



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Efecto de la interacción de *Ensifer aridi* LEM451 y de la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 con plantas *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato, sometidas a estrés salino”

Tesis para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA EDITH DELGADO RAZO

DIRECTOR DE TESIS

D. C. JOSÉ ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ

CO-DIRECTORA

M. C. GUADALUPE ROCHA BONILLA



Junio 2018

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Salinidad	3
2.1.1 Salinidad en el mundo	4
2.1.2 Salinidad en México	6
2.1.3 Salinidad en las plantas	6
2.1.4 Efectos de la salinidad en la germinación de semillas	8
2.2 Fijación Biológica del Nitrógeno	8
2.3 Interacción planta-bacteria	9
2.3.1 Inicio de la simbiosis y penetración de la bacteria en la raíz	10
2.3.1.1 Formación de nódulos	11
2.3.2 Microsimbionte rhizobia	11
2.3.2.1 Género <i>Ensifer</i>	12
2.3.2.2 <i>Ensifer aridi</i>	12
2.3.3 Macrosimbionte: Leguminosas	12
2.3.3.1 Género <i>Phaseolus</i>	13
2.3.3.2 <i>Phaseolus vulgaris</i>	14
2.3.4 Importancia del frijol en México	14
3. Antecedentes	16
4. Justificación	18
5. Objetivos	19
5.1 Objetivo general	19

5.2 Objetivos particulares	19
6. Metodología	20
6.1 Ensayos	20
6.1.1 Material biológico	21
6.1.2 Ensayo de germinación	21
6.1.3 Ensayo de nodulación	22
6.2 Análisis de datos	24
6.2.1 Ensayo de germinación	24
6.2.1.1 Porcentaje final de germinación	24
6.2.1.2 Velocidad media de germinación	25
6.2.1.3 Coeficiente de velocidad	25
6.2.1.4. Parámetros	25
6.2.2 Ensayo de nodulación	25
6.2.2.1 Evaluación de los efectos de la salinidad. (longitud, peso fresco, peso seco, nódulos)	25
7. Resultados	27
7.1 Ensayo de germinación	27
7.1.1 Porcentaje final de germinación	27
7.1.2 Velocidad media de germinación	28
7.1.3 Coeficiente de velocidad de germinación	29
7.1.4. Parámetros	30
7.1.4.1 Longitud raíces	30
7.1.4.2 Longitud tallos	30

7.2 Ensayo de nodulación	33
7.2.1 Parámetros	33
7.2.1.1 Longitud tallo y raíz	33
7.2.1.2 Peso fresco	35
7.2.1.2.1 Tallo	35
7.2.1.2.2 Raíz	36
7.2.1.3 Peso seco	37
7.2.1.3.1 Tallo	37
7.2.1.3.2 Raíz	38
7.2.1.4 Nódulos	39
8. Discusión	41
9. Conclusión	44
10. Bibliografía	45
11. Anexos	53

*“En algún lugar,
algo increíble
está esperando ser conocido”.*

Carl Sagan

DEDICTAORIA

Este trabajo está especialmente dedicado a mi padre, madre y hermana ya que sin ustedes nada sería posible, por todas esas veces que no asistí a comidas, reuniones, festejos y demás por causas de la carrera. A las mujeres de mi vida sin cuyo apoyo no sería la persona que soy, en especial para mi abuela Mago por enseñarme que para el amor no hay tiempo ni distancia, a ti por ser la madre de toda una familia, un ejemplo de una gran mujer.

A la vida por ser efímera y a veces complicada pero siempre hermosa.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo incondicional que me han dado a lo largo de toda la vida. A mis padres, Edith y José por jamás dejar que abandonara mis sueños, por tratar de entender ésta cabeza loca que me tocó, por impulsarme a ser lo mejor de mí, por no perder la esperanza, por dejarme ser su hija; a Majo por esa forma tan rara que tiene de sacarme una sonrisa en los momentos de estrés, enseñándome que el amor de hermanas es único y a mis pequeños canes que siempre saben levantarme con sus locuras.

A Elías y Berenice por apoyarme en las estadías y brindarme su paciencia y comprensión, por ese primer libro que me regalaron y al cual siguieron bastantes más.

A mi codirectora, Mtra. Guadalupe Rocha, por todo el apoyo y comprensión cuando me mataba la cabeza y que no fueron pocas ocasiones, por su paciencia para enseñarme aquello que no sabía y por abrirme las puertas de ese momento que compartimos.

A mi director de tesis, Dr. Antonio Munive por aceptarme en su línea de trabajo y siempre estar para lo que necesitara.

A mi mejor amiga, Martha, ya que jamás ha dejado de creer en mí, por aguantarme en las películas donde todo lo asocio con la biología y además por ponerme atención en ello. A mis amigos de la universidad que siempre supieron sacarme adelante cuando quería rendirme, por asistir a mis partidos y ser la mejor porra, Amy, Jessica, Alday y por esos innumerables momentos que pasamos juntos disfrutando de lo que nos ponía la vida enfrente. A la Soberna Junta Molotil, por la comida, el bullying y la buena amistad.

