preparó medio Jensen libre de nitrógeno, (Somasegaran y Hoben, 1994) cuya composición es:

Solución P.....	10 mL
K ₂ HPO ₄ (20 g/L)	
MgSO ₄ (20 g/L)	
Solución Q.....	10 mL
NaCl (20 g/L)	

Solución R.....	20 mL
CaHPO ₄ (50 g/L)	
Solución D.....	10 mL
FeCl ₃ •6H ₂ O (4 g/L)	
Oligoelementos.....	1 mL
H ₃ BO ₃ (2.26 g)	
MnSO ₄ •4H ₂ O (2.03 g/L)	
ZnSO ₄ •7H ₂ O (0.22 g/L)	
CuSO ₄ •5H ₂ O (0.08 g/L)	
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O (0.09 g/L)	
Agua destilada cbp.....	1L
Agar (medio sólido).....	18 (g/L)

Nota: Si se necesita nitrógeno, agregar 0.5 g de KNO₃ o 0.5 g de NH₄NO₃.

6.2.3 Agar Agua

Para el proceso de germinación de la semilla de frijol, se emplearon cajas Petri con agar agua, el cual está conformado por:

Agar.....	18 g
Agua destilada cbp.....	1L

6.3 PRUEBAS DE TOLERANCIA

6.3.1 Salinidad

Cada una de las cepas bacterianas se cultivó en 5 mL de medio YM y se mantuvieron a 28 °C durante dos días en agitación constante. Pasado el tiempo, las células se precipitaron por centrifugación a 5, 000 rpm en un lapso de 10 minutos y se resuspendieron en 2 mL de medio YM estéril. A continuación, se tomaron muestras de esta solución bacteriana y se midieron en un espectrofotómetro UV/Visible Jenway 6305 hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 620 nm, lo cual equivale aproximadamente a 8×10^8 UFC.

Posteriormente, siguiendo el procedimiento de GSPM (Corral-Lugo *et al.*, 2012) se colocaron 100 µL de cada suspensión bacteriana y por triplicado en la fila superior de una placa multipozos. Después, se depositaron 180 µL de agua destilada estéril en el resto de los pozos. Concluida esta parte, se realizaron las diluciones seriadas en factor 1:10, tomando 20 µL de las muestras en la fila superior y transfiriéndolas a la fila inferior inmediata, diluyendo y homogenizando durante 8 segundos; para que de esta manera, estas muestras tuvieran una dilución 1/10. Igualmente, se tomaron 20 µL de esta fila y se pasaron a la tercera fila volviendo a diluir y homogenizar; estas muestras tenían una dilución 1/100. El procedimiento siguió hasta obtener una dilución 1/10000000 en la fila inferior de la

placa multipozos. Cada una de las diluciones (incluyendo la muestra inicial de la fila superior) fueron inoculadas en placas de medio YMA adicionado con NaCl (8.5×10^{-4} , 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 M) (Elboutahiri *et al.* 2010) utilizando para ello un replicador estéril (Fig. 8). Al finalizar, las placas se incubaron a 28 °C y se realizó un conteo de colonias diario durante un lapso de 5 días. Para calcular el número de UFC/mL, se siguió el procedimiento descrito por Corral-Lugo *et al.*, 2012.

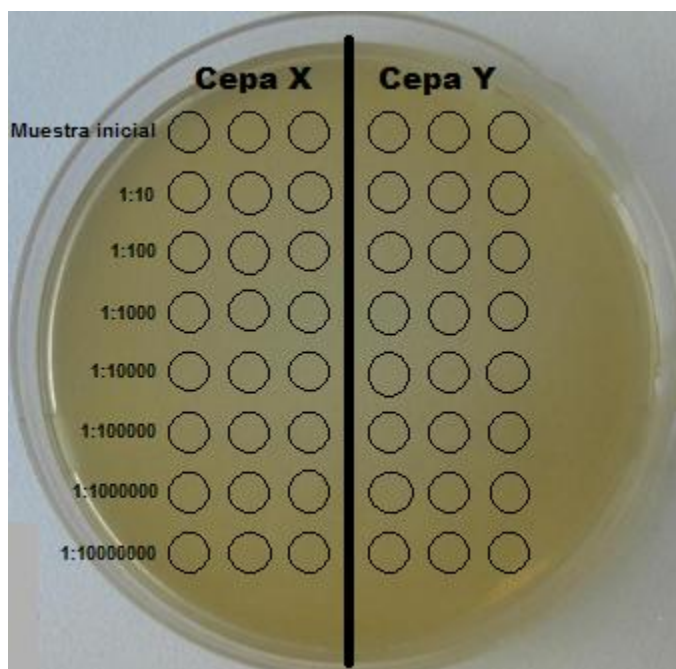


Fig. 8. Distribución general de la muestra inicial y sus diluciones de la técnica de Corral-Lugo de GSPM a lo largo de una placa, para dos cepas diferentes por triplicado cada una.

6.3.2 Elevadas temperaturas

Para esta prueba, la metodología empleada fue la misma que la descrita en el punto anterior, siguiendo el procedimiento descrito por Corral-Lugo *et al.*, 2012; la diferencia fue que las diluciones inoculadas en placas con medio YMA, en condiciones normales de salinidad, se incubaron a diferentes temperaturas (28 °C, 32 °C, 37 °C y 40 °C) (Elboutahiri *et al.* 2010), realizando de igual manera un conteo de colonias diario por un lapso de 5 días. Los cálculos posteriores para determinar las UFC/mL fueron tomados también del procedimiento descrito por Corral-Lugo *et al.*, 2012.

6.3.3 Diferentes valores de pH

Como en la metodología anterior, para este análisis se utilizó la técnica descrita en Corral-Lugo *et al.*, 2012. En este punto, las diluciones fueron inoculadas en placas con medio YMA en condiciones normales de salinidad pero con valores de pH modificados (5.3, 6.8, 8.3 y 9.5) (Elboutahiri *et al.* 2010) e incubadas a 28 °C. El conteo de colonias se realizó de manera similar que en el punto anterior y los cálculos de las UFC/mL se hicieron basándose en el procedimiento descrito por Corral-Lugo *et al.*, 2012.

6.4 ENSAYOS CON PLANTAS

6.4.1 Planta de frijol

En este ensayo, se emplearon plantas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* cv. Jamapa), tomando en cuenta que se seleccionaron aquellas semillas que no presentaban un daño mecánico visible y cuyo tamaño y color era uniforme.

6.4.2 Desinfección y germinación de las semillas

Las semillas de frijol previamente seleccionadas, fueron desinfectadas superficialmente, para lo cual se lavaron con jabón y se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% durante 3 minutos en agitación constante, después se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se colocaron sobre agar agua, dejándose germinar a 28 °C durante 72 horas en ausencia de luz.

6.4.3 Preparación del inoculo

A partir de los cultivos en YMA, se tomó una colonia de cada cepa y se resuspendieron en 5 mL de medio YM, incubándose durante 48 horas a 28 °C con agitación continua a 180 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 620 nm (equivalente a aproximadamente 8×10^8 UFC/mL).

6.4.4 Siembra e inoculación

El sistema de cultivo consistió en tubos de ensayo, los cuales contenían 20 mL de solución nutritiva Jensen gelificada en pico de flauta y 80 mL de solución Jensen líquida, ambas soluciones libres de nitrógeno y con una concentración de NaCl de 8.5×10^{-4} M, 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M y 0.2 M, para cada prueba respectivamente. Los tubos fueron cubiertos con papel aluminio, en el que se realizó una pequeña perforación para insertar la radícula de las semillas previamente germinadas. Para evitar que la luz incidiera directamente sobre las raíces, se cubrió con plástico negro la parte inferior de los tubos.

La inoculación de las plántulas se realizó después de la emergencia de los cotiledones, agregando 200 μ L de los cultivos en medio líquido. En ambos casos los ensayos se realizaron por triplicado, dejando en cada tratamiento un medio sin inocular, empleado como control negativo; así como un tratamiento inoculado con *R. etli* CIAT para ser tomado en cuenta como control positivo. Las plantas fueron conservadas durante 35 días y los tubos de ensayo fueron llenados según lo requirieran con la solución Jensen correspondiente al tratamiento.

6.4.5 Evaluación de los parámetros

El potencial fijador de nitrógeno fue evaluado por la medición de los siguientes parámetros de desarrollo vegetal: la altura y peso seco de la parte aérea de la planta, la altura y peso seco de la parte radical de la planta (Debouck e Hidalgo, 1985) y número de nódulos (Somasegaran *et al.*, 1991).

6.4.6 Longitud y peso seco de las plantas

La longitud total de la parte aérea y la parte radical del frijol fueron medidas y pesadas; posteriormente, las plantas se colocaron en bolsas de papel

debidamente etiquetadas para ser secadas en una estufa a 60 °C por un lapso de 24 horas, y así determinar el peso seco. Estos fueron obtenidos en una balanza analítica Shimadzu UW420H y los valores se expresaron en mg (Debouck e Hidalgo, 1985).

6.5 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES 16S rDNA, *glnA* Y *thrC*

Con la finalidad de confirmar la relación filogenética de nuestras cepas de interés, se realizó un análisis de secuencias de manera individual y un MLSA; para ello, primero se amplificaron dos genes de mantenimiento (*glnA* y *thrC*) y el gen 16S rDNA. Para la extracción de DNA se utilizó el “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó una mezcla de reacción de PCR en un volumen total de 25 µL, el cual contenía: 12.5 µL de buffer Master Mix (Thermo scientific), 1.25 µL de cada primer (*forward* y *reverse*), 9 µL de agua libre de nucleasa y 1 µL de DNA de cada muestra para todos los fragmentos, utilizando el 2400 GeneAmp PCR Systems® Perkin Elmer thermocycler para la reacción.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/mL) a 100 V durante 90 minutos, utilizando a su vez, un marcador de peso molecular de 1 kb (Fermentas). La visualización del gel se hizo en un transiluminador de luz UV (Spectroline). Las bandas de los productos de la amplificación fueron cortadas del gel y purificadas por medio del Qiaquick PCR purification kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y finalmente enviados para su secuenciación a los laboratorios del CINVESTAV campus Irapuato.

6.5.1 Gen 16S rDNA

Para llevar a cabo la amplificación del gen 16S rDNA, se utilizaron los siguientes primers: UN27F (5'-TAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y UN1392R (5'-CAG GGG CGG TGT GTA CA-3') (Morales-García *et al.*, 2011). El perfil de temperaturas para la PCR se muestra en la figura 8.

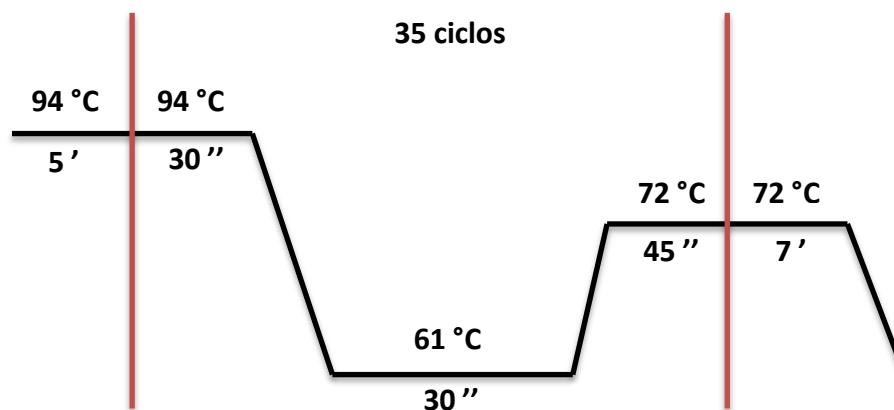


Fig. 9. Perfil de temperaturas para la amplificación del gen 16S rDNA (Morales-García *et al.*, 2011).

6.5.2 Gen *glnA*

La amplificación del gen *glnA* se hizo empleando los primers *glnA*144F (5'-GTC ATG TTC GAC GGY TCY TCG-3') y *glnA*1142R (5'-TGG AKC TTG TTC TTG

ATG CCG-3') (Martens *et al.*, 2007) y el protocolo de temperaturas y tiempos mostrado en la figura 9.

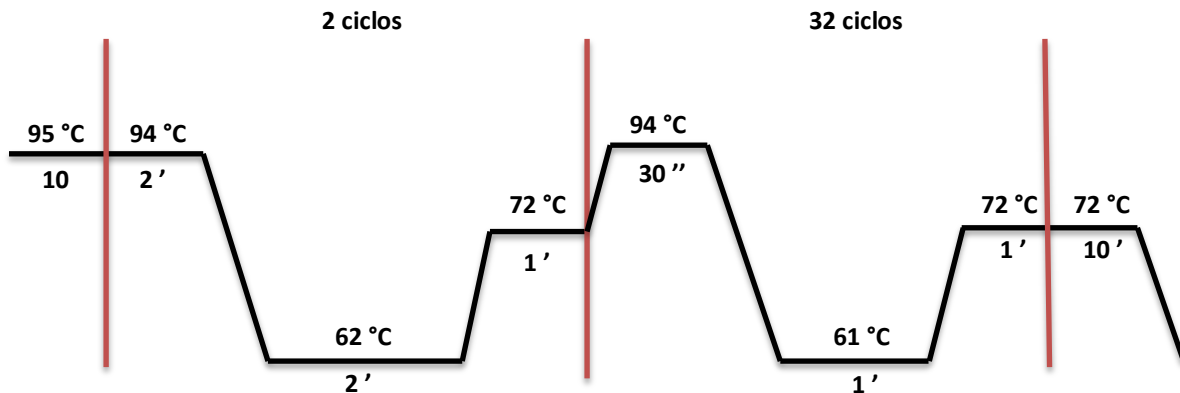


Fig. 10. Perfil de temperaturas para la amplificación del gen *glnA* (Martens *et al.*, 2007).

6.5.3 Gen *thrC*

Por último, para la amplificación del gen *thrC*, se tomaron los primers descritos por Martens en 2007: *thrC577F* (5'-GGR AAT TTD GCC GGR TGS GC-3') y *thrC1231R* (5'-GGC AMK TTC GAC GAY TGC CAG-3'), así como el perfil de temperaturas, mismo que se muestra a continuación.

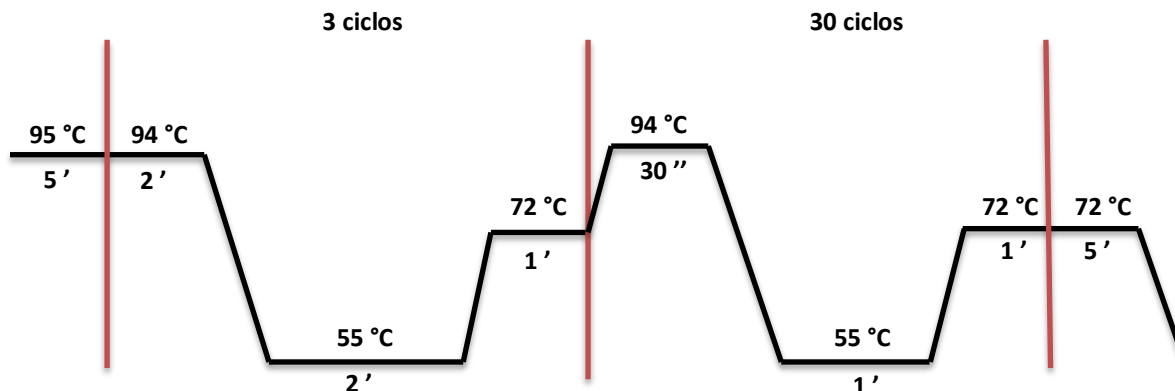


Fig. 11. Perfil de temperaturas para la amplificación del gen *thrC* (Martens *et al.*, 2007).

6.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El análisis de las secuencias de los genes 16S rDNA, *thrC* y *glnA*, además de los genes de mantenimiento descritos por Rocha *et al.*, 2015, *atpD*, *glnI*, *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *rpoB*; se llevó a cabo de manera individual para cada uno, así como de manera conjunta a través de un MLSA, mediante la comparación de estas secuencias con aquellas que se encontraron en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI).

6.6.1 Alineamiento, análisis y generación de árboles filogenéticos

El empalme tanto de las secuencias *forward* como *reverse* se llevó a cabo en el programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versión 7.0.8; el cual nos da un archivo en formato fasta, mismo que se manejó en un editor de texto. Este

paso sólo fue para las secuencias de los genes *thrC*, *glnA* y 16S rDNA; ya que las secuencias de los demás genes ya estaban empalmadas (Rocha *et al.*, 2015).

Posteriormente, las secuencias fueron alineadas con ayuda del programa CLUSTALX versión 2.0.10 y los archivos de alineamiento (*.aln) fueron importados nuevamente al programa Bioedit donde fueron procesados, obteniéndose nuevamente archivos en formato fasta, los cuales se importaron al programa GeneDoc versión 2.7.000 para generar archivos *.aa y poder ser exportados al programa DNAsp versión 4.50.3 para que, de esta manera, fueran manipulados y se produjeran archivos con formato MEGA (*.meg), los cuales, finalmente se procesaron con el programa MEGA versión 6.06, mismo que nos permitió llevar a cabo el análisis filogenético al generar los árboles filogenéticos (de manera individual para cada gen, así como el concatenado de todos los genes) mediante los algoritmos Neighbor Joining y Maximum Likelihood (Saito y Nei, 1987) y un análisis de confianza (bootstrap confidence analysis) de 1000 réplicas para determinar así la confiabilidad de la topología obtenida para cada árbol filogenético (Felsenstein, 1985).

Es de importancia aclarar que las cepas de referencias empleadas para este análisis fueron obtenidas de las secuencias en la base de datos del NCBI y de los trabajos de Martens *et al.*, 2007 y 2008.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 PRUEBAS DE TOLERANCIA

Por el lugar del que fueron aisladas las cepas, decidimos analizar su tolerancia a la salinidad, a diferentes temperaturas y condiciones de pH; y, de esta manera, comparar el crecimiento bacteriano bajo estos tipos de estrés.

7.1.1 Tolerancia a salinidad

La tolerancia al estrés salino, presentado por numerosos microorganismos del suelo, ha despertado interés debido a que, diversos estudios han comprobado que la salinidad afecta en gran medida la producción de los cultivos y la sustentabilidad de la agricultura en regiones áridas y semiáridas. Esto es causado principalmente por problemas asociados a la pobre calidad del agua de irrigación durante la temporada de sequía (Faghire *et al.*, 2011). En relación con los rhizobia, se ha descrito que el género *Ensifer* posee especies que pueden ser tolerantes a altas concentraciones de NaCl (Kuykendall *et al.*, 2005; Elboutahiri *et al.*, 2010), seguido del género *Rhizobium* (Martínez-Salazar *et al.*, 2009), *Bradyrhizobium* (Aparecida *et al.*, 2010) y *Mesorhizobium* (Soussi *et al.*, 1998).

Para el análisis de los diferentes tipos de estrés, se empleó la cepa *Sinorhizobium saheli* ORS611 como testigo, y así comparar a nuestras 11 cepas de interés. Como pruebas positivas se tomaron aquellas donde las cepas fueron capaces de crecer. En base a esto, pudimos observar que el crecimiento bacteriano no se afecta a ninguna concentración salina, tal y como se observa en las figuras 12, 13, 14, 15, 16 y 17; donde se grafica el promedio de los crecimientos bacterianos, además podemos observar que conforme se va aumentando la concentración de sal, el tiempo para obtener el número máximo de UFC es mayor.

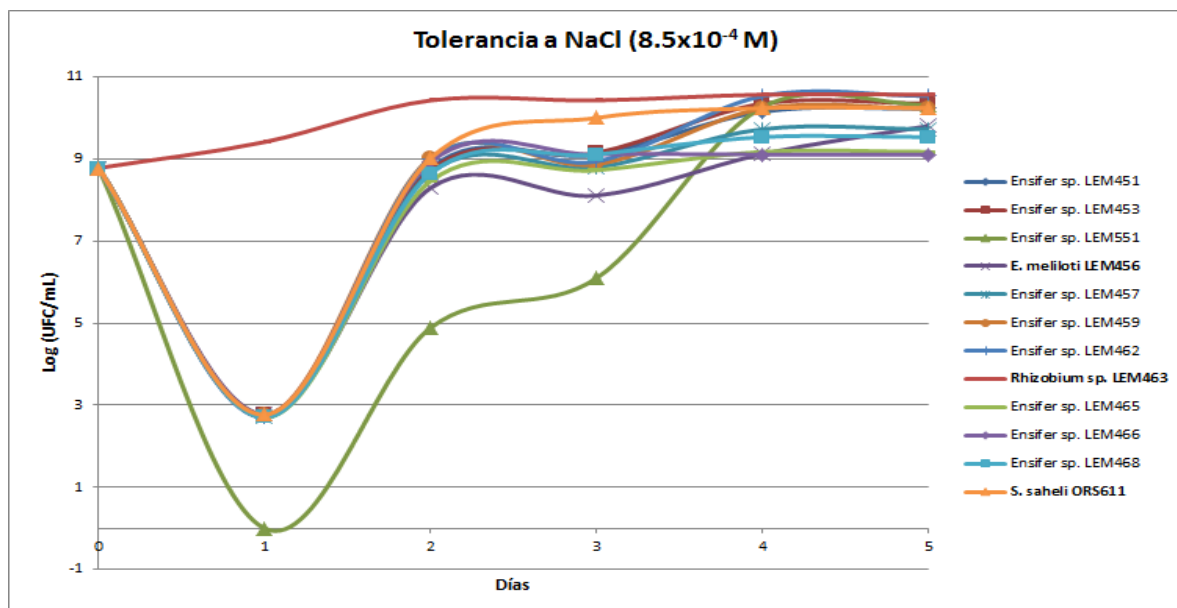


Fig. 12. Crecimiento bacteriano en condiciones normales de salinidad (8.5×10^{-4} M de NaCl).