A Dios, por permitirme llegar hasta éste momento de la vida, aun cuando no creía llegaría.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (VIEP-BUAP), por el apoyo para la culminación de este trabajo.

1. Resumen

La salinidad del suelo es uno de los principales problemas a los que se enfrenta el hombre en la actualidad, siendo un inconveniente que afecta directamente a la estabilidad alimentaria de las sociedades, ya que la pérdida de suelos fértiles para la agricultura es una realidad cada vez mayor. Sin embargo, existen microorganismos, específicamente los pertenecientes a los del grupo *rhizobia*, capaces de sobrevivir a estas condiciones y además, de establecer una simbiosis con ciertas plantas, proporcionándoles resistencia para sobrevivir a dicha situación. De entre éstas plantas encontramos al género *Phaseolus* el cual es de suma importancia para el ser humano ya que algunas de sus especies son de consumo alimentario. El resultado final de dicha simbiosis es la formación de nódulos en las raíces de las plantas.

En el presente trabajo se realizaron dos tipos de experimento para poder establecer los efectos de la interacción de *Ensifer aridi* LEM451 y de la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 con plantas *Phaseolus vulgaris* sometidas a estrés salino; para ello, el primer tratamiento consistió en evaluar cinco variedades de *Phaseolus vulgaris* (Mantequilla, Morelos, Flor de Mayo, Negro y Vaquita) de las cuales, la que tuvo una mayor resistencia a condiciones de estrés salino, fue la variedad Negro Guanajuato teniendo un elevado índice de germinación. Con este experimento además se determinó la concentración salina que fuera la indicada para que se presentara estrés salino y que no imposibilitara la germinación de las semillas. Se utilizaron doce concentraciones (0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131 y 200 mM) de las cuales la concentración 33.3 mM fue la más adecuada para el desarrollo del experimento.

El segundo experimento realizado consistió en evaluar los efectos de la interacción de *Ensifer aridi* LEM451 y de la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 con plantas *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato, sometidas a estrés salino, esto mediante dos tratamientos, uno de los cuales, durante la germinación se les agregó 33.3 mM de NaCl en cada planta, para posteriormente inocularlas con las cepas, resultando que tanto la longitud de tallos y raíces se ve afectada por la

salinidad, presentando una disminución en su tamaño, sin embargo, al inocular de *Ensifer aridi* LEM451 y la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 en plantas *Phaseolus vulgaris*, se observa una resistencia a condiciones salinas, presentando una mayor longitud en sus tallos y raíces en comparación a aquellas las cuales no se inocularon; así como también se observa una alta supervivencia frente a NaCl. Las plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 presentaron nódulos en sus raíces, reportándose por primera vez a la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 como nodulante de *Phaseolus vulgaris*.

2. Introducción

La agricultura es una de las principales actividades económicas de la humanidad y durante mucho tiempo ha sido el sustento alimentario de las sociedades (Levetin & McMahon, 2008). Sin embargo, uno de los más serios problemas que presenta ésta actividad en la mayoría de los países del mundo es la presencia de cantidades excesivas de sales solubles en el suelo (Aringhieri, 2010). Por lo que a partir de varios datos disponibles se calcula que el planeta está perdiendo al menos tres hectáreas de tierra productiva cada minuto debido a la creciente salinidad del suelo (Abrol *et al.*, 1988.)

2.1 Salinidad

El suelo está compuesto de partículas sólidas, agua y aire; entre las partículas sólidas podemos encontrar minerales y partículas orgánicas de diferentes formas, tamaños y arreglos, los cuales constituyen la matriz del suelo. (SEMARNAT, 2010). De acuerdo con Flores (1993) la salinidad en suelos dependiendo su origen puede ser primaria o secundaria. La salinidad primaria se puede observar en las zonas costeras en donde la fuente de sales es el océano, el cual aporta directamente los materiales solubles y en las zonas áridas y semiáridas, en donde las sales en el suelo se producen como iones (formas de átomos o compuestos cargados eléctricamente), los cuales se liberan por la meteorización de minerales presentes en el suelo. La salinidad secundaria es aquella en la cual las sales pueden aplicarse a través del agua de riego y/o como fertilizantes, migrando hacia arriba en suelos de aguas subterráneas poco profundas. Cuando la precipitación es insuficiente para lixiviar los iones del perfil del suelo, las sales se acumulan en el suelo resultando en la salinidad del suelo (Aringhieri, 2010; Blaylock, 1994)

La salinidad del suelo ha sido identificada como el mayor proceso de la degradación y principal causa de desertificación de los suelos, particularmente en áreas semiáridas o áridas. (Aringhieri, 2010). Un suelo salino es aquel en el que la conductividad eléctrica (EC por sus siglas en inglés) del extracto de saturación (ECe) en la zona de la raíz excede aproximadamente 40 mM de NaCl (4 dSm^{-1}) a 25°C (Munns, 2002).

2.1.1 Salinidad en el mundo

Uno de los problemas clásicos de degradación de la tierra que ha tenido que enfrentar el hombre, ha sido el de controlar, prevenir o mejorar los suelos afectados por la salinidad.