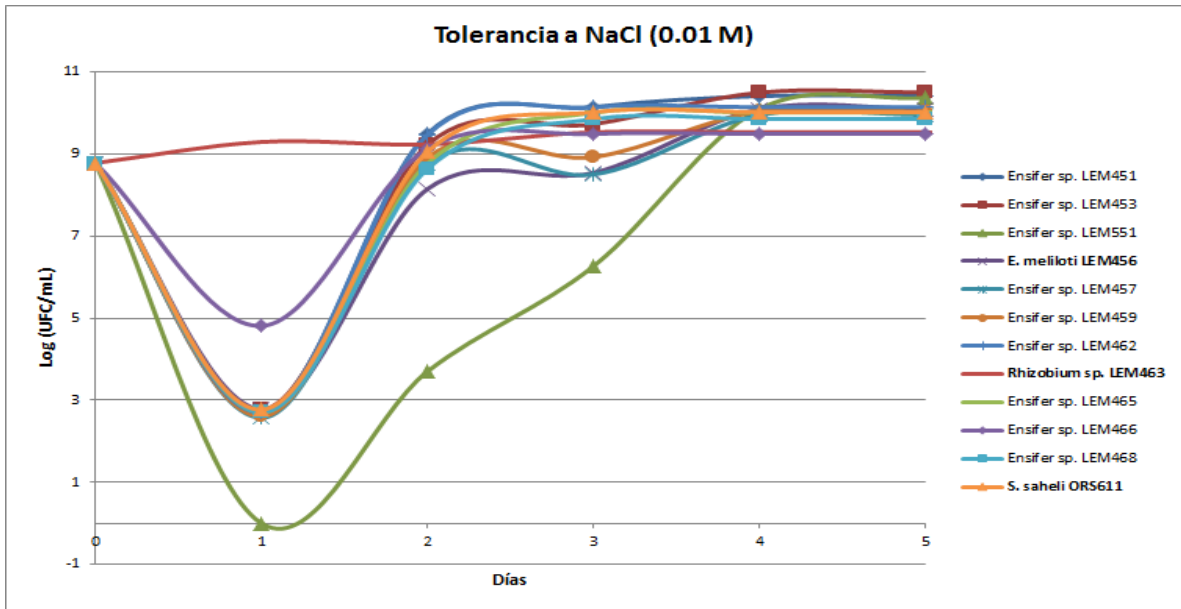


Fig. 13. Crecimiento bacteriano a una concentración de 0.01 M de NaCl.

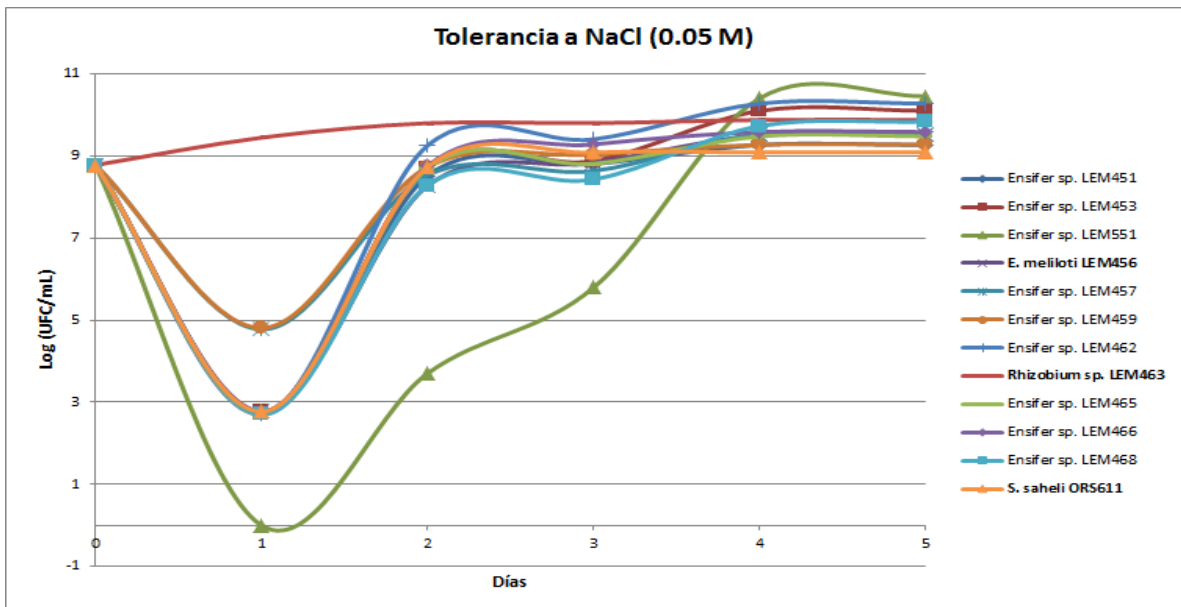


Fig. 14. Crecimiento bacteriano a una concentración de 0.05 M de NaCl.

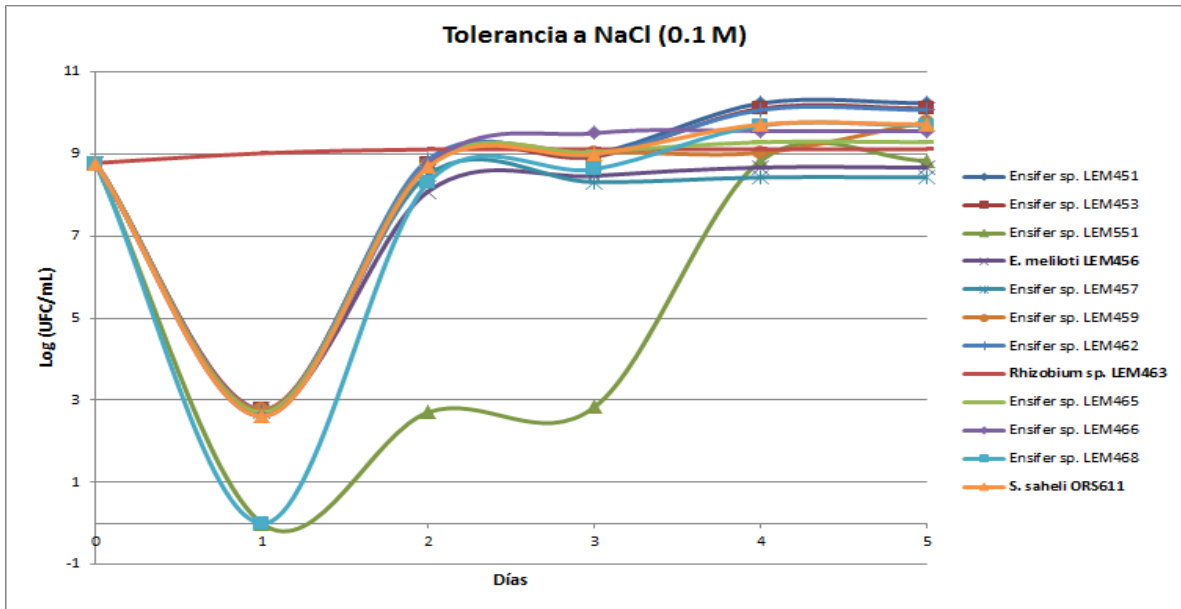


Fig. 15. Crecimiento bacteriano a una concentración de 0.1 M de NaCl.

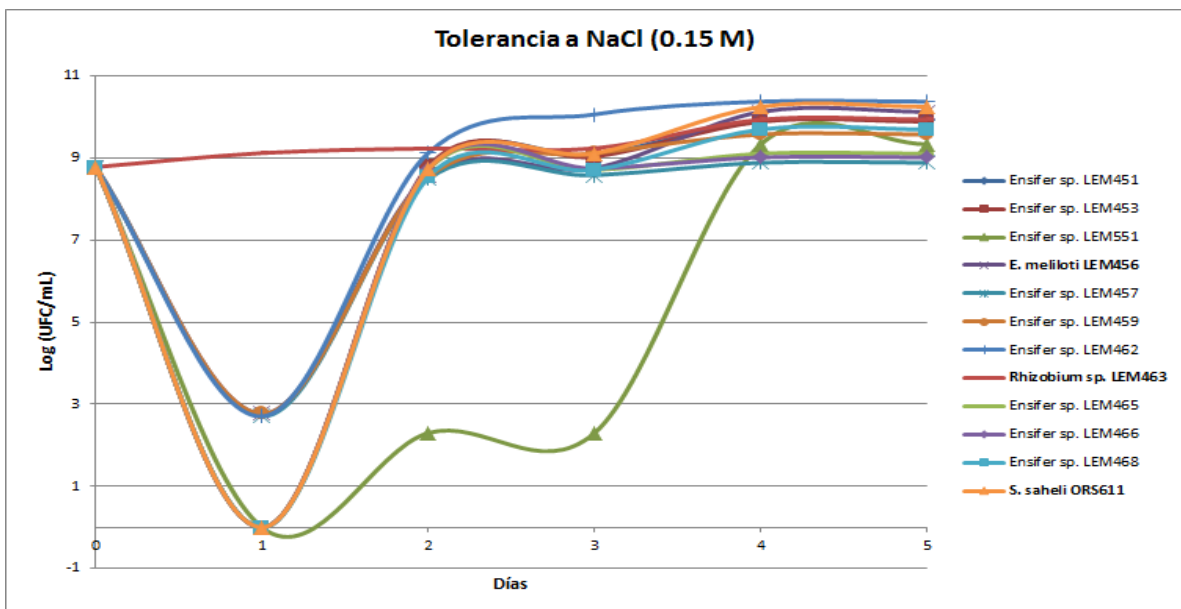


Fig. 16. Crecimiento bacteriano a una concentración de 0.15 M de NaCl.

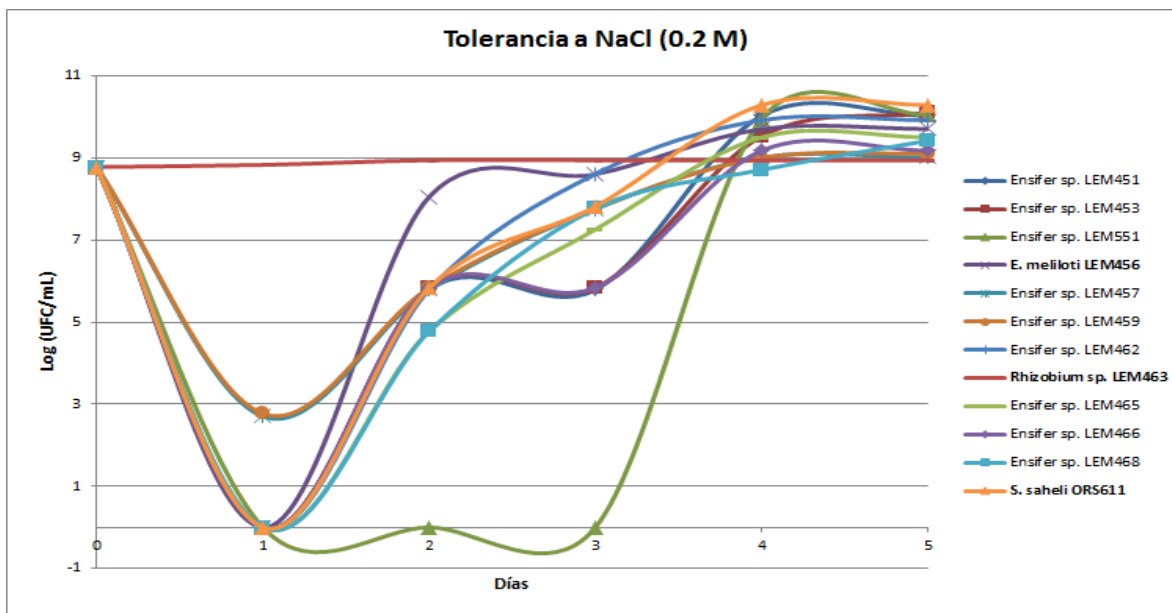


Fig. 17. Crecimiento bacteriano a una concentración de 0.2 M de NaCl.

En cada una de las figuras, se observa como la cepa *Rhizobium* sp. LEM463 crece con mayor rapidez que el resto de cepas analizadas. Así mismo, no presenta un tiempo de adaptación y su crecimiento no se ve afectado a las diferentes condiciones salinas del medio. De manera similar, podemos ver en las figuras anteriores el crecimiento de un grupo de cepas conformadas por *Ensifer* sp. LEM451, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466, LEM468, *E. meliloti* LEM456 y *S. saheli* ORS611; las cuales presentan un tiempo de adaptación de un día para los tratamientos salinos bajos y cerca de dos días para el valor máximo de 0.2 M de NaCl (Fig. 17), demostrando que a mayor cantidad de sal, el tiempo de adaptación es mayor. En cuanto a las UFC/mL, el grupo bacteriano alcanza el máximo número en un lapso de tres días, a diferencia de la cepa LEM463, la cual lo alcanza en el primero. Por último, se observa que el crecimiento de la cepa *Ensifer* sp. LEM551 presenta un tiempo de adaptación mayor al del resto de bacterias (2 días para tratamientos de hasta 0.05 M de NaCl y 3 días para las concentraciones mayores) y que el número máximo de UFC/mL los alcanza en un lapso de 4 días para el tratamiento de 0.2 M de NaCl (Fig. 17).

Con base en estos resultados, llegamos a la conclusión de que las bacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas del norte de México, no ven afectado su crecimiento con los valores de salinidad manejados en este experimento. Esta conclusión, se ve reforzada con lo observado por Rocha *et al.*, 2012, donde se probó la tolerancia de estas cepas a altas concentraciones de sal (desde 0.3 hasta 1 M de NaCl); de igual manera, otros estudios determinaron cómo algunas bacterias del género *Ensifer*, tal es el caso de *E. arboris* cepa HAMB1552, son capaces de tolerar concentraciones elevadas de sal e inclusive poder establecer simbiosis con plantas leguminosas en desierto (Elboutahiri *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 1992).

Una de las características más notorias observadas en este experimento fue el cambio en la morfología colonial a altas concentraciones de NaCl, en las

que las colonias pierden su característica mucóide y su crecimiento es puntiforme, llegando incluso a cambiar un poco su coloración, pasando de ser beige a blancas, como lo podemos ver en la Fig. 18.

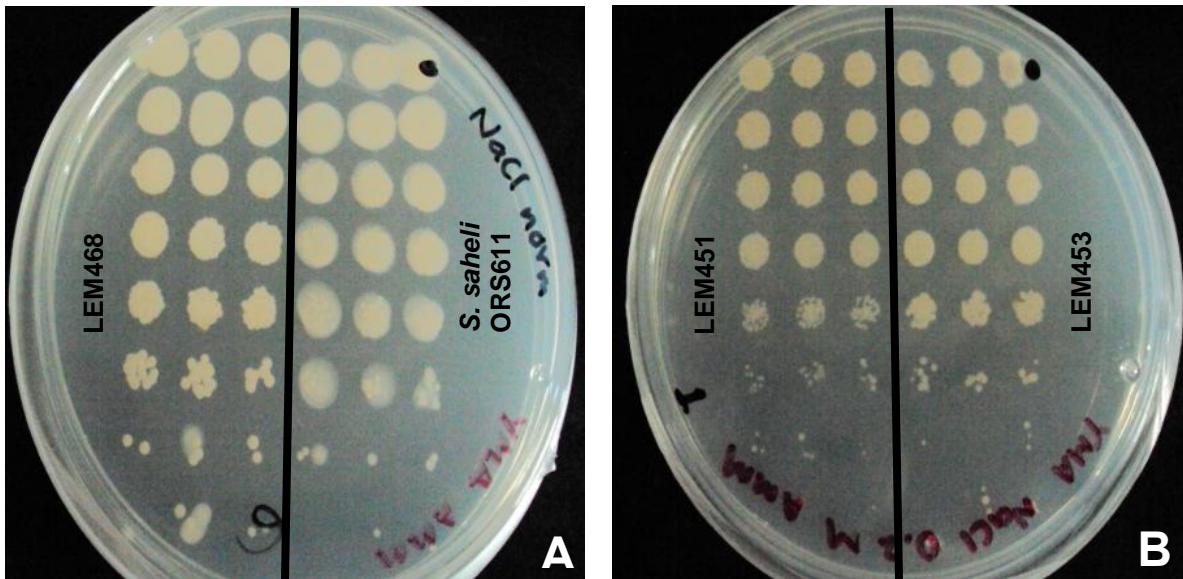


Fig. 18. Morfología colonial a diferentes concentraciones salinas, durante 5 días de incubación, mediante la técnica de GSPM. **A)** Concentración normal (8.5×10^{-4} M), **B)** 0.2 M de NaCl.

7.1.2 Tolerancia a temperaturas elevadas

El estrés térmico por calor es común en muchas partes del mundo, en parte debido a que más del 50% del planeta es árido, semiárido o sujeto a alguna clase de este tipo de estrés (Mayaka *et al.*, 2004). Dicha condición puede afectar adversamente el crecimiento y producción de algunas plantas, causando pérdidas en agricultura y silvicultura. La disminución en el crecimiento de las plantas por este estrés ha sido bien caracterizado en diversas especies de plantas, tales como arroz, maíz y diferentes leguminosas; siendo las altas temperaturas y la disponibilidad de nutrientes y agua, las principales restricciones para su productividad, alterando también la diversidad funcional de la microflora asociada a su raíz (Valladares *et al.* 2005; Bréda *et al.*, 2006; Marulanda *et al.*, 2006). Con respecto a este último punto, en ausencia de estas plantas hospederas, algunos microorganismos de suelo sufren una disminución en su población por las altas temperaturas, mientras que otras bacterias deben sobrevivir como saprófitas para poder persistir en estas regiones (Zahran *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2002). Por otra parte, se ha observado que la asociación de plantas, como las leguminosas, con bacterias del grupo de los rhizobia puede aliviar el estrés térmico por calor de la bacteria (Augé *et al.*, 2001; Morte *et al.*, 2001; Aranjuelo *et al.*, 2005), debido a que se han hecho experimentos extensos y donde se ha observado que la especie *Ensifer saheli* cepa HMBI1496 puede resistir temperaturas altas cercanas a los 40°C (Zahran *et al.*, 1994).

Partiendo de esto, se decidió probar la tolerancia que nuestras cepas pudieran mostrar a elevadas temperaturas. Los resultados se muestran en las figuras 19, 20, 21 y 22.

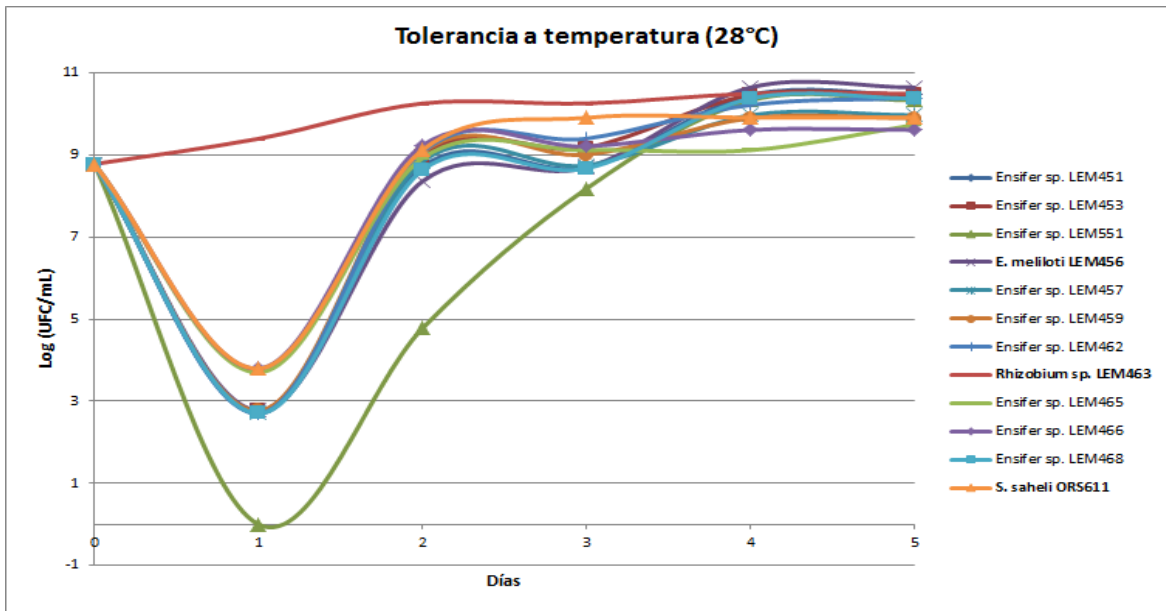


Fig. 19. Crecimiento bacteriano a una temperatura normal de 28°C.

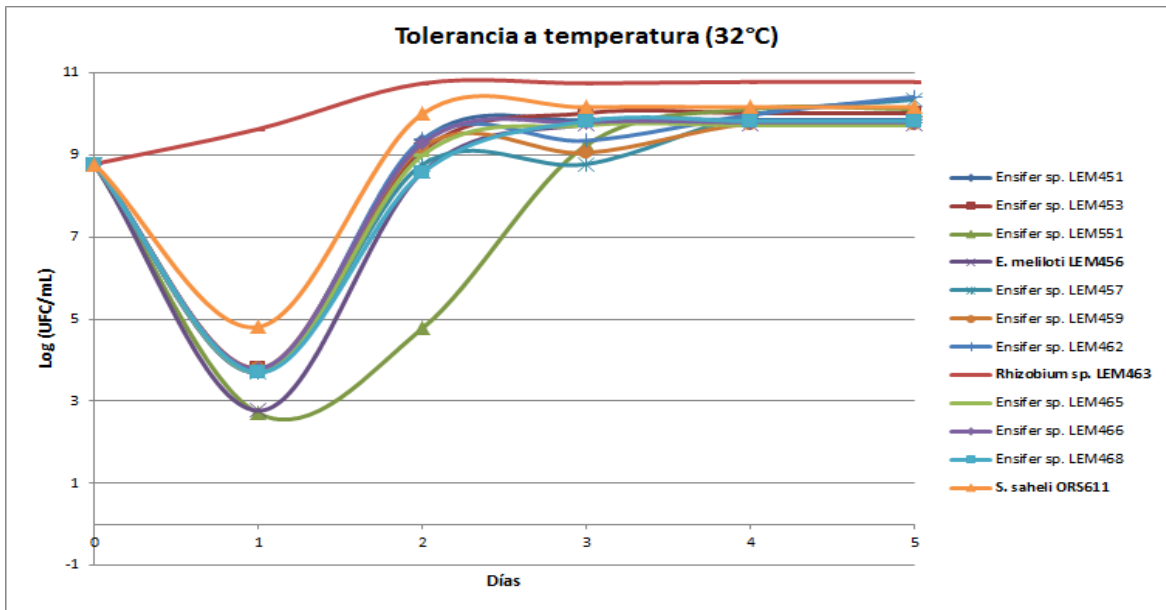


Fig. 20. Crecimiento bacteriano a una temperatura de 32°C.

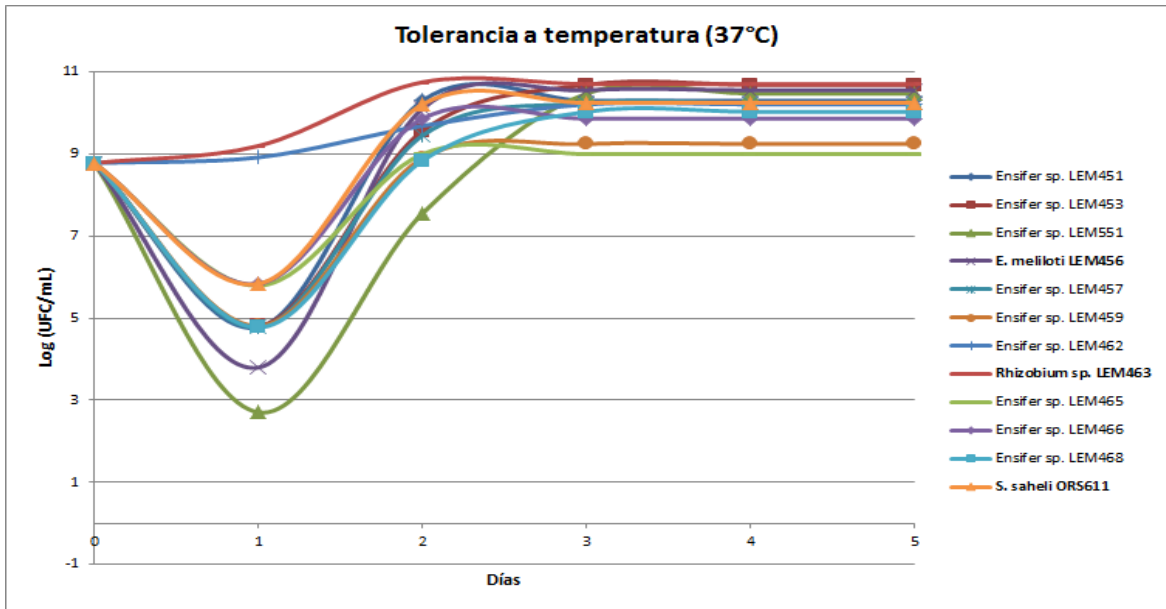


Fig. 21. Crecimiento bacteriano a una temperatura de 37°C.

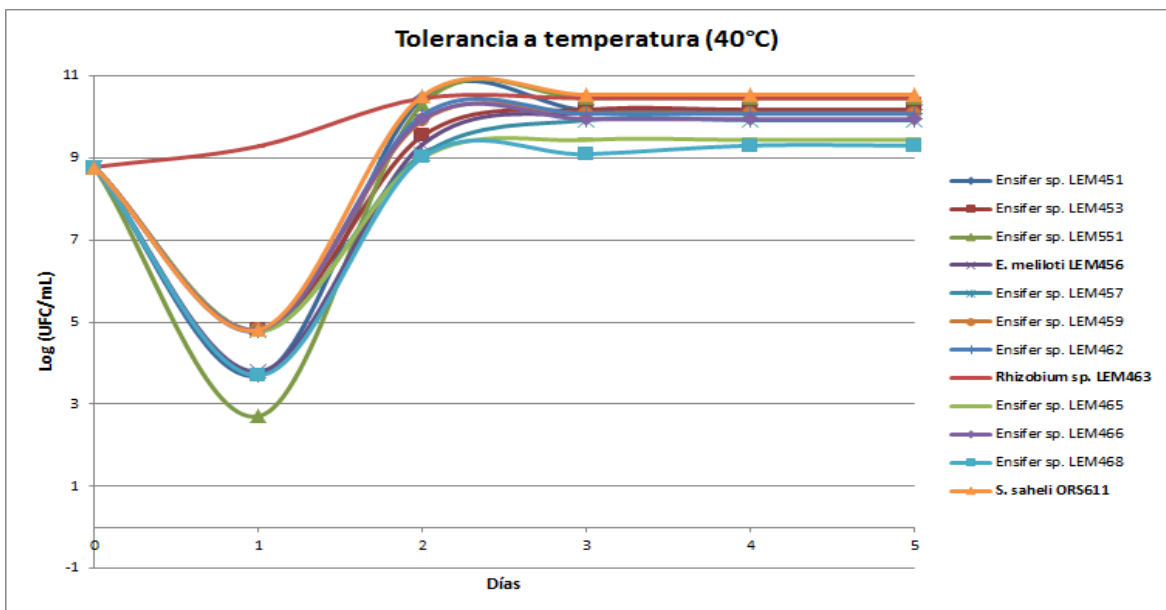


Fig. 22. Crecimiento bacteriano a una temperatura de 40°C.

Como se observa en cada una de las figuras, el promedio de los crecimientos de la cepa *Rhizobium* sp. LEM463 muestra un crecimiento rápido y no se observa alteración alguna en su curva de crecimiento a las diferentes temperaturas en las que fue incubada. Mientras que, el promedio del crecimiento bacteriano del grupo formado por las cepas *E. meliloti* LEM456, *Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466, LEM468 y *S. saheli* ORS611 presenta un periodo de adaptación de un día en las figuras correspondientes a los cambios de temperatura; de igual manera, en estas curvas de crecimiento, observamos que conforme se aumenta la temperatura, el tiempo

para alcanzar la fase estacionaria (y así el número máximo de UFC/mL) es menor, pasando a ser de casi tres días (Fig. 19 y 20) a dos días (Fig. 21 y 22).

Finalmente, el crecimiento de la cepa *Ensifer* sp. LEM551 nos muestra que esta cepa requiere un mayor tiempo de adaptación, de hasta dos días, para temperaturas bajas (Fig. 19 y 20); pero, lo sorprendente es que a mayores temperaturas, el tiempo de adaptación al medio se reduce a 24 horas por lo que su crecimiento se ve acelerado, inclusive su curva de crecimiento se asemeja a la del grupo bacteriano antes mencionado (Fig. 22).

Morfológicamente, sus colonias sufrieron alteraciones conforme la temperatura iba aumentando, produciendo una mayor cantidad de exopolisacárido en las temperaturas más altas (Fig. 23).

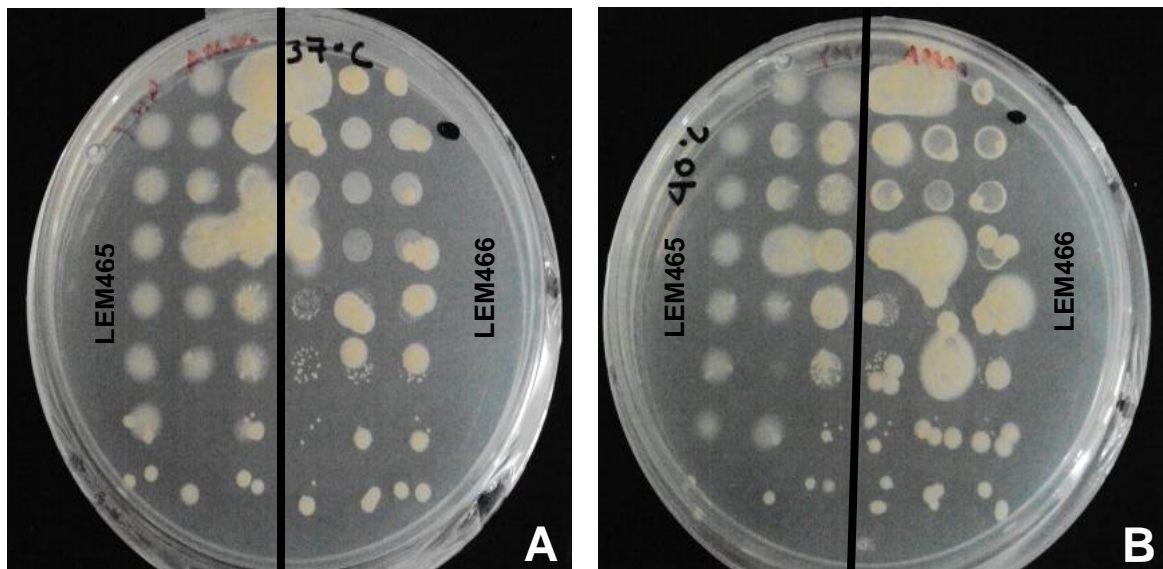


Fig. 23. Morfología colonial a diferentes temperaturas, durante 5 días de incubación, mediante la técnica de GSPM. A) 37°C, B) 40°C.

Tomando en cuenta estos resultados, podemos concluir que las bacterias fijadoras de nitrógeno, aisladas del norte de México, son tolerantes a las elevadas temperaturas empleadas en este ensayo; además, creemos que estas temperaturas elevadas son óptimas para su crecimiento. Comprobamos también la tolerancia de la bacteria *S. saheli* ORS611 a las elevadas temperaturas, apoyando lo reportado por Zahran *et al.*, 1994 para esa misma especie pero con la cepa HAMB11496.

7.1.3 Tolerancia a diferentes valores de pH

El suelo marginal es un medio ambiente complejo donde el crecimiento y desarrollo de diversas bacterias puede estar influenciado por diversas tensiones medioambientales, entre las que destacan la salinidad, el agua, las altas temperaturas, metales pesados y el pH. En este contexto, la acidez del suelo es un problema importante al que se enfrenta la producción agrícola en muchas áreas del mundo y limita la productividad de muchas plantas, entre ellas, las leguminosas (Bordeleau *et al.*, 1994; Clarke *et al.*, 1993; Correa *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 1992). Muchas de estas plantas requieren suelos neutros o

ligeramente ácidos para su crecimiento, especialmente cuando ellas dependen de la fijación simbiótica de nitrógeno (Bordeleau *et al.*, 1994; Brockwell *et al.*, 1991); ya que la acidez del suelo restringe la fijación del nitrógeno en ambientes tropicales y templados (Munns *et al.*, 1986), limitando así, la supervivencia y persistencia de los rhizobia en suelos y reduciendo la nodulación (Ibekwe *et al.*, 1997).

Siguiendo las bases antes mencionadas y las diferentes características que posee el ecosistema del cual provienen nuestros aislados, se decidió probar la tolerancia de nuestras bacterias a diferentes valores de pH, los resultados se observan a continuación.

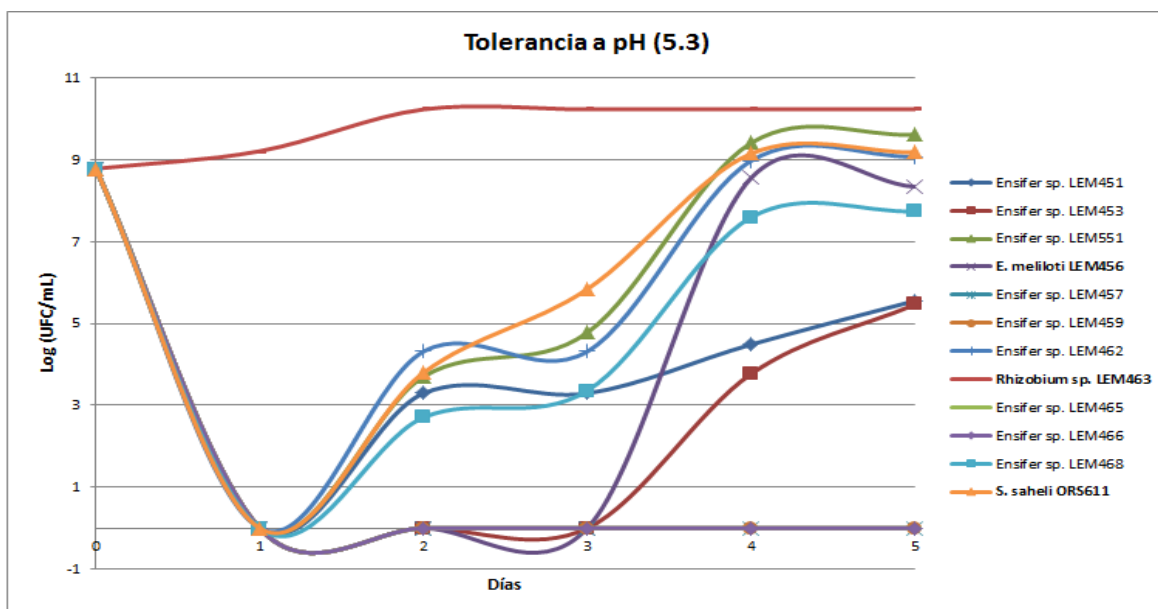


Fig. 24. Crecimiento bacteriano a un valor de pH de 5.3

En la figura 24, con un pH de 5.3, la cepa *Rhizobium* sp. LEM463 no altera su crecimiento con respecto a los demás valores, siendo el promedio de este muy rápido y sin necesidad de un tiempo de adaptación al medio. Caso contrario ocurre para las cepas *S. saheli* ORS611, *Ensifer* sp. LEM451, LEM551, LEM462 y LEM468; cuyo promedio de crecimiento es más lento, debido al tiempo que necesitan para su adaptación al medio (el cual es de dos días aproximadamente), pero su fase estacionaria la alcanzan en un lapso de cuatro días; a excepción de la cepa LEM451 cuya fase estacionaria no se obtuvo en el tiempo que duró el ensayo, por lo que sus UFC/mL disminuyeron dos órdenes de magnitud en comparación con LEM468 y cuatro órdenes de magnitud en comparación con LEM551.

Otro caso, son las cepas *E. meliloti* LEM456 y *Ensifer* sp. LEM453; su promedio de crecimiento fue más lento que el resto de cepas bacterianas, debido a que estas cepas requirieron de tres días para adaptarse al medio; sin embargo, *E. meliloti* LEM456 alcanzó su fase estacionaria al cuarto día de incubación, concordando así con estudios realizados con la cepa *E. meliloti* WSM419 donde se mostró que esta bacteria se desarrolla satisfactoriamente en el campo en

suelos ácidos (pH 5.0 a 5.5) (Clarke *et al.*, 1993; Howieson *et al.*, 1988), mientras que la cepa *Ensifer* sp. LEM453 obtuvo el mismo promedio de UFC/mL que la cepa LEM451 impidiendo así, llegar a su fase estacionaria y reduciendo su número de colonias en un pH ácido. Por último, las cepas *Ensifer* sp. LEM457, LEM459, LEM465 y LEM466 no lograron crecer a este valor de pH en el medio.

Diversos estudios han reportado que los granos de leguminosas acidifican el suelo en un alto grado y que las especies de leguminosas difieren en su capacidad para producir ácidos (McLay *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998). No obstante, se han identificado algunas especies de bacterias con una alta tolerancia para la acidez, tal es el caso de *R. tropici* y *R. loti*, las cuales se han caracterizado por ser moderadamente ácido tolerantes (pH=5) (Graham *et al.*, 1982; Tiwari *et al.*, 1992). También se demostró que las especies del genero *Ensifer* son menos tolerantes al pH ácido que las especies de *Bradyrhizobium* (Graham *et al.*, 1994), aunque algunas de ellas son consideradas ácido tolerantes (Wood *et al.*, 1988).

Al igual que con el pH ácido, decidimos analizar también la tolerancia de estas bacterias a valores básicos de pH. Los resultados se presentan a continuación.

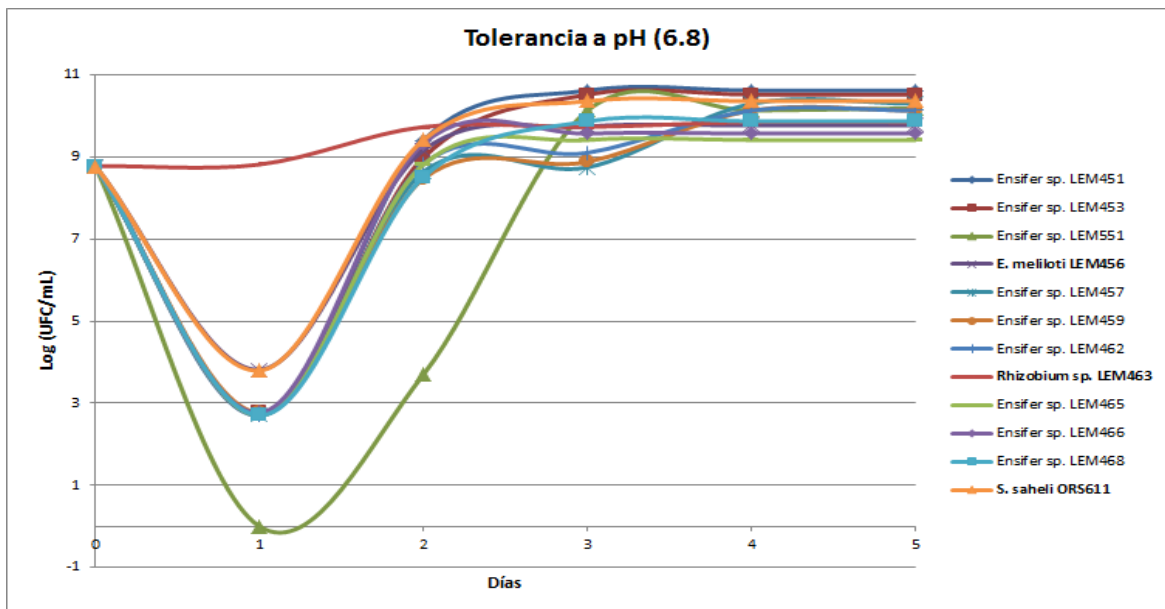


Fig. 25. Crecimiento bacteriano a un valor de pH de 6.8

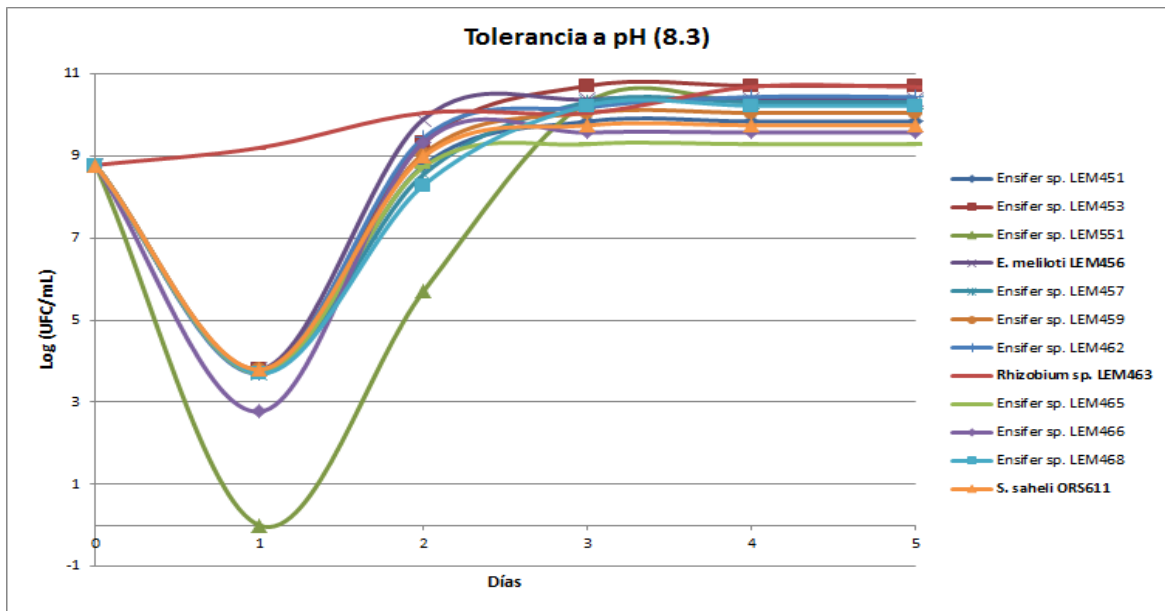


Fig. 26. Crecimiento bacteriano a un valor de pH de 8.3

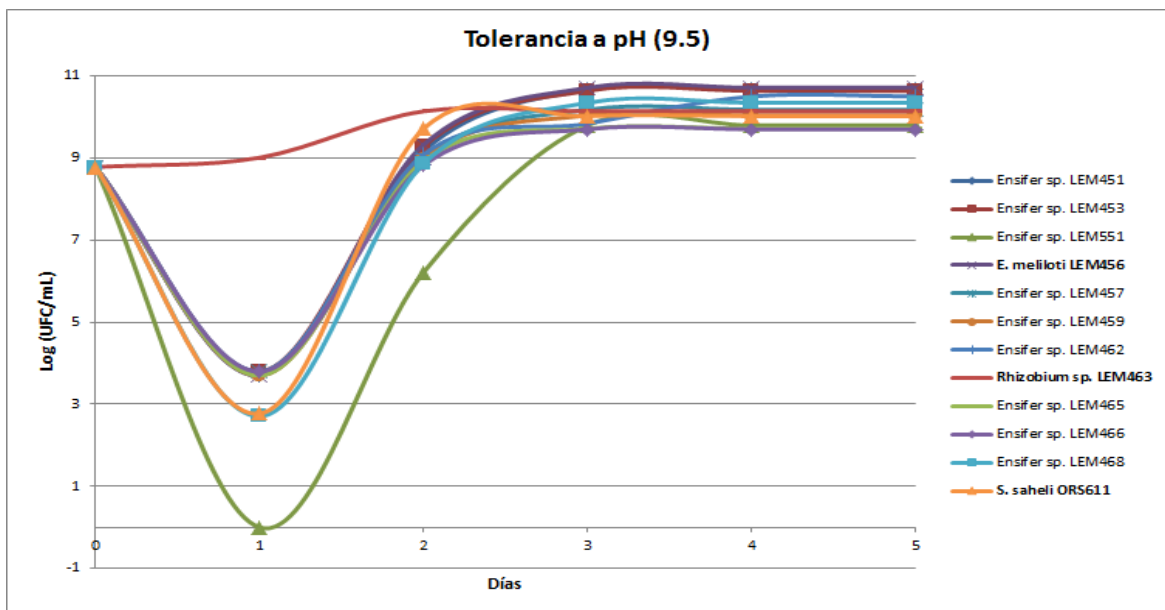


Fig. 27. Crecimiento bacteriano a un valor de pH de 9.5

En las figuras 25, 26 y 27, se puede observar que la cepa *Rhizobium* sp. LEM463 no presentó dificultades en su curva de crecimiento. Este mismo comportamiento lo presentó en todos los tratamientos, mostrando así su tolerancia tanto al estrés salino, como a las elevadas temperaturas y diferentes valores de pH. Por otro lado, las cepas *S. saheli* ORS611, *Ensifer meliloti* LEM456, *Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466 y LEM468 presentan un crecimiento más retardado, debido al tiempo que necesitan para adaptarse a los valores de pH en el medio, siendo de un día para todos los ensayos de pH, pero alcanzando su fase estacionaria al segundo día. Por último, se presenta el crecimiento de la cepa *Ensifer* sp. LEM551, en la cual observamos

el mismo tiempo de adaptación pero tardando un día más en llegar a su fase estacionaria, mismo que se acelera conforme se aumenta el valor de pH.