En el proyecto GLASOD (Global Assessment of Human Induced Soil Degradation) destinado al conocimiento del estado de degradación del suelo a nivel mundial, Oldeman *et al.*, (1991) estimaron que 76.6 millones de hectáreas de tierras cultivadas están afectadas por salinización (figura 1).

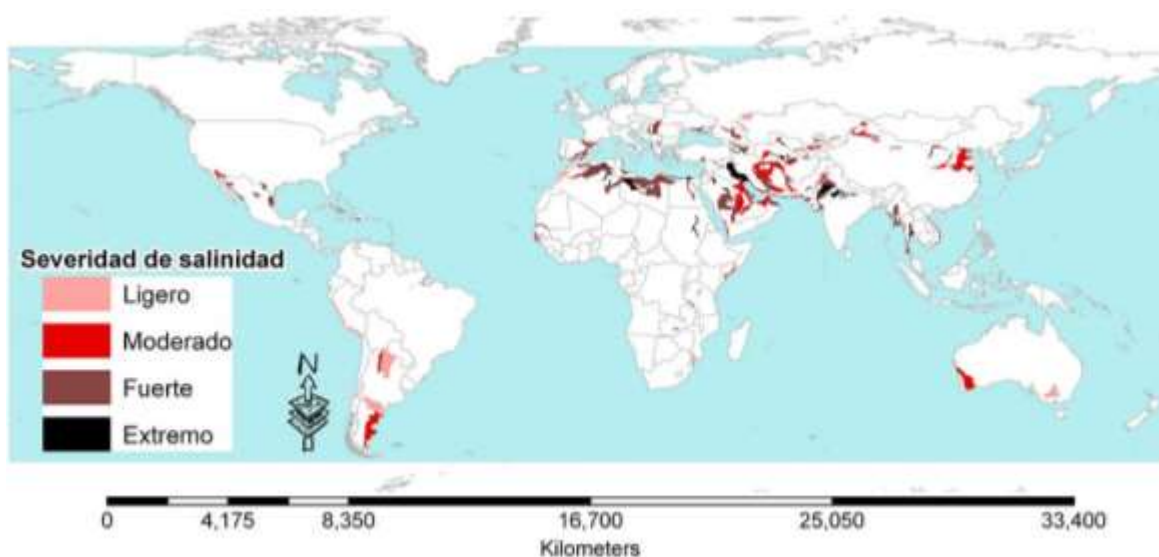


Figura 1. Mapa del grado de severidad de la degradación del suelo por salinidad. (GLASOD, Oldeman 1991).

Jamil *et al.* (2011) estiman que en todo el mundo el 20% del total de cultivos y el 33% de las tierras agrícolas por riego se ven afectados por una alta salinidad. Además, las áreas con esta situación están aumentando a una tasa del 10% anual por diversas razones, incluyendo baja precipitación, alta evaporación superficial, meteorización de rocas nativas, irrigación con agua salina y prácticas de cultivo deficientes. Se ha estimado que más del 50% de las tierras para siembra serían salinas para el año 2050. Pavuluri *et al.*, en 2014 estimaron las regiones afectadas por la salinidad en el mundo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Suelos salinos en el mundo.

REGIÓN	ÁREA AFECTADA (10 ⁶ ha)
ÁFRICA	69.5
MEDIO ORIENTE	53.1
ASIA	19.5
LATINO AMÉRICA	59.4
AUSTRALIA	84.7
NORTE AMÉRICA	16.0
EUROPA	20.7

Así como las naciones que presentan las mismas problemáticas en todo el mundo (figura 2).



Figura 2. Mapa del mundo representando los países con problemas de salinidad

2.1.2 Salinidad en México.

México tiene 1 millón 964 mil 375 km² de superficie territorial, 80 millones de hectáreas presentan diversos grados de salinidad. La agricultura en México ocupa 26.9 millones de hectáreas (SIAP, 2016), aproximadamente 5 millones de hectáreas están bajo un proceso de salinización, en algunos casos muy acelerado. La acumulación de sales solubles en el suelo mediante el uso de riego ha adquirido magnitudes importantes, provocando que, en la actualidad, el 33% de la superficie de agricultura bajo riego se encuentre afectada, disminuyendo notablemente la productividad de algunos distritos y causando pérdidas económicas considerables al país. Se estiman alrededor de 2 millones de hectáreas agrícolas manejadas por irrigación, que tienen niveles bajos de producción por la influencia salina, de éstas, 300 000 ha presentan rendimientos deficientes o están abandonadas. El avance de este fenómeno alcanza un ritmo 10 000 hectáreas por año (Feucher, 2000). La mayoría de las plantas de importancia agrícola en México son sensibles a la salinidad y su producción se ve significativamente reducida cuando se cultivan en suelos salinos (Bronwyn *et al.*, 2007)

2.1.3 Salinidad en las plantas

Las plantas se clasifican, según su comportamiento ante condiciones salinas, en halófitas (plantas adaptadas al estrés salino) y glicófitas (plantas que no están adaptadas a vivir en ambientes salinos). Los mecanismos disponibles por las plantas mediante los cuales llegan a presentar diferentes grados de tolerancia persiguen dos objetivos fundamentales: la protección contra la pérdida de agua y la protección contra el efecto tóxico de los iones (Pasternak, 1987).