De manera general, en el aspecto morfológico, se puede apreciar que en medio ácido, las colonias son blanquecinas, puntiformes y se pierde el aspecto mucoso; mientras que en los medios básicos su coloración sigue siendo beige y entre más alto sea el valor de pH, aparentemente secretan más exopolisacárido (Fig. 28).

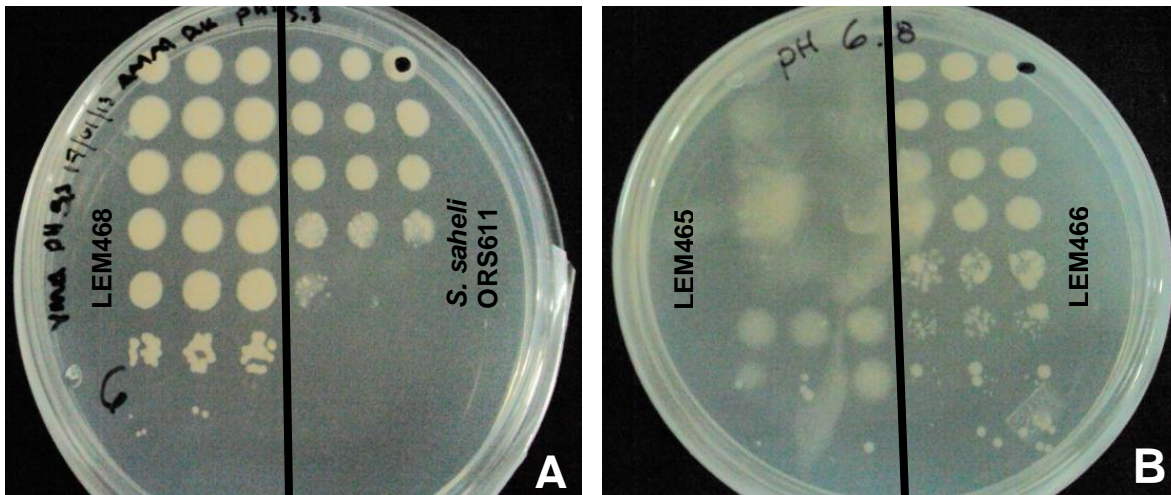


Fig. 28. Morfología colonial en medio YMA con diferentes valores de pH, durante 5 días de incubación, mediante la técnica de GSPM. A) pH 5.3, B) pH 6.8.

De acuerdo a estos resultados, podemos concluir que todas las bacterias de nuestro estudio son tolerantes a medios alcalinos, debido a que crecen sin problemas en un pH de hasta 9.5. Del mismo modo, concluimos que las cepas *Ensifer* sp. LEM451, 453, 551, 462, 468, *Ensifer meliloti* LEM456, *Rhizobium* sp. LEM463 y *Sinorhizobium saheli* ORS611 son bacterias ácido tolerantes pues logran crecer en medio con pH de 5.3.

Cabe aclarar que aunque no hay bases para apoyar que una alta tolerancia a la acidez o a la basicidad de una bacteria se reflejará en un mejor proceso simbiótico bajo estas condiciones, en otro experimento, cepas ácido tolerantes de *E. meliloti* potenciaron el establecimiento de *Medicago* spp., en suelos medianamente ácidos en Australia (Howieson *et al.*, 1986; 1988).

7.2 EFECTO DEL ESTRÉS SALINO EN EL DESARROLLO VEGETAL Y LA NODULACIÓN

La salinidad es una de las principales causas en la pérdida de tierras agrícolas y de la productividad en muchas partes del mundo; se sabe que cerca del 40% de la superficie terrestre puede presentar este tipo de estrés (Zahran, 1999). La mayoría de los cultivos son sensibles a bajos niveles de sal (Tuteja, 2007), pero en la simbiosis rhizobia-leguminosa, tanto la planta como la bacteria son sensibles a esta condición; siendo la simbiosis más sensible al estrés osmótico que la rhizobia de vida libre. Sin embargo, como vimos en resultados previos, hay algunas rhizobia capaces de tolerar un alto grado de salinidad y con

base en esto, se busca identificar y utilizar variedades resistentes para la solución de este problema.

Por ello, en este experimento se determinó la capacidad infectiva (formación de nódulos) de las siguientes cepas: *Ensifer* sp. LEM451, 453, 551, 457, 459, 462, 465, 466, 468 y *Ensifer meliloti* LEM456, así como de *Rhizobium etli* CE3 (control positivo) y *Sinorhizobium saheli* ORS611 (cepa testigo) en una interacción con plantas de frijol negro común (*Phaseolus vulgaris* cv. Jamapa); de igual manera, se cuantificaron algunos de los parámetros de desarrollo vegetal, tales como longitud y peso de la raíz, así como longitud y peso de la parte aérea de las mismas plantas. Todo el experimento de invernadero se dividió en dos partes por la cantidad de muestras que se analizaron.

7.2.1 Capacidad infectiva (Formación de nódulos)

Los resultados obtenidos de este análisis se representan en forma de gráfica, donde se observa el promedio del número y peso seco de los nódulos formados por la interacción (Fig. 29).

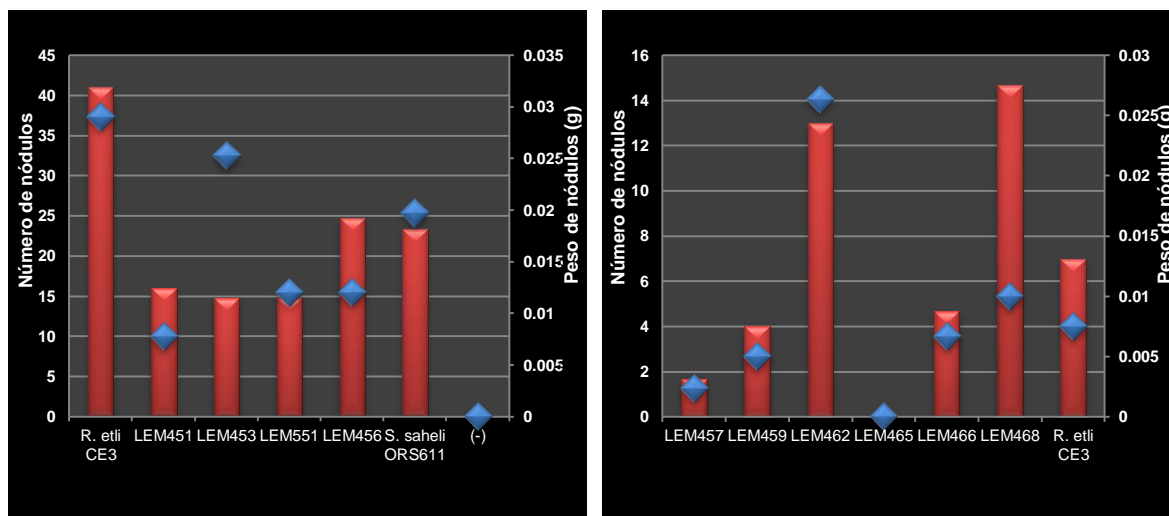


Fig. 29. Número de nódulos (barras) y pesos secos de estos (rombos), formados en plantas *P. vulgaris* cv. Jamapa en interacción con nuestras cepas de interés, bajo condiciones normales (8.5×10^{-4} M de NaCl).

En las gráficas anteriores, se puede observar que la producción de nódulos se ve disminuida comparada con nuestro control positivo (41 nódulos), estando en el rango de 13 y 25 nódulos para las cepas más productoras (*Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM551, LEM462, LEM468 y *E. meliloti* LEM456); sin embargo, la cantidad de nódulos generados por nuestra cepa testigo cayó en este mismo rango (24 nódulos). Cabe aclarar, que tanto nuestras cepas de interés como nuestra cepa testigo pertenecen a un género diferente a nuestro control positivo y según los reportes, *R. etli* es el microsimbionte que seguramente coevolucionó con el frijol (Segovia *et al.*, 1993). Para otras cepas como *Ensifer* sp. LEM457, LEM459 y LEM466 su producción es muy baja (2, 4 y 5 nódulos, respectivamente), mientras que la cepa *Ensifer* sp. LEM465 no generó nódulos, no obstante, esta planta sobrevivió por el lapso de 35 días que duró el experimento.

De igual manera, el ensayo se hizo con diferentes concentraciones salinas y los resultados se muestran a continuación (Fig. 30).

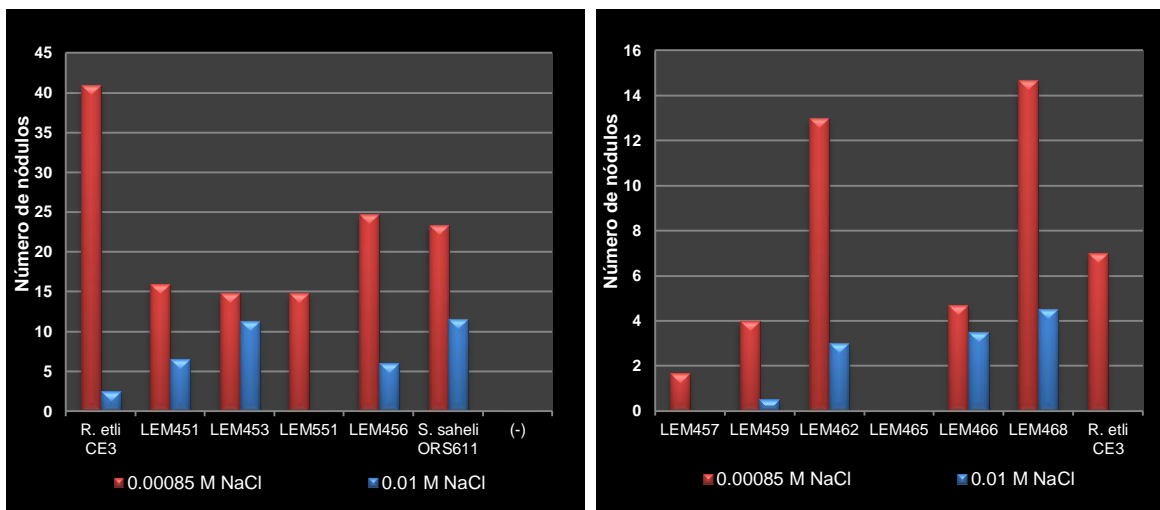


Fig. 30. Número de nódulos en condiciones normales de salinidad (8.5×10^{-4} M) (barras rojas) y a una concentración de 0.01 M de NaCl (barras azules), formados en plantas *P. vulgaris* cv. Jamapa en interacción con nuestras cepas de estudio.

En la figura 30, se observa que la formación de nódulos solamente se manifiesta a una concentración normal de sal y a su valor más bajo de tratamiento (0.01 M de NaCl). También, observamos que conforme se aumenta la concentración de sal, el número de nódulos disminuye, incluso se inhibe para las cepas *Ensifer* sp. LEM551 y LEM457. Esto ha sido reportado en otros trabajos donde se expresa que el estrés salino reduce la nodulación de leguminosas mediante la inhibición de los eventos simbióticos tempranos, tales como la colonización de la raíz, infección y desarrollo del nódulo (Tu, 1981; Zahran y Sprent, 1986; Zahran, 1991; 1999; Bouhmouch *et al.*, 2005), así como la actividad fijadora de nitrógeno por unidad de peso de los nódulos (Delgado *et al.*, 1993; 1994; Baker *et al.*, 1995; Aydi *et al.*, 2008).

Se sabe pues, que la iniciación de la nodulación es más sensible al estrés salino que el desarrollo del mismo nódulo, y esto se pudo observar en los resultados; ya que, en concentraciones altas de sal (0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 M) no hubo formación de nódulos, mientras que en concentraciones bajas (0.01 M), sí hubo formación, pero su tamaño fue más pequeño, comparado con los nódulos en condiciones normales, y su peso no fue cuantificable (>0.001 g) (Fig. 31).



Fig. 31. Nódulos formados en la raíz de *P. vulgaris* cv. Jamapa. **A)** Concentración normal (8.5×10^{-4} M NaCl), **B)** Concentración de 0.01 M NaCl.

Aunque altas concentraciones salinas inhibieron la nodulación en frijol, se sabe que hay algunas variedades de leguminosas que fijan nitrógeno exitosamente bajo estas condiciones, tal es el caso de *Medicago sativa*, *Vicia faba* y *Trifolium alexandrinum* (Zahran *et al.*, 1978; Mohammad *et al.*, 1989b), mismas que producen nódulos indeterminados los cuales son más tolerantes a la salinidad que los nódulos determinados formados por otras leguminosas como *Vigna*, *Glycine* y *Phaseolus* spp. (Sprent, 1983; 1985); ya que, estos nódulos pueden contener una alta concentración de iones Na^+ y Cl^- cuando están en presencia de estas condiciones salinas (Serraj *et al.*, 1998; Ashraf y Bashir, 2003).

7.2.2 Longitud y peso de la parte aérea y de la raíz

Los resultados de este análisis nos muestran que el aumento en la concentración salina afecta el crecimiento de las plantas de manera importante, ya que, a una concentración superior a 0.05 M de NaCl, la planta no logró desarrollarse.

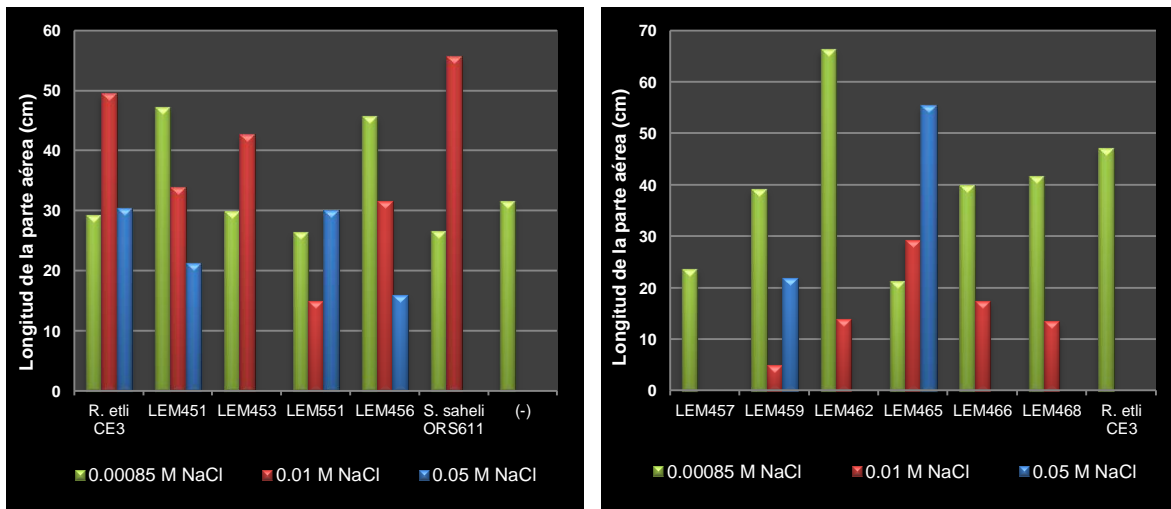


Fig. 32. Promedio de las longitudes de las partes aéreas de plantas de *P. vulgaris* cv. Jamapa en interacción con las cepas de nuestro estudio.

Como se observa en la figura 32, una concentración de 0.05 M de NaCl en el medio, afectó el desarrollo de las plantas que interaccionaban con las cepas

Ensifer sp. LEM453, LEM457, LEM462, LEM466, LEM468 y *S. saheli* ORS611, mientras que aquellas en simbiosis con *Ensifer* sp. LEM451, LEM551, LEM459, LEM465 y *E. melloti* LEM456 presentaron un desarrollo normal. Para el caso de la concentración más baja de nuestro análisis (0.01 M de NaCl), solamente la planta en interacción con la cepa *Ensifer* sp. LEM457 no logró desarrollarse bajo esta condición. El desarrollo de las plantas puede verse también en la figura 34.

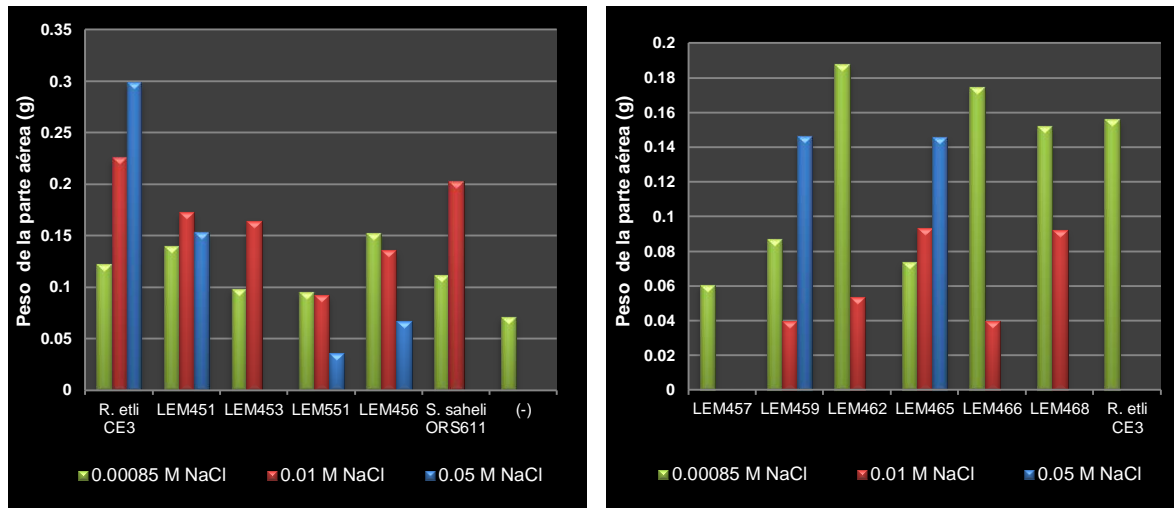


Fig. 33. Promedio de los pesos secos de las partes aéreas de plantas de *P. vulgaris* cv. Jamapa en interacción con las cepas de nuestro estudio.

En cuanto al peso seco de la parte aérea (Fig. 33), se observa cómo en las plantas relacionadas con las cepas *Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM459, LEM465 y *S. saheli* ORS611 hay un incremento en la biomasa conforme la salinidad aumenta; en otros trabajos, se atribuye a la liberación de compuestos, por parte de la bacteria, los que favorecerían para el crecimiento de la planta en suelos salinos; otra teoría es que algunas leguminosas pueden llegar a ser tolerantes a pequeñas cantidades de sal cuando son sometidas a este estrés en fases tempranas de su crecimiento (Cassman y Rains, 1986).

La figura 34 nos muestra el crecimiento de las plantas interaccionando con nuestras bacterias. Como podemos ver, en las concentraciones elevadas de sal (Fig. 34D y 34E), el desarrollo de las plantas fue escaso y con el paso de los días se marchitaron. Para la concentración de 0.2 M de NaCl (Fig. 34F) el crecimiento se inhibió por completo, corroborando así lo reportado por Madueño-Molina *et al.*, 2006 quien observó que la salinidad reduce la producción agrícola mediante la inhibición del crecimiento de las plantas. Por otro lado, en las figuras 34B y 34C el crecimiento de las plantas fue normal, inclusive, no se distinguieron diferencias entre ellas, ni con las plantas crecidas a concentraciones normales de sal (Fig. 34A).



Fig. 34. Plantas de *P. vulgaris* cv. Jamapa en interacción con las cepas de nuestro interés, crecidas durante 21 días. **A)** 8.5×10^{-4} M, **B)** 0.01 M, **C)** 0.05 M, **D)** 0.1 M, **E)** 0.15 M y **F)** 0.2 M de NaCl.

De manera similar, la salinidad también está involucrada tanto en la longitud como en el peso seco de las raíces de plantas de *P. vulgaris* (Fig. 35 y 36), observando que el aumento en la concentración salina incrementa su longitud y peso, la mayor diferencia, en la longitud, es la presentada por la planta interactuando con *E. meliloti* LEM456 (6 cm), mientras que para el peso, la mayor diferencia es observada con la planta en relación con *Ensifer* sp. LEM453 (0.05 g).

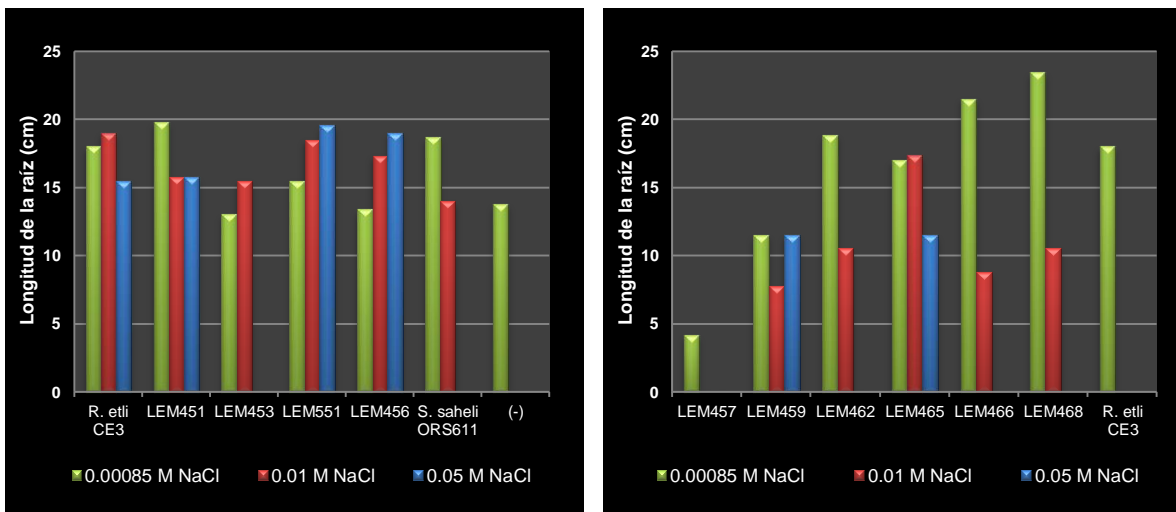


Fig. 35. Promedio de las longitudes de las raíces de plantas de *P. vulgaris* cv. Jamapa, en interacción con las cepas de nuestro interés.