La salinidad es uno de los factores limitantes ambientales más fuertes para la producción de cultivos porque la mayoría de estos son sensibles a la salinidad causado por las altas concentraciones de sales en el suelo; entre los aspectos de la planta que dicho estrés afecta son la germinación, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo, además ocasiona toxicidad iónica, estrés osmótico, deficiencia de nutrientes (N, Ca, K, P, Fe, Zn) y estrés oxidativo limitando así la absorción de agua del suelo (Cuadro 2). (Cokkizgin, 2012; Bano & Fatima, 2009)

Los efectos de la salinidad en las plantas varían dependiendo del estadio de crecimiento y de la duración del estrés. En algunas especies, la tolerancia a la salinidad en la germinación es independiente de la tolerancia a la salinidad en la emergencia, crecimiento vegetativo, floración y fructificación. (Bazzigalupi *et al.*, 2008)

Cuadro 2. Estudios sobre el efecto de la salinidad en *Phaseolus vulgaris* spp.

PROYECTO	AUTORES	RESULTADOS
Evaluación del crecimiento del frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L) CV ICA Cerniza, bajo estrés salino.	(Blanco <i>et al.</i> , 2016)	El aumento de la dosis de NaCl, disminuye el contenido total de clorofila y la resistencia estomática aumenta
Efecto del estrés salino en la germinación y el crecimiento temprano de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	(Mena <i>et al.</i> , 2015)	El estrés por salinidad a 150Mm de NaCl redujo la germinación de semillas y crecimiento de las plántulas.
Germinación y crecimiento de plántulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en condiciones de salinidad	(Can <i>et al.</i> , 2014)	El aumento de NaCl disminuye la tasa de germinación, así como el crecimiento del tallo y raíz de tres variedades de frijoles (Negro, Pinto y Azufrado).
Respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y de ultra estructura en frijol, al estrés de salinidad, altas temperaturas y sequía en etapa de plántula	(Limon, 1998)	En general los resultados obtenidos muestran una reducción gradual en la capacidad de la germinación de la semilla sometida a condiciones de salinidad

2.1.4 Efectos de la salinidad en la germinación de las semillas.

La germinación es el proceso fisiológico mediante el cual emergen y desarrollan, a partir del embrión, las estructuras esenciales para la formación de una planta normal (Delouche, 2002). Se ha demostrado que concentraciones altas de sales afectan la etapa y tasa de germinación, longitud del tallo, ramificación y tamaño de las hojas (Gutierrez *et al.*, 2005). Can *et al.* (2014) demostraron que conforme la conductividad eléctrica se incrementa, la tasa de germinación disminuye. La elevada concentración salina del medio de germinación disminuye el potencial hídrico y por lo tanto reduce la disponibilidad de agua necesaria para imbibición que requieren las semillas para germinar (Kaymakanova, 2009).

También se ha demostrado que a mayor concentración de sales menor potencial osmótico e hídrico y por tanto la semilla tiene que realizar procesos de ajustes osmóticos para poder superar el potencial del medio en el que está inmersa y así germinar; de lo contrario, si no logra superar el estrés del medio se deshidratará. Yao *et al.*, (2002) sugieren que el utilizar bacterias se ha convertido en una alternativa para aliviar el estrés en las plantas causados por la salinidad, esto por la simbiosis que llegan a establecer.

2.2 Fijación Biológica del Nitrógeno

El crecimiento de todas las plantas está determinado de forma directa o indirecta por la disponibilidad de nutrientes minerales, en especial del nitrógeno. Una vez cubiertas las necesidades de agua, el factor limitante más importante es el nitrógeno. El nitrógeno es el componente que se encuentra en mayor proporción en la atmósfera de nuestro planeta; y debido al fuerte triple enlace existente entre los átomos de nitrógeno, este no puede ser aprovechado como tal por organismos superiores (Fassbender y Bornemisza, 1994).

De entre los organismos capaces de aprovechar este componente encontramos organismos procariontes, los cuales pueden vivir en vida libre o formando asociaciones. Varios grupos de procariontes son capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas superiores. De estas interacciones, la

que ha sido más estudiada es la del grupo de bacterias rizobiales y su simbiosis con las leguminosas; estas bacterias tienen la capacidad de transformar el nitrógeno molecular en compuestos más fácilmente asimilables para la planta. El establecimiento de la simbiosis rizobia-leguminosa, es el resultado de una compleja secuencia de interacciones que culminan con la formación de un nódulo en la raíz. Este es una estructura especializada, formado por varios tipos de células altamente diferenciadas, entre las cuales se encuentran las células infectadas. (Arroyo, 1996). El proceso a través del cual estos microorganismos reducen el nitrógeno hasta una forma asimilable es conocido como fijación Biológica del Nitrógeno (FBN por sus siglas en español) (Parsons y Sunley , 2001)