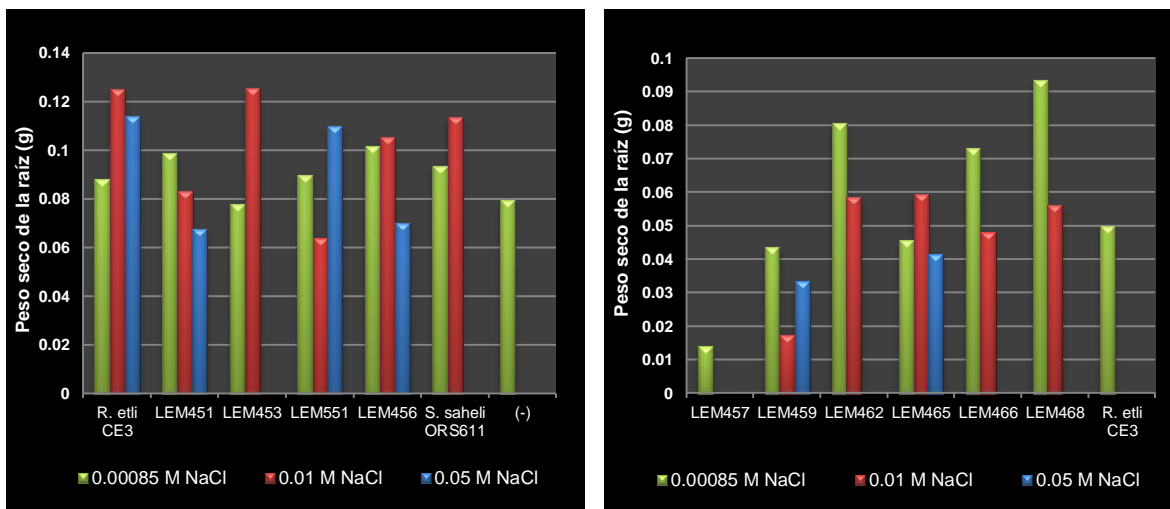


Fig. 36. Promedio de los pesos secos de las raíces de plantas de *P. vulgaris* cv. Jamapa, en interacción con las cepas de nuestro interés.

Diferentes estudios concuerdan en que las leguminosas son clasificadas como cultivos sensibles a la sal (Läuchli, 1984) y la limitación en su productividad está asociada con el bajo crecimiento de la planta huésped, pobre desarrollo simbiótico de bacterias noduladoras de raíz (Georgiev y Atkins, 1993) y una consecuente reducción en la capacidad fijadora de nitrógeno (Delgado *et al.*, 1993), afectando además la actividad de algunas enzimas y provocando una disminución en su crecimiento (Shaheen, 1984; Friedman *et al.*, 1989). Del mismo modo, en algunas leguminosas, los patrones de distribución de carbohidratos y solutos orgánicos, como la prolina, cambian bajo estrés salino (Joshi, 1984; Brady *et al.*, 1984; Ashraf, 1989), explicando así, otra manera de disminuir su crecimiento.

Sin embargo, se sabe que la aplicación de fertilizantes nitrogenados para el crecimiento de leguminosas en climas áridos puede incrementar la tolerancia a la salinidad de esas plantas. No obstante, el incremento en los costos de los fertilizantes nitrogenados y el daño al incrementar la salinidad del suelo está, probablemente, limitando la aplicación de estos compuestos. Es por ello, que el interés en la fijación biológica del nitrógeno se ha visto incrementada en años recientes (Arutyunova & Shevyakova, 1984; Mohammad *et al.*, 1989a).

7.3 MLSA

El Análisis de Secuencias Multilocus (MLSA) es una herramienta efectiva para la identificación de cepas y designación taxonómica, la cual es usada en la actualidad como una alternativa a la hibridación DNA-DNA para delimitar genoespecies, empleando para ello genes de mantenimiento, los cuales codifican para proteínas con un nivel de divergencia superior que los genes rRNA, pero conservados suficientemente para mantener la señal filogenética; así, al concatenar sus secuencias, se pueden observar los patrones de agrupamiento entre las grandes poblaciones de cepas estrechamente relacionadas, incluso para aquellos taxa que experimentan frecuentes transferencias laterales de genes y recombinación homóloga (Papke *et al.*, 2011; Martens *et al.*, 2007). Una de las

desventajas que presenta este análisis es que los resultados obtenidos pueden variar considerablemente, debido a la selección de los genes de mantenimiento, la cantidad de los mismos y el método de cálculo empleado para comparar las secuencias obtenidas (Glaeser y Kämpfer, 2015). Sin embargo, basándonos en los resultados obtenidos por Rocha *et al.*, 2015, se decidió utilizar este análisis para identificar la especie a la cual pertenecen nuestras cepas de estudio, teniendo especial cuidado en la elección del tipo y número de genes de mantenimiento, así como del método empleado para comparar nuestras secuencias.

7.3.1 Amplificación del gen 16S rDNA y los genes de mantenimiento *glnA* y *thrC*.

Además de las secuencias que Rocha *et al.*, 2015 obtuvo para su análisis, *recA* (recombinasa A), *dnaK* (proteína de choque térmico, Hsp70) (Stepkowsky *et al.*, 2003), *atpD* (subunidad beta de la ATP F1 sintasa), *glnII* (glutamina sintetasa tipo II) (Martens, 2007), *gyrB* (Subunidad beta de la girasa del DNA) y *rpoB* (Subunidad beta de la RNA polimerasa) (Martens, 2008); se optó por amplificar otros dos genes de mantenimiento, *glnA* (Glutamina sintetasa tipo I) y *thrC* (treonina sintasa) (Martens, 2008); al igual que el gen 16S rDNA. Esto, con la finalidad de incrementar la profundidad del análisis realizado previamente (Rocha *et al.*, 2015). Para ello, primero se hizo una PCR obteniéndose fragmentos de 1400 pb para el gen 16S rDNA (Fig. 37A), 900 pb para el gen *glnA* (Fig. 37B) y 600 pb para el gen *thrC* (Fig. 37C). Estos fragmentos, se mandaron a secuenciar las muestras para continuar con nuestro análisis.

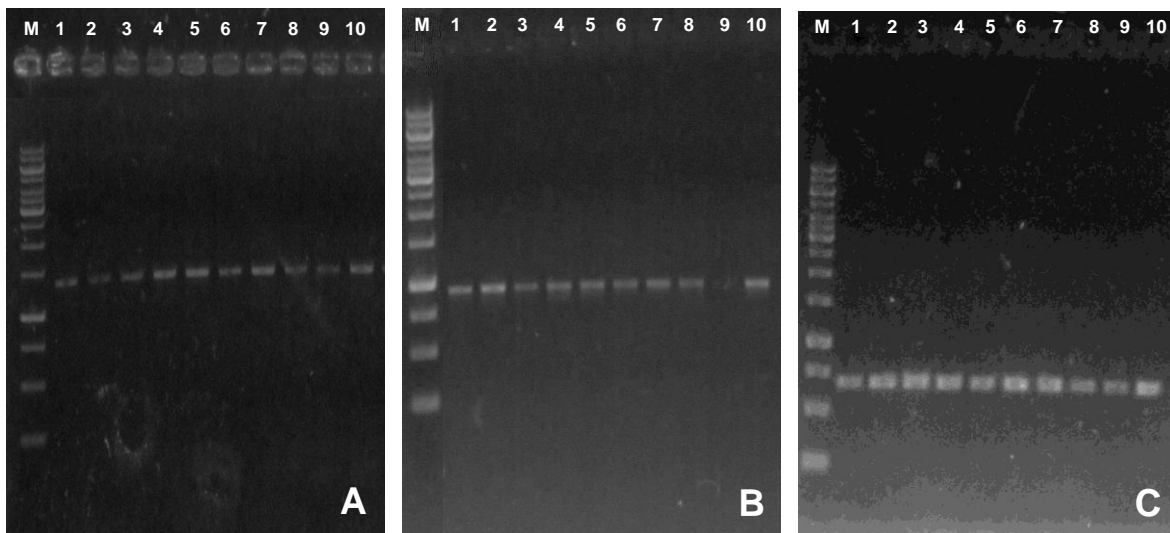


Fig. 37. Fragmentos de los genes **a)** 16S rDNA, **B)** *glnA*, **C)** *thrC* en geles de agarosa al 1%. Carriles: **M**, Marcador; **1**, LEM451; **2**, LEM453; **3**, LEM551; **4**, LEM456; **5**, LEM457; **6**, LEM459; **7**, LEM462; **8**, LEM465; **9**, LEM466; **10**, LEM468.

7.3.2 Árboles independientes

En este análisis, se generaron árboles filogenéticos, de manera individual para cada gen, mediante el método de Neighbor Joining (NJ); el cual, transforma los caracteres en distancias para poder analizarlos mediante métodos basados en

matrices de distancias (Vinuesa, 2008). Para facilitar nuestro estudio, los árboles fueron enraizados con secuencias del género *Rhizobium*.

7.3.2.1 Gen *atpD*

Varios genes de mantenimiento ya han sido utilizados como marcadores filogenéticos alternativos en rhizobia, *atpD*, *recA* (Gaunt *et al.*, 2001), *glnA*, *glnB* (Turner y Young, 2000; Wernegreen y Riley, 1999), *dnaK* (Stepkowski *et al.*, 2003) y *gltA* (Hernández-Lucas *et al.*, 2004), debido a que presentan una alta concordancia con los resultados obtenidos del análisis del gen 16S rRNA y una gran congruencia entre ellos (Gaunt *et al.*, 2001).

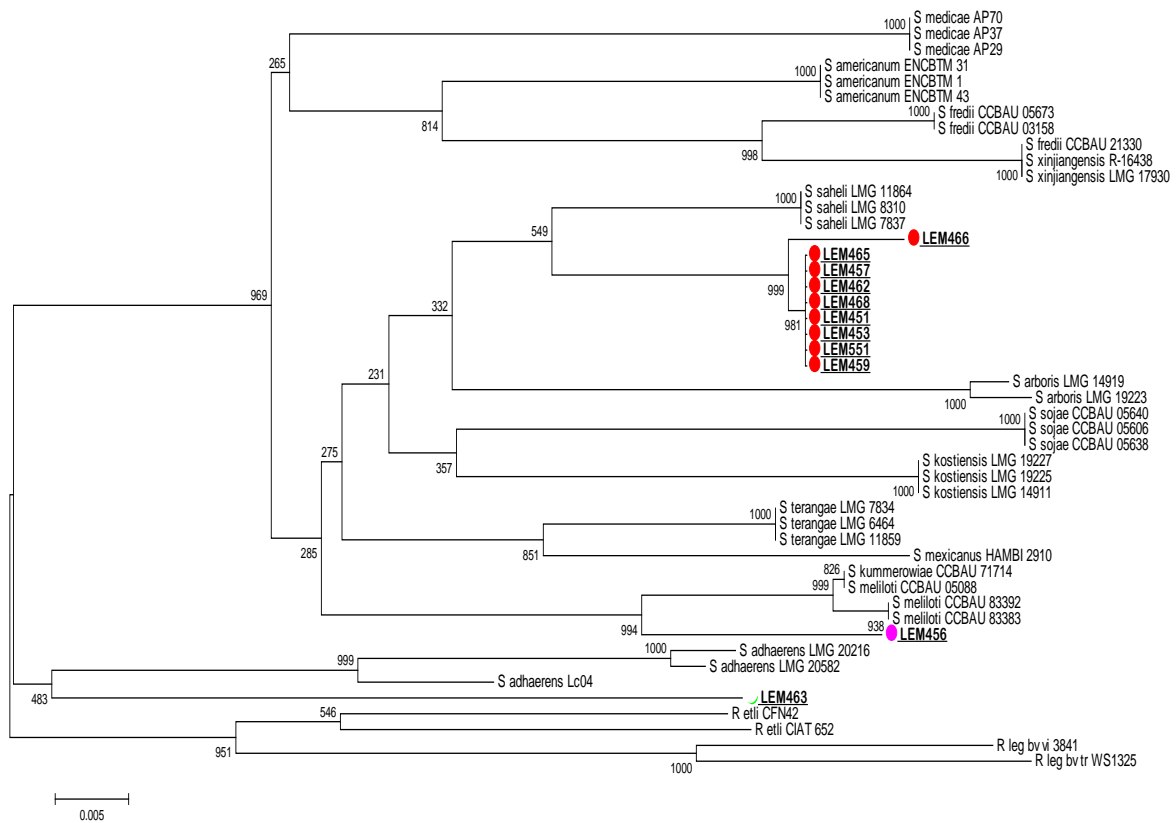


Fig. 38. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *atpD*.

Para el gen *atpD* (Fig. 38), se puede observar que la cepa LEM456 se agrupa dentro del clúster perteneciente a la especie *E. meliloti*, con un valor de bootstrap del 93.5%; mientras que las cepas LEM451, LEM453, LEM551, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466 y LEM468 forman un clúster individual relacionado estrechamente con la especie *E. saheli* pero sin pertenecer a este. El valor de bootstrap para este clúster es del 54.8%, recordando que el valor recomendado debe ser superior al 70%, de lo contrario nuestro resultado no será fiable, por lo que podría variar con otro análisis (Felsenstein *et al.*, 1985).

7.3.2.2 Gen *dnaK*

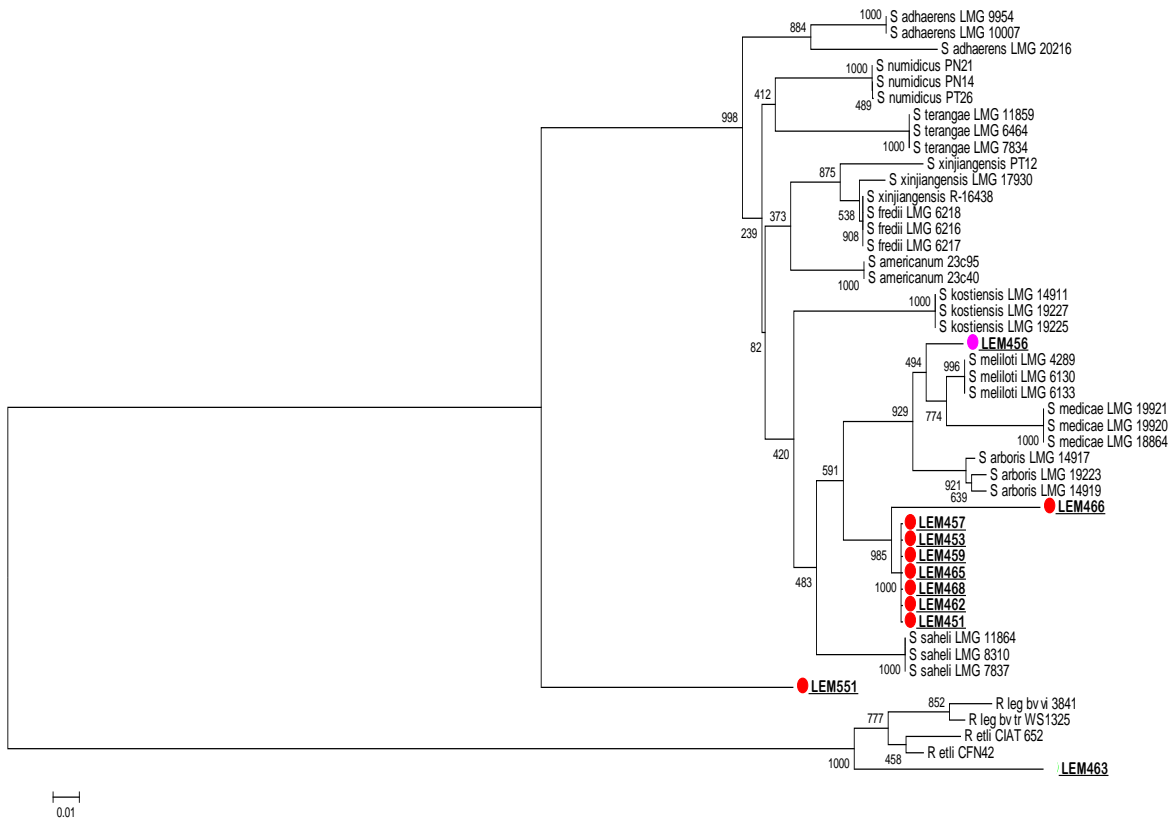


Fig. 39. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *dnaK*.

En el caso del gen *dnaK* (Fig. 39), se puede observar que la cepa LEM456 se agrupa igualmente en el clúster de la especie *E. meliloti* con un valor de bootstrap del 49.4%; en cuanto a las cepas LEM466, LEM457, LEM453, LEM459, LEM465, LEM468, LEM462 y LEM461, estas se agrupan nuevamente en un clúster individual relacionado nuevamente con la especie *E. saheli* (Bootstrap del 48.3%), caso especial es la cepa LEM551, la cual es separada del resto de cepas formando un clúster aparte. Esta cepa, probablemente no es de la misma especie que el grupo de bacterias provenientes de la misma región; ya que también hemos visto que presenta un comportamiento diferente en cuanto a su tolerancia a diferentes tipos de estrés. Estas diferencias puede deberse a, como se mencionaba anteriormente, transferencias horizontales de genes o, incluso a, recombinaciones genéticas (Eardly *et al.*, 1996, 2005; Sullivan *et al.*, 1996).

7.3.2.3 Gen *glnII*

Una de las dificultades que presentó la elaboración del árbol filogenético para el gen *glnII* es que no todas las especies descritas del género *Ensifer* tienen liberadas las secuencias de este gen de mantenimiento y para llevar a cabo su estudio, nos basamos en la búsqueda del gen en algunos genomas completos.

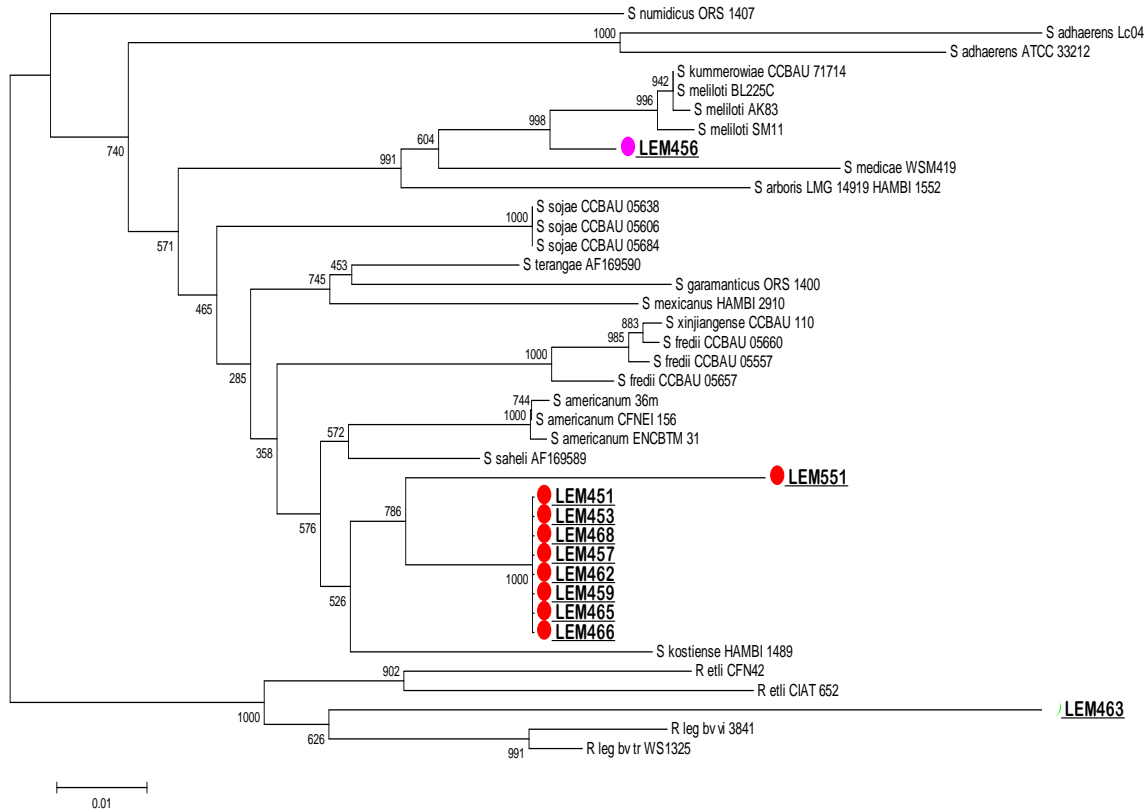


Fig. 40. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *glnII*.

El árbol filogenético observado en la figura 40 nos muestra nuevamente que la cepa LEM456 se agrupa dentro del clúster de la especie *E. meliloti* con un valor de bootstrap del 99.8% tal y como se ha observado en los genes anteriores. Por otro lado, las cepas LEM551, LEM451, LEM453, LEM468, LEM457, LEM462, LEM459, LEM465 y LEM466 forman un grupo individual, esta vez estrechamente relacionado con la especie *E. kostiensis* (Bootstrap del 52.6%) pero sin pertenecer a esta especie de manera específica.