2.3 Interacción planta-bacteria

Las plantas leguminosas pueden participar en la simbiosis formadora de nódulos en la raíz de la planta mediante bacterias del suelo fijadoras de nitrógeno, llamadas colectivamente rizobia. Esta asociación mutualista es altamente específica, de modo que cada especie / cepa rizobiana interactúa solo con un grupo específico de leguminosas, y viceversa. La especificidad de la simbiosis puede ocurrir en múltiples fases de la interacción, que van desde la unión bacteriana inicial y la infección hasta el desarrollo tardío de nódulos asociados con la fijación de nitrógeno. (Wang *et al.*, 2012)

La simbiosis bacteria-leguminosa comienza con dos organismos vivos libres y termina con una íntima convivencia celular. El proceso de nodulación para casi todas las legumbres estudiadas se inicia por la producción, de parte de la leguminosa, de una mezcla de compuestos, principalmente flavonoides, que inducen la síntesis de la proteína NodD en los rizobia. Las bacterias reconocen las plantas específicas provocando el desarrollo de un nódulo de la raíz e invaden el tejido vegetal. Finalmente, la planta aporta esqueletos carbonados para el metabolismo del bacteroide a través del floema y, por su parte, el bacteroide aporta amonio en forma de diferentes aminoácidos a la planta (Poole y Lodwig, 2003; Long, 2001).

2.3.1 Inicio de la simbiosis y penetración de la bacteria en la raíz.

La simbiosis inicia con la liberación de metabolitos secundarios por parte de la leguminosa contenidos en los exudados de la semilla y la raíz, estos compuestos son de naturaleza flavonoide y entre ellos podemos encontrar naringenina, genisteína y daidzeína, así como ácidos aldónicos y betaínas, los cuales atraen a los rizobia hacia la región apical de los pelos radicales; éste proceso ocurre en la parte del suelo inmediata a la raíz, mejor conocida como rizósfera (Quinto & Cárdenas , 2007). Mediante el hilo de infección o cayado del pastor, que es la nueva estructura que se forma en el ápice del pelo radical por el estímulo continuo del rizobio y los factores Nod que se producen, la bacteria se adentra en el pelo radical y de ésta forma llega al córtex de la célula (figura 3) (Dupont *et al.*, 2012; Long, 2001).

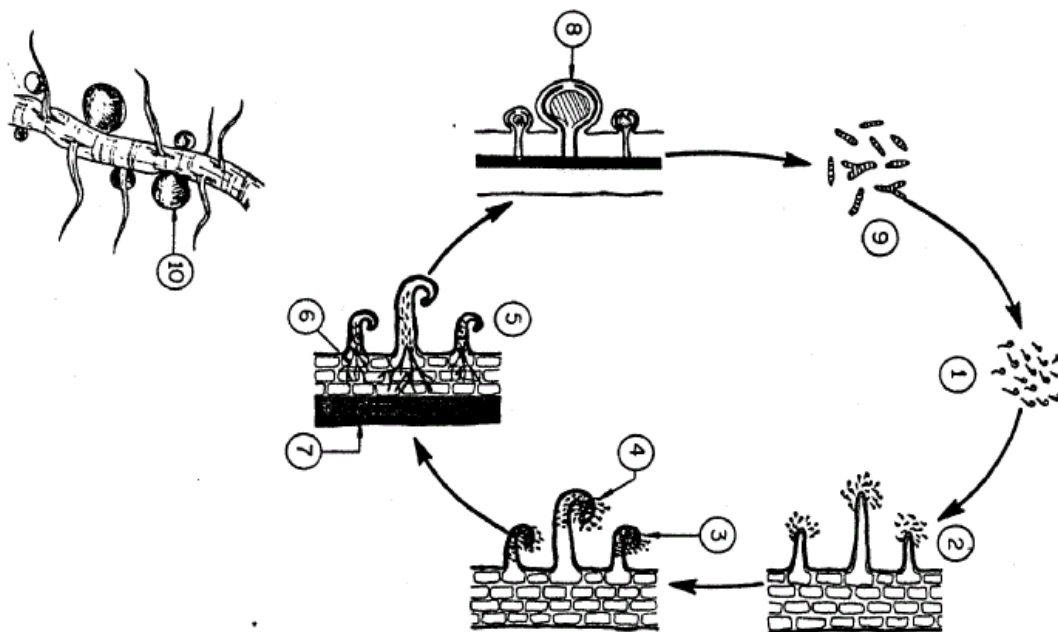


Figura 3. Proceso de la infección de la bacteria en la raíz: 1. Bacteria libre. 2. Bacteria atraída por el pelo radical mediante los exudados 3. Inicio de la infección por la bacteria en el pelo radical. 4. Cayado del pastor (pelos radicales, infectados por la bacteria) 5 y 6. El cordón de infección invade la matriz de células corticales de la leguminosa en la raíz. 7. Los rizobios se reproducen en las células haploides de la raíz y pierden su pared celular. 8. Como resultado la hipertrofia radical aparece el nódulo. 9. Algunos rizobios sin pared (Bacteroides) en las células corticales son liberados. 10. Una vez formado el nódulo fija nitrógeno N₂.