7.3.2.4 Gen *gyrB*

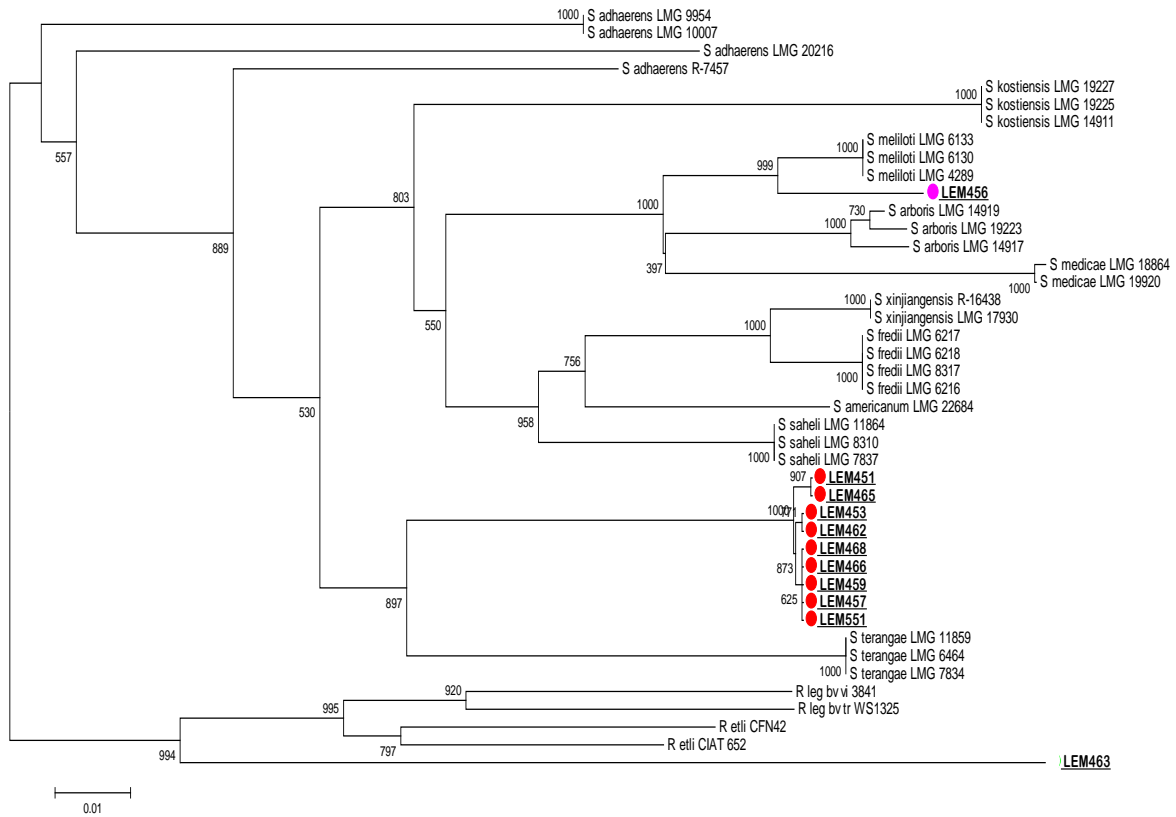


Fig. 41. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *gyrB*.

Para el caso de *gyrB* (Fig. 41), el resultado para la cepa LEM456 es el mismo que con los genes anteriores, agrupándose con la especie *E. melliloti* y con un valor de bootstrap del 99.9%. De igual manera, las cepas LEM451, LEM465, LEM453, LEM462, LEM468, LEM466, LEM459, LEM457 y LEM551 forman un clúster separado del resto de las especies pero ahora relacionado estrechamente con la especie *E. terangae* y con un valor de bootstrap del 89.7%.

7.3.2.5 Gen *recA*

El gen *recA* junto con el gen *atpD*, son unos de los genes más utilizados en este análisis para el género *Ensifer*, ya que presentan una alta concordancia entre ellos y con el gen *16S rDNA* (Martens, 2007; 2008; Gaunt *et al.*, 2001). La figura 42 nos muestra la relación filogenética obtenida con este gen.

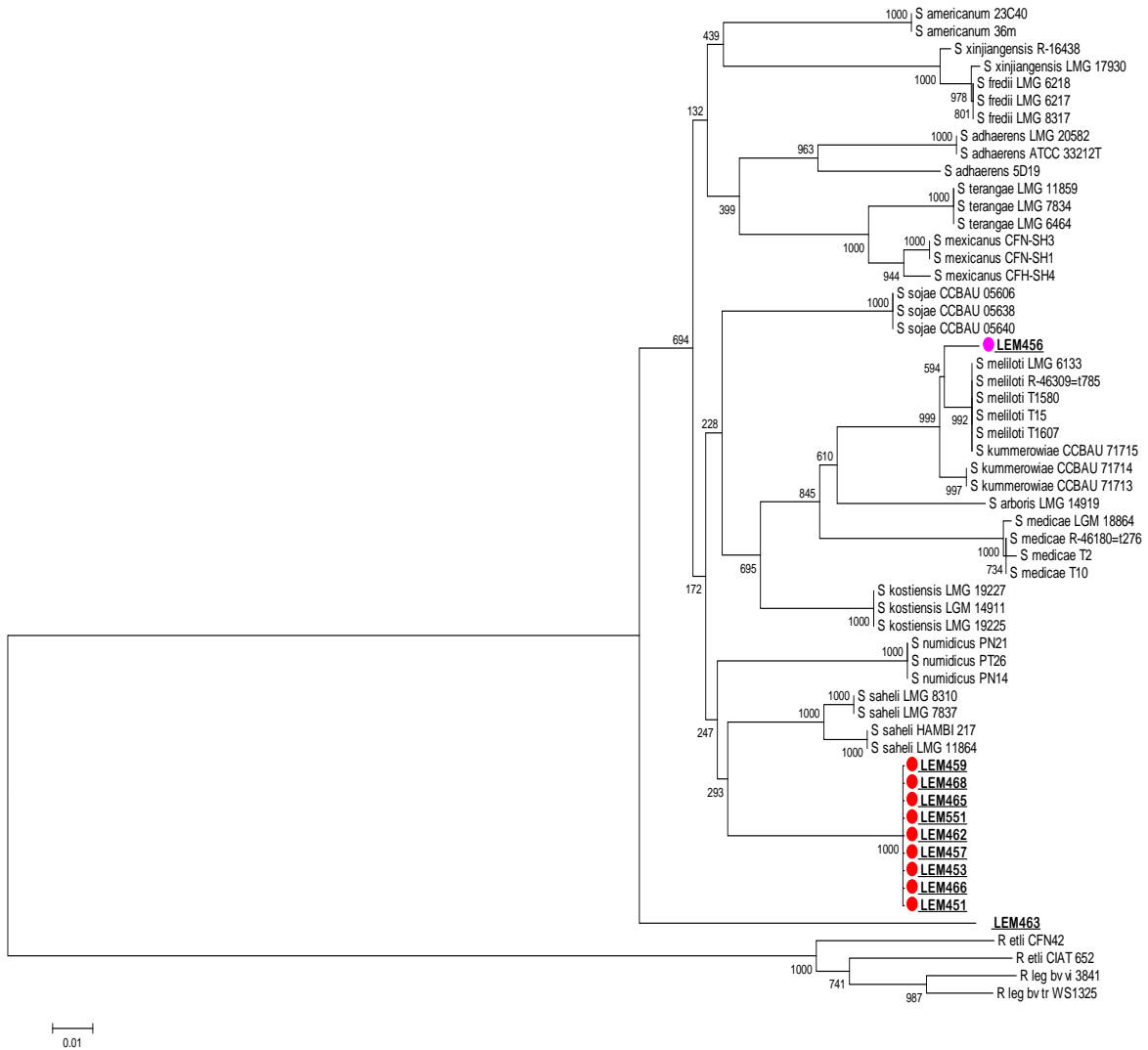


Fig. 42. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *recA*.

Como se puede observar, la cepa LEM456 se agrupa con las cepas de la especie *E. meliloti* con un valor de bootstrap del 59.4%, este resultado no ha variado en ningún análisis de los genes pasados; y, siguiendo el resultado del gen *atpD*, las cepas LEM459, LEM468, LEM465, LEM551, LEM462, LEM457, LEM453, LEM466 y LEM451 forman un clúster individual relacionado con la especie *E. saheli* pero con un valor de bootstrap del 29.3%. Comprobando, de esta manera, la concordancia entre los genes *atpD* y *recA* descrita previamente.

7.3.2.6 Gen *glnA*

Para este gen, se sabe que también es uno de los más usados en este análisis para el género *Ensifer*, por su grado de confiabilidad y similitud con genes rRNA (Martens *et al.*, 2007), sin embargo, no existen reportes que mencionen la concordancia de este gen con algún otro de mantenimiento.

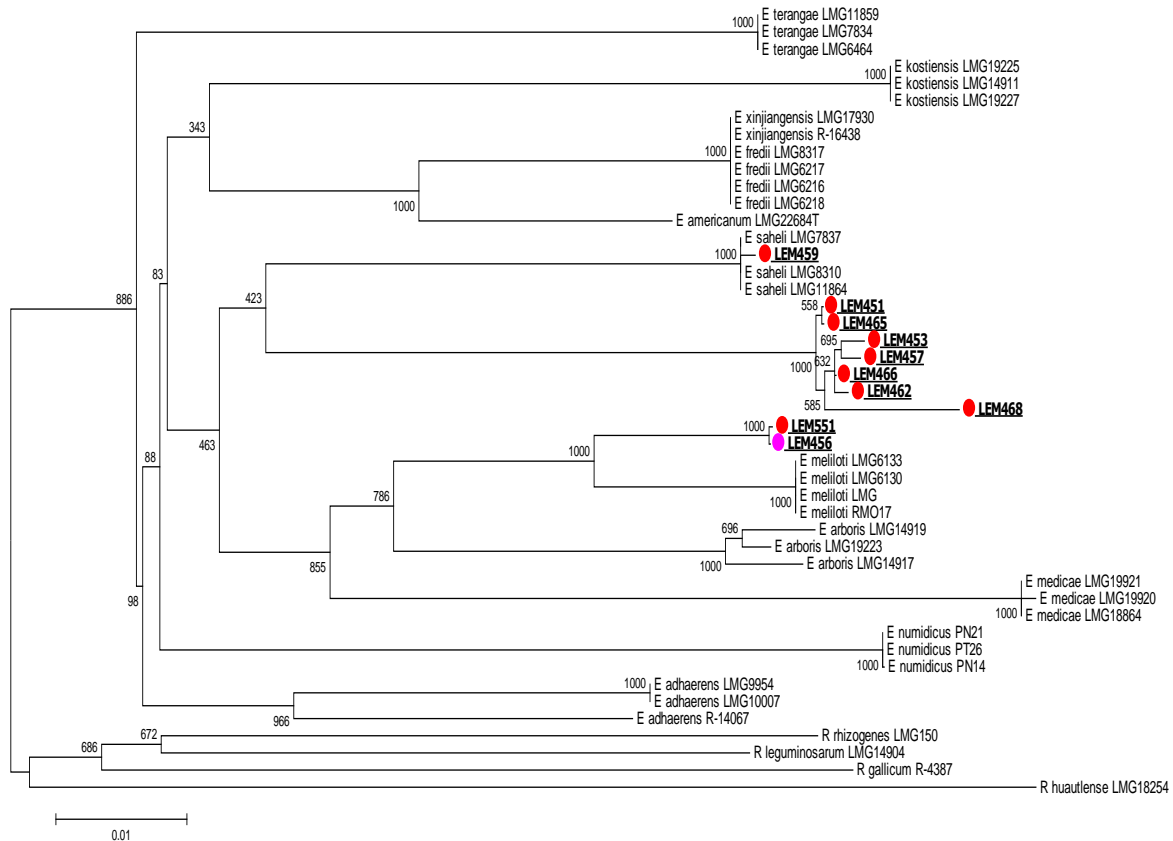


Fig. 43. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *glnA*.

En el árbol filogenético del gen *glnA* (Fig. 43) podemos observar que la cepa LEM456 se encuentra nuevamente dentro del clúster que forma la especie *E. meliloti*, con un valor de bootstrap del 100%. Por otro lado, con este gen, se pueden observar dos diferencias significativas en relación con los genes anteriores; la primera es que la cepa LEM551 la ubica junto con la cepa LEM456 (dentro de la especie *E. meliloti*) y con un valor de bootstrap del 100%. La segunda diferencia es que la cepa LEM459 la coloca dentro del clúster generado por la especie *E. saheli* también con un valor de bootstrap del 100%, dando a entender que probablemente pertenecen a esas especies. Por último, tenemos el grupo de cepas restantes, LEM451, LEM465, LEM453, LEM457, LEM466, LEM462 y LEM468 que, al igual que en los genes anteriores, forman un grupo separado y estrechamente ligado a *E. saheli* pero con un valor de bootstrap del 42.3%.

7.3.2.7 Gen *thrC*

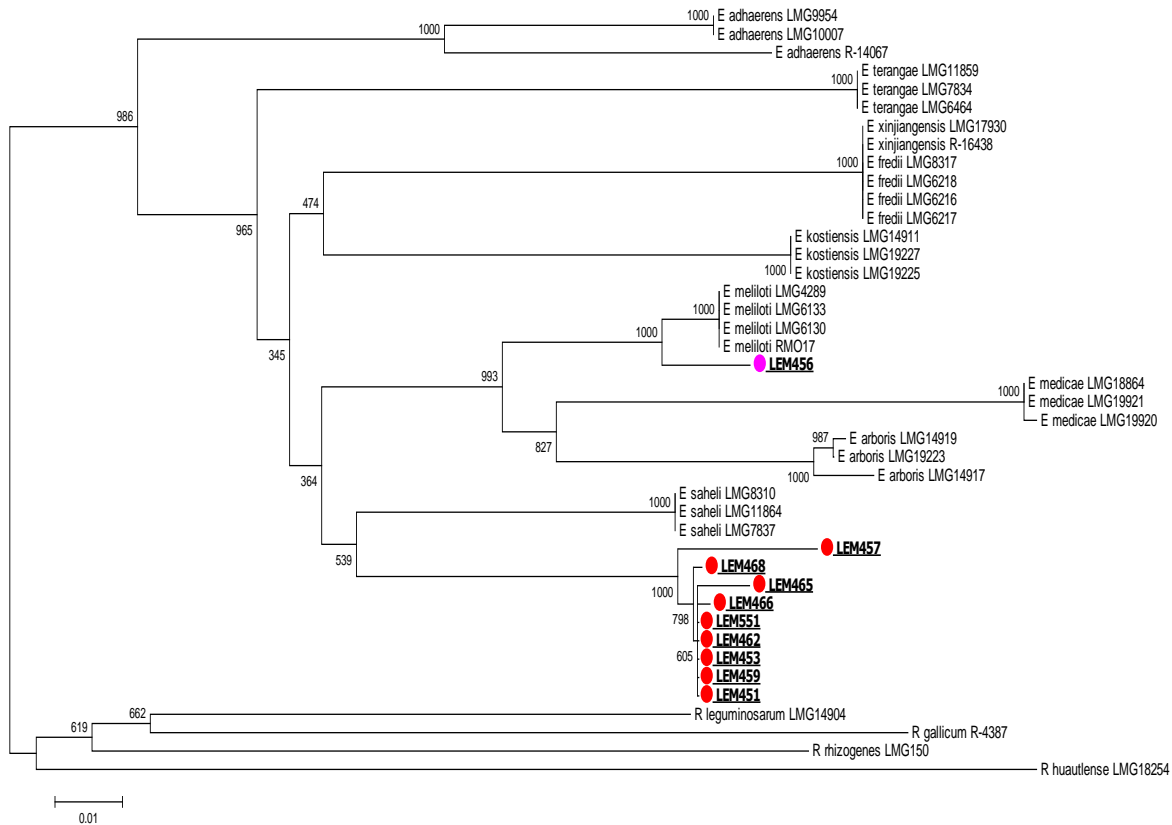


Fig. 44. Árbol filogenético generado por NJ para el gen *thrC*.

El resultado del análisis del gen *thrC* (Fig. 44), muestra un arreglo similar al obtenido por los genes anteriores; donde la cepa LEM456 se agrupa dentro del clúster de *E. meliloti* con un valor de bootstrap del 100% concluyendo que esta cepa pertenece a la especie antes mencionada. Igualmente, las cepas LEM457, LEM468, LEM465, LEM466, LEM551, LEM462, LEM453, LEM459 y LEM451 forman nuevamente un clúster individual, el cual está relacionado estrechamente con la especie *E. saheli* con un valor de bootstrap del 53.9%.

7.3.2.8 Gen 16S rDNA

El análisis filogenético de este gen (Fig. 45), se realizó con la finalidad de comparar los resultados obtenidos de los genes de mantenimiento con este gen que, como se había dicho anteriormente, no presenta un poder de resolución por debajo del nivel de especie (Olsen y Woese, 1993), generando un enfoque global en la relación filogenética de nuestras cepas de estudio con las especies descritas para el género *Ensifer*.

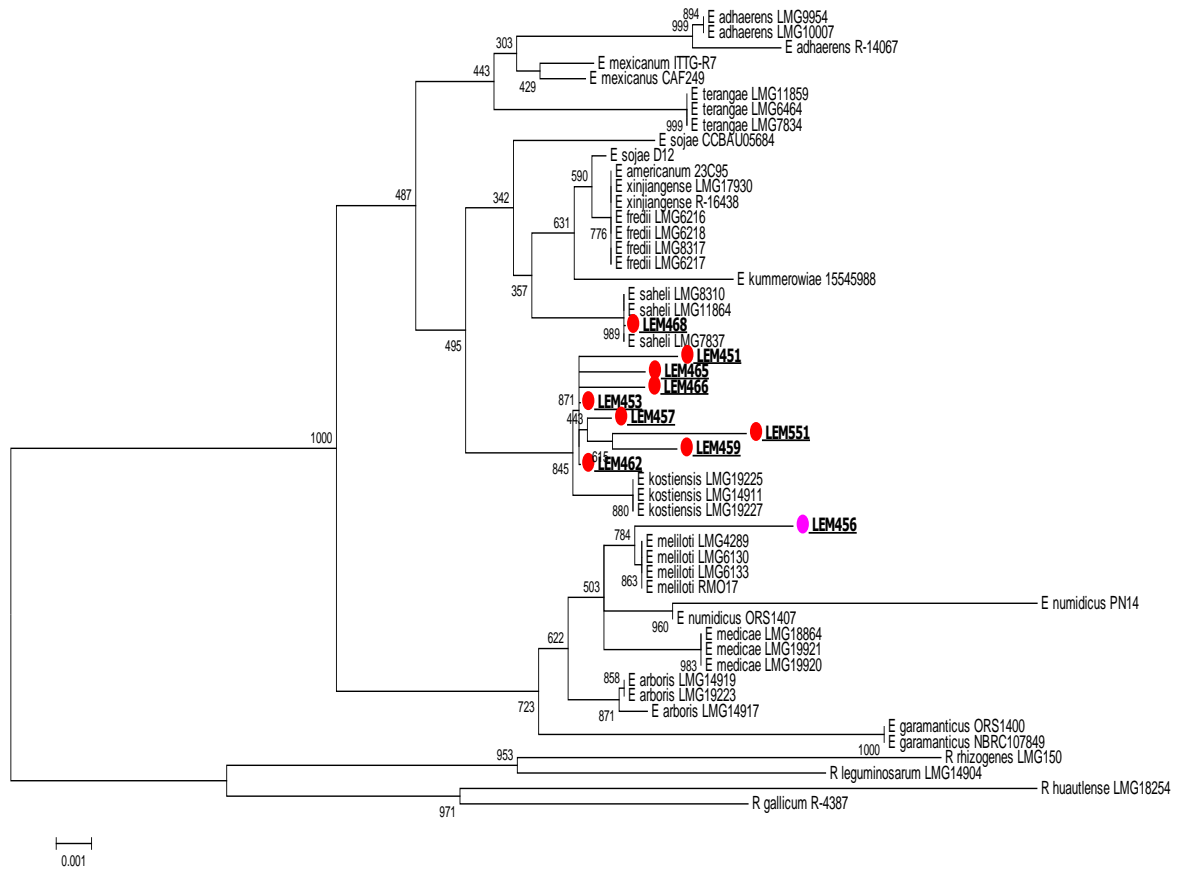


Fig. 45. Árbol filogenético generado por NJ para el gen 16S *rDNA*.

Con la figura 45, se comprobó lo visualizado en el análisis de los genes de mantenimiento respecto a la cepa LEM456, ya que, de igual forma, esta se agrupa en el clúster perteneciente a la especie *E. meliloti* con un valor de bootstrap del 78.4%, perteneciendo así a esta especie. Mientras que para la cepa LEM468 se presenta una diferencia con respecto a los genes de mantenimiento, pues la ubica dentro del clúster de *E. saheli* con un valor de bootstrap del 98%. El resto de las cepas LEM451, LEM465, LEM466, LEM453, LEM457, LEM551, LEM459 y LEM462 forman una agrupación no compacta, que no pertenece a ninguna especie descrita, pero que se relaciona estrechamente con la especie *E. kostiensis*, resultado similar a lo presentado con el gen *glnII* pero con un valor de bootstrap del 84.5%.

7.3.3 Árboles concatenados

El MLSA de genes de mantenimiento es superior al análisis de la secuencia del gen 16S rRNA para la discriminación de especies de *Ensifer* (Martens *et al.*, 2007). Este análisis de múltiples genes puede ser obtenido de dos maneras, mediante el análisis individual de cada gen con la generación de los árboles filogenéticos correspondientes y usar, de esta manera, un consenso de estas relaciones para representar el árbol genético global, o mediante el análisis de las secuencias concatenadas, donde se forma una súper matriz para generar el árbol de especies (Sanderson *et al.*, 2003). Para el árbol concatenado, se emplearon los

genes 16Sr DNA, *atpD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB*, *glnA* y *thrC* y dos métodos de análisis, el método Maximum Likelihood (ML) (Fig. 46), el cual trata de seleccionar modelos y parámetros que maximicen la función de optimización; y el método de Máximo Parsimony (MP) (Fig. 47), cuya función es representar la hipótesis evolutiva consistente con el camino evolutivo más corto que explique o conduzca a los caracteres observados (Vinuesa, 2008). En estos análisis, los árboles fueron enraizados con la cepa *Mesorhizobium loti* LMG6125.