2.3.1.1 Formación de nódulos.

Los factores Nod previo a la formación del cayado del pastor, producirán un hinchamiento en la zona apical del pelo el cual dará lugar a un enroscamiento sobre sí mismo, ayudándole a atrapar a los rhizobia que se encuentren en esta zona para así generar un nuevo sitio de crecimiento (Quinto & Cárdenas, 2007). La percepción de los factores Nod, inicia una vía de señalización compleja para la invasión bacteriana en la leguminosa y la formación del nódulo. Para que esto suceda se requiere una vía de señalización del calcio, que incluye la activación de una proteína quinasa dependiente de calcio (Dupont *et al.* 2012). Al momento que las bacterias penetran en la planta, las células hospederas que se encuentran en la corteza de la raíz, dan lugar a una población de células recién generadas, que formarán el nódulo.

La nodulación de las leguminosas se reduce por el estrés salino ya que inhibe los eventos simbióticos de manera temprana. Es importante señalar que los niveles de salinidad que pueda tolerar cada uno de los simbioses por separado (rhizobia y leguminosa) y que afectan su crecimiento y desarrollo, son diferentes a los que pueden inhibir la simbiosis entre leguminosas-rhizobia (Zahran, 1991). Las leguminosas en simbiosis con *rhizobia*, usualmente presentes en ecosistemas áridos, pueden adaptarse para fijar más N₂ en condiciones salinas que las leguminosas cultivadas en otros hábitats.

2.3.2 Microsimbionte: Rhizobia

De manera general, se designa como *rhizobia* a todas las bacterias que son capaces de nodular y fijar nitrógeno en asociación con leguminosas (Willems *et al.*, 2003; Zakhia & De Lajudie, 2006). En 2012, el grupo *rhizobia* abarcaba aproximadamente 15 géneros y aproximadamente 98 especies (*ICSP Subcommittee on the taxonomy of Rhizobium and Agrobacterium diversity, phylogeny and systematics*, 2012). Dentro de estas bacterias podemos encontrar los géneros, *Rhizobium*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), entre otros.

2.3.2.1 Género *Ensifer*

El género *Ensifer* anteriormente conocido como *Sinorhizobium* era utilizado para designar a las bacterias de rápido crecimiento aisladas en China, las cuales nodulan a la soya y, que inicialmente se habían incluido en *Rhizobium melilotii*. Sin embargo, se separaron de este género debido a las diferencias en las secuencias de genes 16SrRNA, llevando a la propuesta del nuevo género (Chen *et al.*, 1988). Este género pertenece a la familia Rhizobiaceae de alfa-proteobacterias e incluye un número creciente de especies definidas. Estas bacterias son Gram-negativas de rápido crecimiento y cuya forma es similar a una barra; puede desarrollar simbiosis con diversas legumbres. El intervalo de huésped varía en gran medida con la especie y depende de la reserva simbiótica del gen presente en el microsimbionte que se encuentra sobre todo en los plásmidos grandes llamados pSym. Mientras que algunas cepas de *Ensifer* o especies presentan una gama de huéspedes más bien estrecha, otras tienen la capacidad de nodular un gran número de leguminosas.

2.3.2.2 *Ensifer aridi*

Ensifer aridi fue descrita como nueva especie por Le Quéré *et al.*, (2017), mediante el uso de genómica comparativa y herramientas de delineación de especies basadas en el genoma actual. Ésta especie es capaz de utilizar malonato como una fuente de carbono que puede utilizar eficientemente y que puede haber ampliado su aptitud para las leguminosas que producen este ácido orgánico, está adaptada a altas temperaturas (puede crecer a 48 °C), aridez y suelos de tipo alcalino o pH alto mientras que los niveles de tolerancia a NaCl eran comparables a otras especies de *Ensifer*. (Le Quéré *et al.* 2017)

2.3.3 Macrosimbionte: Leguminosas

El consenso actual entre los especialistas de las Fabaceae o leguminosas es de considerarlas como una sola familia, Leguminoesae.; la cual comprende 727 géneros y 19 000 especies en el mundo, agrupadas en 40 tribus (Lewis y Schrire, 2005). Las leguminosas se dividen en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae.

Una característica de las leguminosas es que permiten establecer simbiosis con algunas bacterias del grupo de los *rhizobia*. Brewbaker *et al* (1990) confirmaron la nodulación radicular en 648 especies de árboles y arbustos; 520 especies corresponden a leguminosas pertenecientes a las subfamilias Mimosoideae (321 especies), Papilionoideae (173 especies) y Caesalpinioideae (26 especies).

Las leguminosas han sido parte esencial de la alimentación humana desde hace siglos (FAO, 2014). Las leguminosas son un grupo de plantas pertenecientes a la familia Fabaceae; son el tercer grupo de plantas más numeroso del planeta, de distribución cosmopolita y cuyo origen se presume hace alrededor de 90 millones de años, con un proceso de diversificación que habría comenzado en el Terciario temprano. Este grupo presenta gran diversidad tanto en morfología como en hábitat, es por ello que se pueden encontrar desde pequeñas leguminosas anuales hasta los grandes árboles de las selvas tropicales (De Faria *et al.*, 1987)

2.3.3.1 Género *Phaseolus*

El género *Phaseolus* L., es originario del continente americano, en el cual tiene amplia distribución, encontrándose desde el sureste de Canadá hasta el norte de Argentina. Éste género es parte de la subtribu Phaseolinae y es pariente cercano del género *Vigna* (Perales & Aguirre, 2008). El género *Phaseolus* se diferencia morfológicamente de los otros géneros de la familia Fabaceae por estar formado por plantas trepadoras con hojas trifoliadas, cuyos folíolos son enteros. La flor posee una quilla de ápice rostrado, encorvado en forma de S o en espiral lateral y un estilo barbudo (Dimitri y Orfila, 1985)

Las especies de *Phaseolus* se encuentran distribuidas en 9 grupos, cada uno de ellos con distinciones morfológicas, biogeográficas y ecológicas. En México se encuentran la mayoría de las especies, aproximadamente 65 (alrededor de un 83% del total de especies registradas), de las cuales 31 especies son endémicas. Los estados con mayor riqueza de especies son Durango, 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 (Delgado y Gama, 2015)

2.3.3.2 *Phaseolus vulgaris*

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) pertenece a la subfamilia Papilionaceae, dentro de la tribu Phaseoleae. Esta planta es nativa de América. Existen entre 50 y 60 especies de frijol silvestre; sin embargo, sólo 5 han sido domesticadas por el hombre: *P. vulgaris* (frijol común), *P. polyanthus*, *P. coccineus* (frijol ayocote), *P. acutifolius* (frijol tepari) y *P. lunatus* (frijol comba) (Debouck, 1999)

Las variedades de *P. vulgaris* común, actualmente cultivadas, son el resultado de un proceso de domesticación y evolución a partir de un espécimen silvestre, *P. vulgaris* var. arborigineus (Brücher, 1988) procedente del continente americano en el área comprendida entre el norte de México y el noroeste de Argentina. *Phaseolus vulgaris* germina a partir de los 10°C, pero es necesario sembrarlo con una temperatura media de 15°C. Florece normalmente con ésta última media y madura a los 18- 20°C.

Como todas las leguminosas, el frijol tiene la capacidad de asociarse a bacterias del suelo llamadas rhizobia (singular *Rhizobium*). Dicha asociación entre leguminosas y *Rhizobium*, comprende a la mayoría de las 18,000 especies de leguminosas y resulta en una simbiosis fijadora de nitrógeno de importancia ecológica que aporta, anualmente, una cuarta parte del nitrógeno fijado en la biósfera (Masson *et al.*, 2009). En 2010, la producción mundial de frijol fue aproximadamente 23,816,123 t, con 24.4 y 17.7% de la producción mundial en América Latina y el Caribe y África, respectivamente (FAO, 2014).

2.3.4 Importancia del frijol en México

México es considerado uno de los centros de origen de la agricultura en donde se han cultivado especies de vital importancia para el consumo humano (Perales & Aguirre, 2008). En México, según diversos autores el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) está entre los primeros tres cultivos en importancia por la superficie que ocupa, después del maíz grano y el sorgo grano; durante 2014 se cosecharon 1.68 millones de hectáreas y el sexto lugar en valor de producción (SIAP-SAGARPA, 2015; Romero Arenas *et al.*, 2013)

Debido a su alta disponibilidad, su bajo costo y su tradición cultural tanto a nivel nacional como regional, en México se cultivan cerca de 70 variedades de frijol que se distribuyen en siete grupos: negros, amarillos, blancos, morados, bayos, pintos y moteados. Las variedades de mayor consumo son: azufrado, mayocoba, negro jamapa, peruano, flor de mayo y junio. Las de consumo intermedio son: garbancillo, manzano, negro San Luis, negro Querétaro y pinto, y las de menor preferencia son: alubia blanca, bayo blanco, negro Zacatecas, ojo de cabra y bayo berrendo. Las variedades azufrada y mayocoba tienen un mayor consumo en la zona norte de México (Flores, 2015).

Dentro de la importancia que a esta especie se le ha dado en México, es por las propiedades nutricionales que presenta ya que ayudan a la disminución del colesterol y los triglicéridos, así como también combaten el estreñimiento que previene el cáncer de colon. Además de que son una fuente rica de proteínas y carbohidratos, y ser una buena fuente de complejo de vitamina B, como la niacina, la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina. También proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio, teniendo un alto contenido de fibra. También es una excelente fuente de ácidos grasos. (Rocha y Gallegos, 2007).