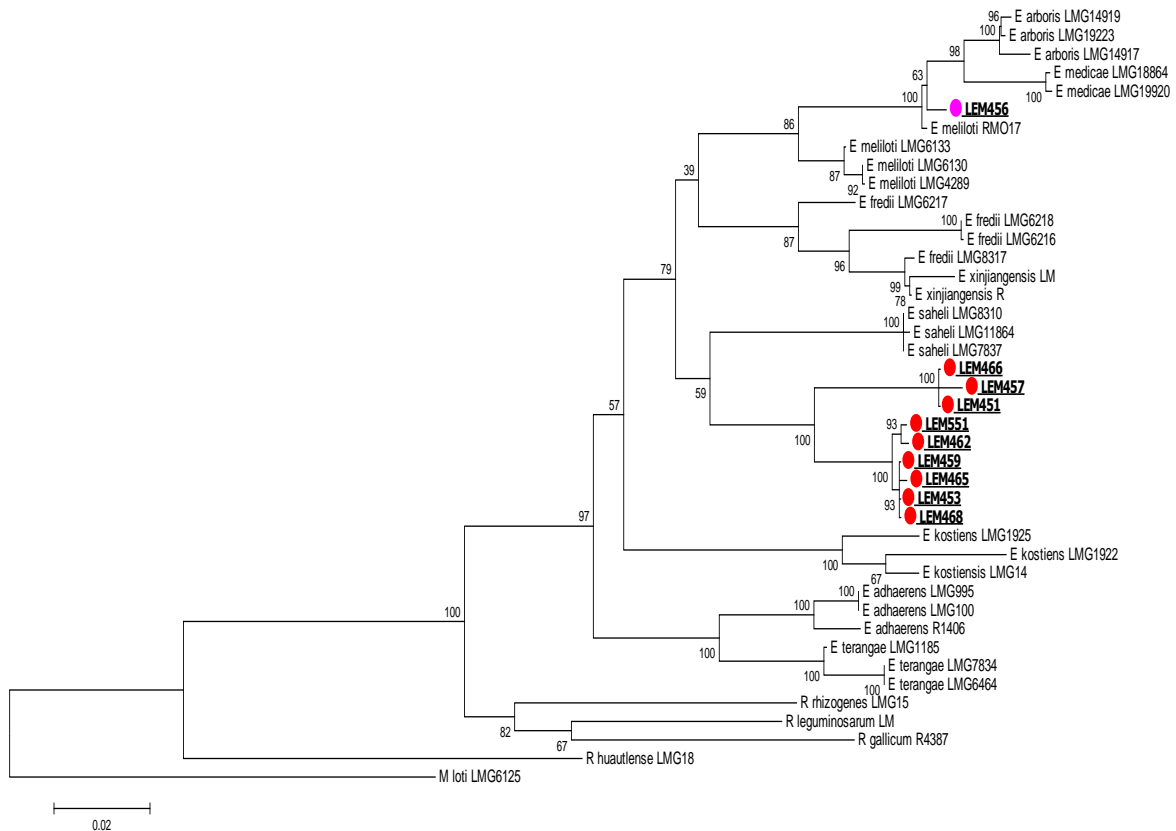


Fig. 46. Árbol concatenado (16SrDNA*atpDglnAthrCrecArpoBgyrB*) generados por ML.

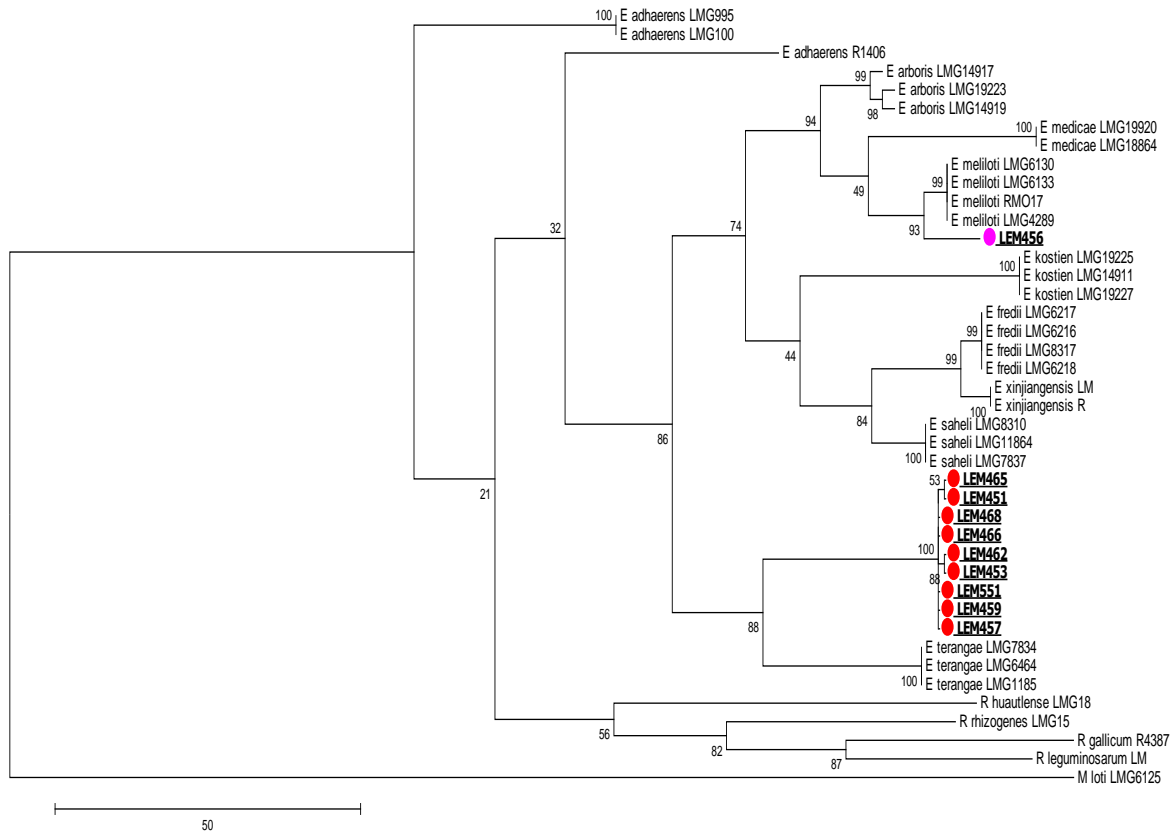


Fig. 47. Árbol concatenado (16SrDNAatpDglnAthrCrecArpoBgyrB) generados por MP.

La distribución de la cepa LEM456 para el árbol concatenado generado por ML (Fig.46) así como el árbol generado por MP (Fig. 47) fue la misma, la cepa se agrupó en el clúster perteneciente a la especie *E. meliloti* con valores de bootstrap del 59% y 88%, respectivamente. La ubicación de esta cepa es igual a la obtenida por el análisis de los genes de mantenimiento y del gen 16S rDNA. Comprobando una vez más, que la cepa LEM456 pertenece a la especie *E. meliloti*.

Por otro lado, en el caso de la figura 46, las cepas LEM466, LEM457, LEM451, LEM551, LEM462, LEM459, LEM465, LEM453 y LEM468, se agrupan en un clúster independiente, mismo que se relaciona con la especie *E. saheli*, pero sin pertenecer precisamente a esta, con un valor de bootstrap del 59%; este resultado concuerda con el análisis obtenido de los genes *atpD*, *dnaK*, *recA*, *glnA* y *thrC* de manera individual. Para el caso de la figura 47 estas mismas cepas forman, como en el resultado anterior, un grupo aislado, pero ahora relacionado estrechamente con la especie *E. terangae* con un valor de bootstrap del 88%, dicho resultado es similar al reportado por el gen de mantenimiento *gyrB*, de manera individual, en este mismo análisis.

Con base en todos nuestros resultados, podemos concluir que las cepas LEM466, LEM457, LEM451, LEM551, LEM462, LEM459, LEM465, LEM453 y LEM468, aisladas de *P. filiformis* en el norte de México, no pertenecen a ninguna especie descrita para el género *Ensifer*, pero se relacionan de manera estrecha con la especie *E. saheli*. Esta conclusión concuerda con lo reportado por Rocha *et al.*, 2015 (Fig. 48).

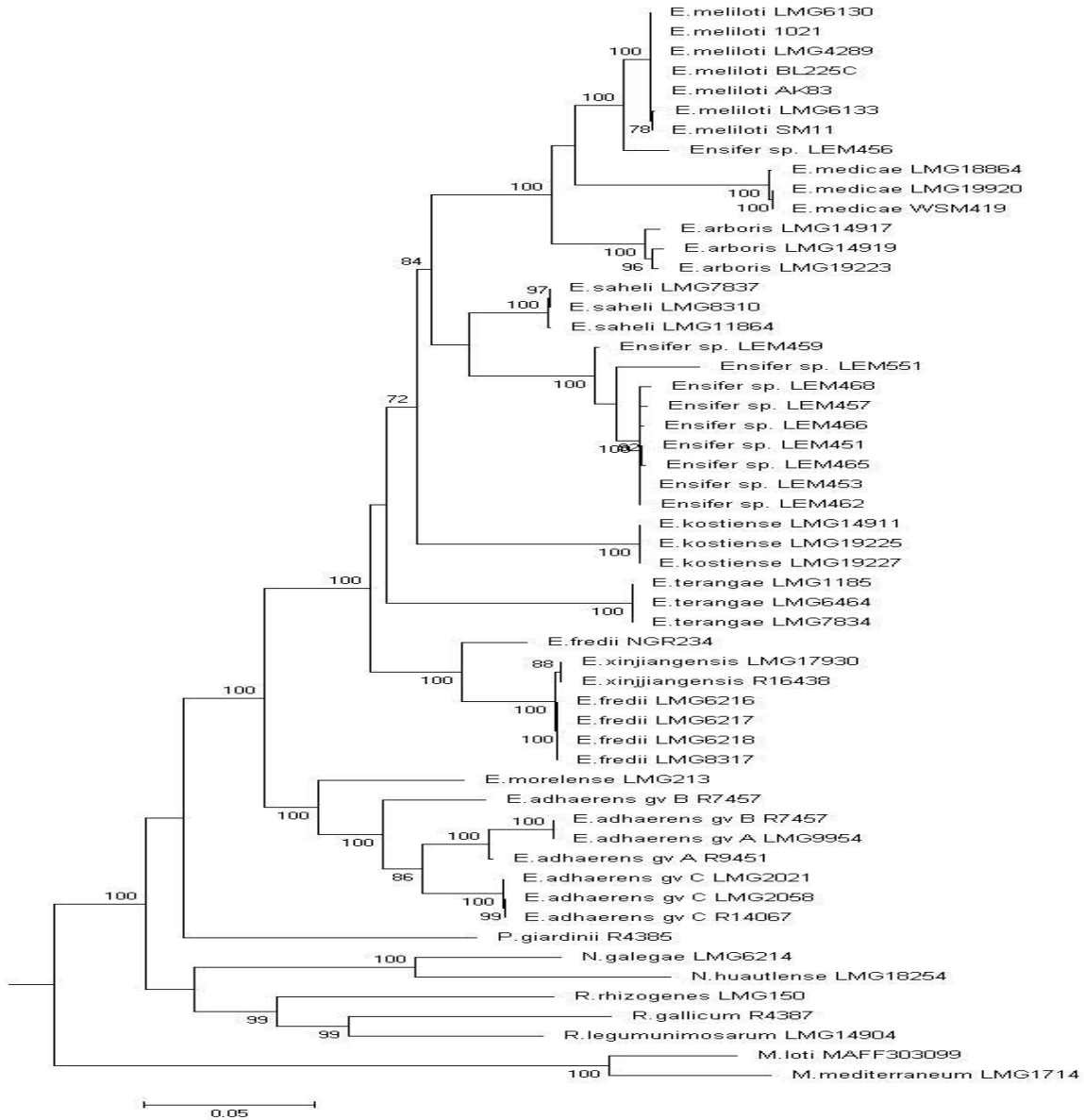


Fig. 48. Árbol concatenado adaptado de Rocha *et al.*, 2015.

Se sabe que, para llevar a cabo un enfoque prometedor hacia una clasificación bacteriana, se necesita de un mínimo de cinco genes de mantenimiento (Stackebrandt *et al.*, 2002). No obstante, Zeigler en el 2003, sugirió que este análisis, incluso, puede ser llevado con menos de cinco genes de mantenimiento, elegidos adecuadamente, para una clasificación segura. Por lo que, en nuestro estudio, utilizamos seis genes de mantenimiento y el gen *16S rDNA* para la clasificación de nuestras bacterias y así obtener resultados más confiables.

VIII. CONCLUSIONES

En este estudio, mediante un MLSA utilizando siete genes de mantenimiento, se determinó que las cepas *Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM551, LEM457, LEM459, LEM462, LEM465, LEM466 y LEM468, aisladas de *P. filiformis* y provenientes del norte de México, no pertenecen a ninguna especie descrita para el género *Ensifer*, tratándose, así, de una nueva especie, la cual está relacionada estrechamente a *E. saheli*. Con el mismo análisis, se concluyó que la cepa LEM456 pertenece a la especie de *E. meliloti*, nombrándose ahora *Ensifer meliloti* LEM456.

Las características que poseen este grupo de cepas es que son tolerantes a la salinidad, con un valor de hasta 0.2 M de NaCl, mismo que induce la disminución de exopolisacárido. Este mismo efecto lo presentan las cepas *Ensifer* sp. LEM451, LEM453, LEM551, LEM462, LEM468 y *E. meliloti* LEM456 al ser crecidas en pH ácidos, tolerando valores de hasta 5.3. Otra característica es que nuestro grupo de cepas presenta tolerancia a medios básicos, creciendo a valores de pH de hasta 9.5, induciéndoles un aumento en la producción de exopolisacárido. De igual manera, presentan tolerancia a elevadas temperaturas, creciendo exitosamente a valores de 40°C.

Finalmente, en un ensayo de invernadero, las plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Jamapa, inoculadas con cada una de las cepas de interés, lograron sobrevivir por un lapso de 35 días, creciendo en condiciones salinas de hasta 0.05 M de NaCl. La visualización de nódulos en la raíz de la leguminosa, pudo observarse sólo a una concentración <0.01 M de NaCl. Desconociéndose aún el mecanismo de resistencia al estrés salino.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Adékambi, T., Drancourt, M. 2004. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 2095–2105.
2. Amézketa, E. 1999. Soil aggregate stability: a review. *J Sustain Agric* **14**:83–151.
3. Aparecida, L., Martins, P., Savana, J., Barroso, K. & de Souza, M. 2010. Diversity and efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. *R. Bras. Ci. Solo.* **34**:1113-1123.
4. Aranjuelo, I., Pérez, P., Hernández, L., Irigoyen, J., Zita, G., Martínez-Carrasco, R., Sánchez-Díaz, M. 2005. The response of nodulate alfalfa to wáter suply, temperature and elevated CO₂: photosynthesis downregulation. *Physiol. Plant.* **123**: 348-358.
5. Arutyunova, N., Shevyakova, N. 1984. Role of nitrogen source in improving the salt resistance of the peanut. *Arachis hypogaea* L. *Biol. Bull. Acad. Sci. USSR* **10**: 495-501.
6. Ashraf, M. 1989. The effect of NaCl on water relations, chlorophyll, and protein and proline contents of two cultivars of blackgram (*Vigna mungo* L.). *Plant and Soil* **119**: 205-210.
7. Ashraf, M. 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 17-42.
8. Ashraf, M., Bashir, A. 2003. Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relations in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance. *Flora* **198(6)**: 486–498.
9. Augé, R. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42.
10. Aydi, S., Sassi, S., Abdelley, C. 2008. Growth, nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant Soil* **312**: 59–67.
11. Baca, E., Soto, L., Pardo, M. 2000. Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos.* **38**:43-49.
12. Baker, A., Sprent, J., Wilson, J. 1995. Effects of sodium chloride and mycorrhizal infection on the growth and nitrogen fixation of *Prosopis juliflora*. *Symbiosis* **19**: 39–51.
13. Balibrea, M., Cuartero, J., Bolarin, M., Perez-Alfocea, F. 2003. Sucrolytic activities during fruit development of *Lycopersicon* genotypes differing in tolerance to salinity. *Physiol Plant* **118(1)**: 38–46.
14. Balkwill, D. L. 2005. Genus VI. Ensifer Cassida 1982, 343VP. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Vol. 2, part C. Ed. G M Garrity. pp. 354–358. Springer, New York.
15. Ballesteros, P.G.A. 1999. Contribuciones al conocimiento del frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) en América tropical. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Montecillo.
16. Barbour, W., Dennis, R., Hattermann, T. & Stacey, G. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. and Environ. Microbiol.* **57**:2635-2639.
17. Bergersen F.J. 1961. The growth of rhizobium in synthetic media. *Aust. J. Biol. Sci.* **14**, 349-360.
18. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2005. Vol I Capítulo IV.

19. Boivin, C., Ndoye, I., Molouba, F., De Lajudie, P., Dupuy, N. & Dreyfus, B. 1997. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms and unusual characteristics. *Crit. Rev. Plant Sci* **16**:1-30.
20. Bordeleau, L., Prevost, D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*. **161**: 115–124.
21. Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F., Aurag, J. 2005. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J Plant Physiol* **162**: 1103–1113.
22. Brady, C., Gibson, T., Barlow, E., Speirs, J., Wyn, R. 1984. Salt tolerance in plants: I. Ions, compatible organic solutes and the stability of plant ribosomes. *Plant Cell Environ* **7**: 571-578.
23. Bréda, N., Huc, R., Granier, A., Dreyer, E. 2006. Temperate forest trees and stands under severe drought: a review of ecophysiological responses, adaptation processes and long-term consequences. *Ann. For. Sci.* **63**: 625-644.
24. Brewin N., Downie, J., Young, J. 1992. Nodule formation in legumes. In: *Encyclopedia of Microbiology*. Academic. Press. Inc. pp. 239-248.
25. Brewin, N. J. 1998. Tissue y cell invasion by *Rhizobium*: the structure y development of infection threads y symbiosomes. Pp. 417-429 in: *The Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
26. Brockwell, J., Pilka, A., Holliday, R. 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust J Exp Agric*. **31**: 211–219.
27. Broughton, W. J., Jabbouri, S., Perret, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriology*. **182**(20): 5641-5652.
28. Caetano-Anollés, G., Wall, L. G., de Micheli, A. T., Macchi, E. M. Bauer, W. D., Favelukes, G. 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol*. **86**: 1228-1235.
29. Cassman, K. G., Rains, D. W. 1986 A cropping systems approach to salinity management in California. *Am. J. Altern. Agric.* **1**:115-121.
30. Chen, W. X., Yan, G. H. y Li, J. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**: 392–397.
31. Chen, W. M., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., y Boivin-Masson, C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* **185**:7266-7272.
32. Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J., Bisgaard, M. 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1601–1609.
33. Clarke, L., Dilworth, M., Glenn, A. 1993. Survival of *Rhizobium meliloti* WSM419 in laboratory culture: effect of combined pH shock and carbon. *Soil Biol Biochem.* **25**: 1289–1291.
34. Cordovilla, M., Ligeró, F., Lluch, C. 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J Exp Bot* **45**(10): 1483–1488.

35. Cordovilla, M. P., Ligeró, F., Lluch, C. 1995a. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil* **172**(2):289–297.
36. Corral-Lugo, A., Morales-García, Y., Pazos-Rojas, L., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R., Muñoz-Rojas, J. 2012. Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo”. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **14**(2): 147-156.
37. Correa, O., Barneix, A. 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J Microbiol Biotechnol.* **13**: 153–157.
38. Cuéllar-Sánchez, A. 2011. Estudio poblacional de rhizobia simbiotes de frijol silvestre *Phaseolus* spp. Tesis de maestría. ICUAP-CICM.
39. Dazzo, F. B., Truchet, G. 1987. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membrane Biol.* **73**: 1-16.
40. Debouck D., Hidalgo R. 1985. Morfología de la planta de frijol común. *In* Frijol: Investigación y producción. Ed. Schoonhoven. Cali, Colombia, CIAT - PNUD. 7-42.
41. Delgado, M., Garrido, J., Ligeró, F. & Lluch, C. 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress. *Physiol. Plantarum.* **89**:824-829.
42. Delgado, M., Ligeró, F., Lluch, C. 1994. Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol Biochem* **26**: 371–376.
43. Delgado-Salinas, A., Turley, T., Richman, A., Lavin, M. 1999. Phylogenetic analysis of the cultivated and wild species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany* **23**: 438-460.
44. Denarié, J., Debelle, F., Promé, J.C. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.
45. Díaz, C. L., Logman, T. J. J., Stam, H. C., Kijne, J. W. 1996. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in White clover hairy roots. *Plant. Physiol.* **109**: 1167-1177.
46. Dobert, R. C., Rood, K., Zanewich, D. G. 1992. Gibberellins and the legume-*Rhizobium* symbiosis. III. Quantification of gibberellins from stems and nodules of lima bean and cowpea. *Plant Physiol.* **100**: 1994-2001.
47. Dowling, D. N., Broughton, W. J. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**: 131-157.
48. Eardly, B., Wang, F., van Berkum, P. 1996. Corresponding 16S rRNA segments in Rhizobiaceae and *Aeromonas* yield discordant phylogenies. *Plant Soil* **186**: 69–74.
49. Eardly, B., Nour, S., van Berkum, P., Selander, R. 2005. Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1328–1335.
- 50.
51. Elboutahiri, N., Thami-Alami, I., Udapa, S. M. 2010. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. *BMC Microbiology* **10**:15.
52. Fageria, N. K. 1983. Ionic interactions in rice plants from dilute solutions. *Plant Soil* **70**: 309.

53. Faghire, M., Bargaz, A., Farissi, M., Palma, F., Mandri, B., Lluch, C., Tejera-García, N. A., Herrera-Cervera, J. A., Oufdou, K., Ghoulam, C. 2011. Effect of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of common vean (*Phaseolus vulgaris*) inoculated with rhizobial strains isolated from the Haouz region of Morocco. *Symbiosis* **55**: 69-75.
54. Fassbender, H., Bornemisza, E. 1994. Química de suelos con énfasis en suelos de América latina. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. 2ª edición. San José, Costa Rica.
55. Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791.
56. Freiberg, C., Perret, X., Broughton, W. J., y Rosenthal, A. 1996. Sequencing the 500-kb GC-rich symbiotic replicon of *Rhizobium* sp. NGR234 using dye terminators y a thermostable "sequenase": a beginning. *Genome. Res.* **6**:590-600.
57. Freytag, G.F., Debouck, D. 2002. Taxonomy, distribution and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae: Papilionoideae) en North America, Mexico and Central America. *SIDA Botanical Miscellany* **23**.
58. Friedman, R., Altman, A., Levin, N. 1989. The effect of salt stress on polyamine biosynthesis and content in mung bean plants and in halophytes. *Physiol Plant* **76**: 295-302.
59. Galibert, F., Finan, M. T., Long, S. R., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F. 2001. The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668 DOI: 10.1126/science.1060966.
60. Gaunt, M., Turner, S., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S., Young, J. 2001. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 2037–2048.
61. Gaworzewska, E. T., Carlile, M. J. 1982. Positive chemotaxis of *R. leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1179-1188.
62. Georgiev, G., Atkins, C. 1993. Effects of salinity on N₂ fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules. *Symbiosis* **15(3)**: 239–255.
63. Gepts, P., Debouck, D. 1991. Origin, domestication and evolution of the common vean (*Phaseolus vulgaris* L.), en A. van Schoonhoven y O. Voysest (eds.), *Common beans: Research for crop improvement*. CAB International, Wallingford, pp. 7-53.
64. Gepts, P. 1999. What can molecular markers tell us about the process of domestication in common bean?. *The origins of Agriculture and Domestication of Crop Plants*. A. Dimania, J. Valkoun, G. Willcox, C.O. Qualset (eds). International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA). Aleppo, Syria, pp. 198-209.
65. Gevers, D., Cohan, F., Lawrence, J., Spratt, B., Coenye, T., Feil, E., Stackebrandt, E., van de Peer, Y., Vandamme, P. 2005. Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Rev Microbiol* **3**: 733–739.
66. Glaeser, S., Kämpfer, P. 2015. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 237-245.
67. Gonzalez, V., Bustos, P., Ramirez-Romero, M. A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernandez-Gonzales, I., Hernandez-Celis, J. C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodriguez, O., Flores, M., Cevallos, M. A., Collado-Vides, J., Romero, D., y Davila, G. 2003. The mosaic structure

of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 y its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome. Biol.* **4**:36

68. Goris, J., Konstantinidis, K., Klappenbach, J., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 81-91.
69. Graham, P., Viteri, S., Mackie, F., Vargas, A., Palacios, A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* **5**: 121–128.
70. Graham, P. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can J Microbiol.* **38**: 475–484.
71. Graham, P., Vance, C. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology.* **131**: 872-877.
72. Grattan, S. R., Grieve, C. M. 1999. Salinity mineral nutrient relations in horticultural crops. *Sci Hortic.* **78**(1–4):127–157.
73. Hartwig, U. A., Phillips, D. A. 1991. Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiol.* **95**: 804-807.
74. Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaik, H. P., van Kammen, A., Bisseling, T. 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
75. Hernández-Lucas, I., Rogel-Hernández, M., Segovia, L., Rojas-Jiménez, K., Martínez-Romero, E. 2004. Phylogenetic relationships of rhizobia based on citrate synthase gene sequences. *Syst Appl Microbiol* **27**: 703–706.
76. Hernández-López, V., Vargas-Vázquez, M., Muruaga-Martínez, J., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N. 2013. Origin, domestication and diversification of common beans. *Advances and perspectives. Revista Fitotécnica Mexicana.* **36 (2)**: 95-104.
77. 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**:87-97.
78. Hirsch, A. M. 1992. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. *New Phytol.* **133**: 159-171.
79. Hirsch, A. M. 1992. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* **40**: 211-237.
80. Hirsch, A., Bauer, W., Bird, D., Cullimore, J., Tyler, B., Yoder, J. 2003. Molecular signals and receptors controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology*, **84**: 858-868.
81. Holmes, D., Nevin, K., Lovley, D. 2004. Comparison of 16S rRNA, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1591–1599.
82. Howieson, J., Ewing, M. 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*-*Medicago* symbiosis. *Aust J Agric Res.* **37**: 55–64.
83. Howieson, J., Ewing, M., d'Antuono, M. 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil.* **105**: 179-188.

85. Ibekwe, A., Angle, J., Chaney, R., Vonberkum, P. 1997. Enumeration and nitrogen fixation potential of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* grown in soil with varying pH values and heavy metal concentrations. *Agric Ecosyst Environ.* **61**: 103–111.
86. ICSP Subcommittee on the taxonomy of Rhizobium and Agrobacterium diversity, phylogeny and sistematics, 2012
87. Jarvis, B., Tighe, S. 1994. Rapid identification of *Rhizobium* species based on cellular fatty acid analysis. *Plant soil*, **161**: 31-41.
88. Jensen, J., Peters, N., Bhuvanewari, T. 2002. Redundancy in periplasmic binding protein-dependent transport systems for trehalose, sucrose, and maltose in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **184**: 2978-2986.
89. Jepson Herbarium. 2013. *Fabaceae* (Leguminosae) Legume Family. University of California.
90. Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., Walker, G. C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol.* **5**(8): 619-633.
91. Jones, R. G. W. y Lunt, O. R. 1967. The function of calcium in plants. *Bot. Rev.* **33**: 407.
92. Joshi, S. 1984. Effect of salinity stress on organic and mineral constituents in the leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. var. C-11). *Plant and Soil* **82**: 69-76.
93. Kaiser, B. N., Finnegan, P. M., Tyerman, S. D., Whitehead, L. F., Bergersen, F. J., Day, D. A., Udvardi, M. K. 1998. Characterization of an ammonium transport protein from the peribacteroid membrane of soybean nodules. *Science.* **281**:1202-1206.
94. Kijne, J. W., Bauchrowitz, M. A. Díaz, C. L. 1997. Root lectins in rhizobia. *Plant Physiol.* **115**: 869-873.
95. Kuiper, P. J. 1984. Functioning of plant cell membranes under saline conditions: membrane lipid composition and ATPases. pp. 77-91. *In*: Staples, R.C. y G.H. Toenniessen (eds.). *Salinity tolerance in plants: strategies for crop improvement*. John Wiley. New York.
96. Kuykendall, D., Young, J., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2005. **1**(4):325-340.
97. Kwak, M., Kami, J., Gepts, P. 2009. The putative Mesoamerican domestication center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago Basin of Mexico. *Crop. Sci.* **49**: 554-563.
98. Kwak, M., Gepts, P. 2009. Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Theor. Appl. Genet.* **118**: 979-992.
99. Laguerre, G., Allard, M., Revoy, F., Amarger, N. 1994. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 56-63.
100. Läuchli, A. 1984. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. *In*: Staples RC (ed) *Salinity tolerance in plants: Strategies for crop improvement*. John Wiley, New York, pp 171-187.
101. Lavin, M., Doyle, J. Palmer, J. 1990. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the *Leguminosae* subfamily *Papilionoideae*. *Evolution.* **44**: 390-402.

102. Leibovitch, S., Migner, P., Zhang, F., Smith, D. 2001. Evaluation of the effect of Soyasignal technology on soybean yield (*Glycine max* (L.) Merr.) under field conditions over 6 years in Eastern Canada and the Northern United States. *J. Agron. Crop Sci.* **187**: 281-292.
103. Leigh, J. A., Walker, G. C. 1994. Exopolysaccharide of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* **10**: 63-67.
104. Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillat, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784.
105. Levitt, J. D. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press. New York.
106. Lewis, G., Schrire, B., MacKinder, B., Lock, M. (ed.). 2005. Legumes of the world. Royal Botanical Gardens. Kew, UK.
107. Lindström, K., Aserse, A., Mousavi, S. 2015. Taxonomy and evolution of nitrogen fixing organisms. In: de Bruijn, F.J. (Ed.). Biological Nitrogen Fixation, John Wiley & Sons, Inc (in press), ISBN: 978-1-118-63704-3. <http://eu.wiley.com/WileyTitle/productCd-1118637046.html>
108. Liu, C. Lee, K. Wang, Y. Peng, M. & Lee, K. 2011. Involvement of the azorhizobial chromosome partition gene (*parA*) in the onset of bacteroid differentiation during *Sesbania rostrata* stem nodule development. *Appl. and Environ. Microbiol.* **77**:4371-4382.
109. Lloret, J., Brande, L., Wulff, B., Rubio, L., Allan, L., Downie, L., Bonilla, I. & Rivilla, R. 1998. Exopolysaccharide II Production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. and Environ. Microbiol.* **64**:1024-1028.
110. Lloret, L., Martínez-Romero, E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Lat. De Microbiol.* **47**:43-60.
111. Long, S. R. 1989. *Rhizobium*-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**:203-214.
112. Ludwig, W., Amann, R., Martinez-Romero, E., Schonhuber, W., Bauer, S., Neef, A., Schliefer, K. 1998. rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. *Plant soil*, **204**: 1-19.
113. MacRae, R. J., Mehuys, G. R. 1985. The effect of green manuring on the physical properties of temperate area soils. *Adv. Soil Sci.* **3**:71-94.
114. Madueño-Molina, A., García-Paredes, D., Martínez-Hernández, J., Rubio-Torres, C. 2006. Germination and development of Frijolillo *Rhynchosia minima* (L) DC in conditions of salinity. *TERRA latinoamer.* Vol. **24**(1): 47-54.
115. Mansour, M. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol Plant* **43**(4): 491-500.
116. Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Inter. Jour. of Syst. and Evol. Microbio.* **57**:489-503.
117. Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P. & Willems, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *Inter. Jour. of Syst. and Evol. Microbio.* **58**:200-214.

118. Martínez-Romero, E., Pardo, M. A., Palacios, R., Cevallos, M. 1985. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. J. Gen. Microbiol. **131**: 1779-1786.
119. Martínez-Romero, E. 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview y perspectives. *Plant Soil* **252**:11-23.
120. Martínez-Salazar, J., Sandoval-Calderón, M., Guo, X., Castillo-Ramírez, S., Reyes, A., Loza, M., Rivera, J., Alvarado-Affantranger, X., Sánchez, F., González, V., Dávila, G. & Ramírez-Romero, M. 2009. The *Rhizobium etli* RpoH1 and RpoH2 sigma factors are involved in different stress responses. *Microbiology*. **155**:386-397.
121. Marulanda, A., Barea, J., Azcón, R. 2006. An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbiol. Ecol.* **52**: 670-678.
122. Mayaka, S., Tirosch, T., Glick, B. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* **166**: 1365-1377.
123. McLay, C., Barton, L., Tang, C. 1997. Acidification potential of ten grain legume species grown in nutrient solution. *Aust J Agric Res.* **48**: 1025–1032.
124. Mengel, K., Kirkby, E. A. 2001. Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London.
125. Miché, L., Moulin, L., Chantreuil, C., Contreras-Jiménez, J., Munive-Hernández, J., Villegas-Hernández, M., Crozier, F. & Bená, G. 2010. Diversity analyses of *Aescheynomene* symbionts in tropical Africa and Central America reveal that nod-independent stem nodulation is not restricted to photosynthetic bradyrhizobia. *Env. Microbiol.* **12**:152-2164.
126. Mitchell, J. P., Shennan, C., Singer, M. J., Peters, D. W., Miller, R. O., Prichard, T., Grattan, S. R., Rhoades, J. D., May, D. M., Munk, D. S. 2000. Impacts of gypsum and winter cover crops on soil physical properties and crop productivity when irrigated with saline water. *Agric. Water. Manag.* **45**:55-71.
127. Mohammad, M., Campbell, W., Rumbaugh, M. 1989a. Variation in salt tolerance of alfalfa. *Arid Soil Rehabil.* **3**: 11-20.
128. Mohammad, M., Campbell, W., Rumbaugh, M. 1989b. Acetylene reduction activity in salt-tolerant alfalfa/*Rhizobium* under drought stress. *Arid Soil Res Rehabil* **3**: 431-438.
129. Morales-García, Y.E., Juárez-Hernández, D., Aragón-Hernández, C., Mascarua-Esparza, M.A., Bustillos-Cristales, M.R., Fuentes-Ramírez, L.E., Martínez-Contreras, R.D., Muñoz-Rojas, J. 2011. Growth response of maize plantlets inoculated with *Enterobacter* spp., as a model for alternative agriculture. *Revista Argentina de Microbiología.* **43**: 287-293.
130. Morte, A., Díaz, G., Rodríguez, P., Alarcón, J., Sánchez-Blanco, M. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biol. Plant.* **44**: 263-267.
131. Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., y Boivin-Masson, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**:948-950.
132. Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., Paulin, L., de Lajudie, P., Lindström, K. 2014. Phylogeny of the *Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **37**: 208-215.

133. Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., de Lajudie, P., Lindström, K. 2015. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst. Appl. Microbiol.* 1-7.
134. Munns, D. 1986. Acid soils tolerance in legumes and rhizobia. *Adv Plant Nutr.* **2**: 63–91.
135. Naser, S., Thompson, F., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., Swings, J. 2005. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* **151**: 2141–2150.
136. Neyra, M. 1995. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno: leguminosa/*Rhizobium*. FAO. Roma.
137. Olsen, G., Woese, C. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* **7**: 113–123.
138. Ormeño, E., Torres, R., Mayo, J., Rivas, R., Peix, A., Velásquez, E., Zúñiga, D. 2003. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. Recent Advances in Microbial Phosphate Solubilization. Eds. Velásquez Pérez E, Rodríguez Barrueco C. Kluwer, The Netherlands. 143-147.
139. Papke, R., White, E., Reddy, P., Weigel, G., Kamekura, M., Minegishi, H., Usami, R., Ventosa, A. 2011. A multilocus sequence analysis approach to the phylogeny and taxonomy of the Halobacteriales. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2984-2995.
140. Perales, H., Aguirre J. 2008. Biodiversidad humanizada, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 565-603.
141. Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:180–201.
142. Piñero, D., Martínez, R. E. Selander, R. K. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2825-2832.
143. Reuhs, B. L., Williams, M. N. V., Kim, J. S., Carlson, R. W., Cote, F. 1995. Suppression of the Fix⁻ phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *lpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J. Bacteriol.* **177**: 4289-4296.
144. Rocha-Bonilla, 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.) Tesis de maestría. ICUAP-CICM.
145. Sadowsky, M. J., y Graham, P. H. 1998. Soil biology of the *Rhizobiaceae*. En: *The Rhizobiaceae*. H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp. 155-172.
146. Sadowsky, M. J., y Graham, P. H. 2002. *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer Verlag.
147. Saito, N. y Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. and Evol.*, **4**: 406-425.
148. Sánchez, F., Padilla, J., Pérez, H. & Lara, M. 1991. Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**:507-528.

149. Sanderson, M., Driskell, A. 2003. The challenge of constructing large phylogenetic trees. *Trends in plant science* **8**: 374-379.
150. Sanjuán-Pinilla, J.M. 2001. Importancia de la biosíntesis bacteriana de leucina para el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: GR. 3051-2009. ISBN: 978-84-692-5091-4.
151. Santos, C., Falcao, I., Pinto, G., Oliveira, H., Loureiro, J. 2002. Nutrient responses and glutamate and proline metabolism in sunflower plants and calli under Na₂SO₄ stress. *J Plant Nutr Soil Sci* **165**
152. **(3)**: 366–372.
153. Seeman, J. R., Sharkey, T. D. 1986. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose 1,5 biphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol* **82**(2):555–560.
154. Segovia, L., Young, P., Martínez, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 374-377.
155. Serraj, R., Vasquez, D., Drevon, J. 1998. Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion and ion distribution in soybean, common bean and alfalfa. *J Plant Nutr* **21**(3): 475–488.
156. Shaheen, A. 1984. Growth analysis and photosynthetic pigments of broad bean (*Vicia faba* L.) plants in relation to water stress and GA application. *Beitr Trop Landwirtsch Veterinaarmed* **22**: 263-268.
157. Silva, C., Eguiarte, L., Souza, V. 1999. Reticulated and epidemic genetic structure of *Rhizobium etli* biovar primers in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.* **8**: 277-287.
158. Smith, G., Kijne, J. W., Lugtenberg, B. J. J. 1987. Both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesion are involved in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **169**: 4294-4301
159. Smith, D. 1997. The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10 000 years ago. *Science* **276**: 932-934.
160. Smith, D. 2001. Documenting plant domestication: The consilience of biological and archeological approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 1324-1326.
161. Smith, D. 2005. Reassessing Coxcatlán Cave and the early history of domesticated plants in Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 9438-9445.
162. Somasegaran, P., Hoben H.J. y Lewison L. 1991. Symbiotic interactions of *Phaseolus acutifolius* and *P. acutifolius* X *P. vulgaris* hybrid progeny in symbiosis with *Bradyrhizobium* spp. and *Rhizobium leguminosarum* bv. primers. *Can. J. Microbiol.* **37**: 497-503.
163. Somasegaran, P., Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Springer-Verlag New York, Inc.
164. Soussi, M., Ocana, A., Lluch, C. 1998. Effect of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* **49**(325):1329–1337.
165. Souza, V., Eguiarte, L., Avila, G., Cappello, R., Gallardo, C., Montoya, J., Piñero, D. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar primers associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1260-1268.

166. Spaink, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:257–288.
167. Sprent, J. 1983. Adaptive variations in legume nodule physiology resulting from host rhizobial interactions. In: Lee JA, McNeill S, Rorison IH (eds) *Nitrogen as an ecological factor*. Blackwell Scientific, London, pp 29-42.
168. Sprent, J. 1985. Nitrogen fixation in arid environments. In: *Plants for arid lands*. Royal Botanic Gardens. Kew, London, pp 215-229.
169. Sprent, J., Sprent, P. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms. Pure and Applied Aspects*. Londo, U.K.:Chapman-Hall. Pp 256.
170. Stackebrandt, E., Goebel, B. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* **44**: 846–849.
171. Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G., Grimont, P., Kämpfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rosselló -Mora, R., Swings, J. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1043–1047.
172. Stepkowski, T., Czaplínska, M., Miedzinska, K., 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**: 483-494.
173. Sullivan, J., Eardly, B., van Berkum, P., Ronson, C. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2818–2825.
174. Suzuki, S., Aono, T., Lee, K., Suzuki, T., Liu, C., Wakao, S., Iki, T., Miwa, H. & Oyaizu, H. 1997. Rhizobial factors required for stem nodule maturation and maintenance in *Sesbania rostrata*-*Azorhizobium caulinodans* ORS571 symbiosis. *Appl. and Environ. Microbiol.* **73**:6650-6659.
175. Swart, S., Logman, T. J. J., Smit, G., Lugtenberg, B. J. J., Kijne, J. W. 1994. Purification and partial characterization of a glycoprotein from pea (*Pisum sativum*) with receptor activity for rhicadhesin, an attachment protein of *Rhizobiaceae*. *Plant Mol. Biol.* **24**: 171-183.
176. Tang, C., Barton, L., Raphael C. 1998. Pasture legume species differ in their capacity to acidify soil. *Aust J Agric Res.* **49**: 53–58.
177. Tao, E., Martínez, J., López, I. 2004. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas.
178. Tiwari, R., Reeve, W., Glenn, A. 1992. Mutation conferring acid sensitivity in the acid tolerant strains *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM 710. *FEMS Microbiol Lett.* **100**: 107–112.
179. Thompson, F., Gevers, D., Thompson, C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C., Swings, J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5107–5115.
180. Tu, J. C. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* **61**: 231-239.
181. Turner, S., Young, J. 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**: 309–319.
182. Tuteja, N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol* **428**: 419–438

183. United States Department of Agriculture. 2013. *Phaseolus filiformis* Benth., slimjim bean.
184. Valladares, F., Dobarro, I., Sánchez-Gómez, D., Percy, R. 2005. Photonhibition and drought in Mediterranean woody saplings: scaling effects and interactions in sun and shade phenotypes. *J. Exp. Bot.* **56**: 483-494.
185. Valverde, R., Velázquez, E., Gutiérrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A. & Igual, J. 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **53**:1979-1983.
186. van Berkum, P., y Eardly, B. D. 1998. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. Pp. 1-24 in: *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria*. H. P. Spaink, A. Kondorosí, y P. J. J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
187. van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindström, K., Eardly, B. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. *J Bacteriol* **185**: 2988–2998.
188. van Rhijn, P., y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.
189. Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**: 407–438.
190. Vandamme, P. & Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Inter. Jour. of Syst. and Evol. Microbiol.* **54**:2285-2289.
191. Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F.J. y Lupski J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**: 25-40.
192. Vincent, J. M. 1970. *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria*. Blackwell Scientific Publication. Ltd., Oxford, UK.
193. Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D. & Martínez-Romero, E. 2005. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* **34**: 29-54.
194. Vinuesa, P., Silva, C., Lorite, M., Izaguirre-Mayoral, M., Bedmar, E. & Martínez-Romero, E. 2005. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**: 702-716.
195. Vinuesa, P. 2008. *Genética Evolutiva I*. LCG-UNAM, México. <http://www.lcg.unam.mx>
196. Waters, J. K., Hughes, B. L., Purcell, L. C., Gerhardt, K. O., Mawhinney, T. P., Emerich, D. W: 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95** (20): 12038-12042.
197. Wernegreen, J., Riley, M. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol Biol Evol* **16**: 98–113.
198. Wertz, J., Goldstone, C., Gordon, D., Riley, M. 2003. A molecular phylogeny of enteric bacteria and implications for a bacterial species concept. *J Evol Biol* **16**: 1236–1248.
199. Willems, A., y Collins, M. D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia y agrobacteria based on 16S rARN gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 305-313.

200. Willems, A., Doignon-Bourcier, F., Goris, J., Coopman, R., de Lajudie, P., De Vos, P., Gillis, M. 2001. DNA–DNA hybridization study of Bradyrhizobium strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1315–1322.
201. Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and soil.* **287**: 3-14
202. Wood, M., Cooper, J., Bjourson, A. 1988. Response of *Lotus rhizobia* to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. *Plant Soil.* **107**: 227–231.
203. Xu, T., Fu, Ch., Tao, E., Xin, W. 2009. Associations among rhizobial chromosomal background *nod* genes, and host plants based on the analysis of symbiosis of indigenous rhizobial and wild legumes native to Xinjiang. *Environ. Microbiol.*, pp. 311-323.
204. Yanagi, M., Yamasato, K. 1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett* **107**: 115–120.
205. Young, J., Haukka, K. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* **133**: 87–94.
206. Young, J., Kuykendall, L., Martínez-Romero, E., Kerr, A., Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 89–103.
207. 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 later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination ‘*Sinorhizobium adhaerens*’ (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 2107–2110.
208. Zahran, H. 1978. Studies on the effect of water stress and salinity on nitrogen fixation by some legumes. M Sc thesis, Assiut University, Assiut, Egypt.
209. Zahran, H., Sprent, J. 1986. Effects of sodium chloride and polyethyleneglycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **167**: 303–309.
210. Zahran, H. 1991. Conditions for successful *Rhizobium-legume* symbiosis in saline environments. *Biol Fertil Soils.* **12**: 73-80.
211. Zahran, H., Räsänen, L., Karsisto, M., Lindström, K. 1994. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 100-105.
212. Zahran, H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Boil. Rev.* **63(4)**: 968-989.
213. Zakhia, F. & de Lajudie, P. 2006. La taxonomie bactérienne moderne: revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). *Canadian Journal of Microbiology.* **52**: 169-181.
214. Zehr, J., Mark, P., Mellon, T., Zani, S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. and Environ. Microbiol.* **64**: 3444-3450.

215. Zeigler, D. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1893–1900.
216. Zhang, X., Karsisto, M., Lindström, K. 1994. Assessment of the competitiveness of fast-growing rhizobia infecting *Acacia Senegal* using antibiotic resistance and melanin production as identification markers. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 199-205.
217. Zhu, J. 2001. Plant salt tolerance. *Trends plant sci.* **6**: 66-71.