4. Antecedentes.

Este proyecto procede de toda una serie de trabajos en cuyo primer paso Cuéllar-Sánchez (2011) aisló cepas de *rhizobia* en nódulos y suelo de Baja California Sur; a los cuales se les determinó el género al que pertenecían (de entre las cuales 3 cepas pertenecen al género *Rhizobium* y 10 pertenecen al género *Sinorhizobium*), así como también evaluó su potencial biofertilizante siendo las cepas LEM457, LEM512 y LEM18 las que se obtuvieron los mejores resultados, posteriormente Rocha-Bonilla (2012) demostró que la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Sinorhizobium* aisladas de *Phaseolus filiformis*, poseen tolerancia a la salinidad; sin embargo, sólo las cepas LEM451 y LEM466 mostraron poseer hipertolerancia, además de que realizó un primer análisis un análisis de secuencias multilocus (MLSA por sus siglas en inglés) de los genes *atpD*, *dnaK*, *glnII*, *gyrB*, *rpoB* y *recA* con todas las cepas de *Sinorhizobium* que Cuéllar-Sánchez aisló y fue donde se tuvo el primer indicio de que se trataba de una posible nueva especie. Medina-Malagón (2015) caracterizó el grupo de bacterias pertenecientes al género *Ensifer*, las cuales fueron aisladas de una leguminosa silvestre (*Phaseolus filiformis*) provenientes del estado de Baja California, empleando para ello un MLSA más extenso que el que Rocha-Bonilla había realizado pues en este se integró el análisis de los genes *thrC*, *glnA* y 16sRNA encontrando que a pesar de las similitudes registradas con otras bacterias, estas no pertenecían a alguna especie en particular, concluyendo que se trataba de una especie nunca antes descrita. Rocha-Bonilla (2017) realizó mutagénesis insercional en la cepa silvestre *Ensifer aridi* LEM451 y obtuvo como resultado diversas mutantes con sensibilidad a la salinidad, entre ellas se obtuvo a la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6. Esta mutante se caracterizó y se determinó por medio de la técnica de PCR arbitraria que poseía mutado un gen que codifica para un transportador tipo ABC-2 relacionado con la resistencia a salinidad en cepas de *rhizobia*. Finalmente, Le Quéré *et al.*, 2017 con base en la caracterización genómica definieron a la cepa silvestre *Ensifer* LEM451 como una nueva especie *rhizobium* fijadora de nitrógeno *Ensifer aridi*, proveniente de los desiertos de Asia, África y América.

Tras estos proyectos el consiguiente es aprovechar las características simbióticas de ésta nueva especie registrada, *Ensifer aridi*, para conocer realmente su capacidad de nodulación del frijol bajo estrés salino dado que los suelos donde fue encontrada presentan sequía y alta salinidad, problemas que se presenta también en zonas agrícolas donde por un mal manejo del riego y fertilizantes, sus suelos tienen problemas de salinidad, afectando directamente su producción. Esta simbiosis, es una oportunidad de proporcionar datos dado que los estudios de la simbiosis de *Phaseolus vulgaris* con *Ensifer*, son escasos o en su defecto nulos.

4. Justificación

Para México el frijol, es una de las especies más importantes para el consumo de sus habitantes, sin embargo, debido a la pérdida de suelo cultivable por condiciones de estrés salino, se presenta disminución en los cultivos y la creciente densidad poblacional necesita una mayor cantidad de alimentos, por lo que se buscan especies que puedan resistir ante estas condiciones o en su caso, la relación simbiótica que permita la supervivencia de las plantas en los cultivos. Las leguminosas son reconocidas por su capacidad de establecer simbiosis con bacterias del grupo Rhizobia, se han descrito numerosas especies de bacterias nodulantes del frijol silvestre, encontrándose la especie *Rhizobium etli* como la predominante en suelos de América, aunque muchas otras especies de Rhizobium también han sido reportadas como nodulantes del frijo e inclusive diferentes generos como Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Herbaspirillum, entre otros, que han sido reportados con la capacidad de nodular al frijol común en regiones donde el frijol ha sido introducido. De entre estos, el género *Ensifer* es reconocido por su tolerancia a condiciones de estrés salino. El gran número de cepas capaces de nodular *Phaseolus* indica que este hospedero es promiscuo, y que existe una amplia diversidad de interacciones rhizobia-frijol.

Los estudios que consideran la utilización de cepas nativas de rhizobia, evaluando las características simbióticas de éstas ante condiciones de estrés salino, permitirá utilizarlas con un elevado potencial biotecnológico como alternativa de mejoramiento de los cultivos de diferentes variedades de frijol.

5. Objetivo

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la interacción de *Ensifer aridi* LEM451 y de la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 en plantas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato, sometidas a estrés salino.

5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la variedad de *Phaseolus vulgaris* que presente la mayor tasa de germinación y coeficiente de velocidad de germinación bajo estrés salino.
2. Determinar la mejor concentración mM de NaCl para la germinación de semillas de *Phaseolus vulgaris*.
3. Comprobar la presencia de nódulos en plantas *Phaseolus vulgaris* por la interacción con *Ensifer aridi* LEM451 y con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6.
4. Evaluar los efectos de la salinidad en las raíces y tallos de plantas de *Phaseolus vulgaris* en interacción con *Ensifer aridi* LEM451 y con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6.

6. Metodología

6.1 Ensayos.

En la figura 4 se describen los pasos metodológicos llevados a cabo durante el ensayo.

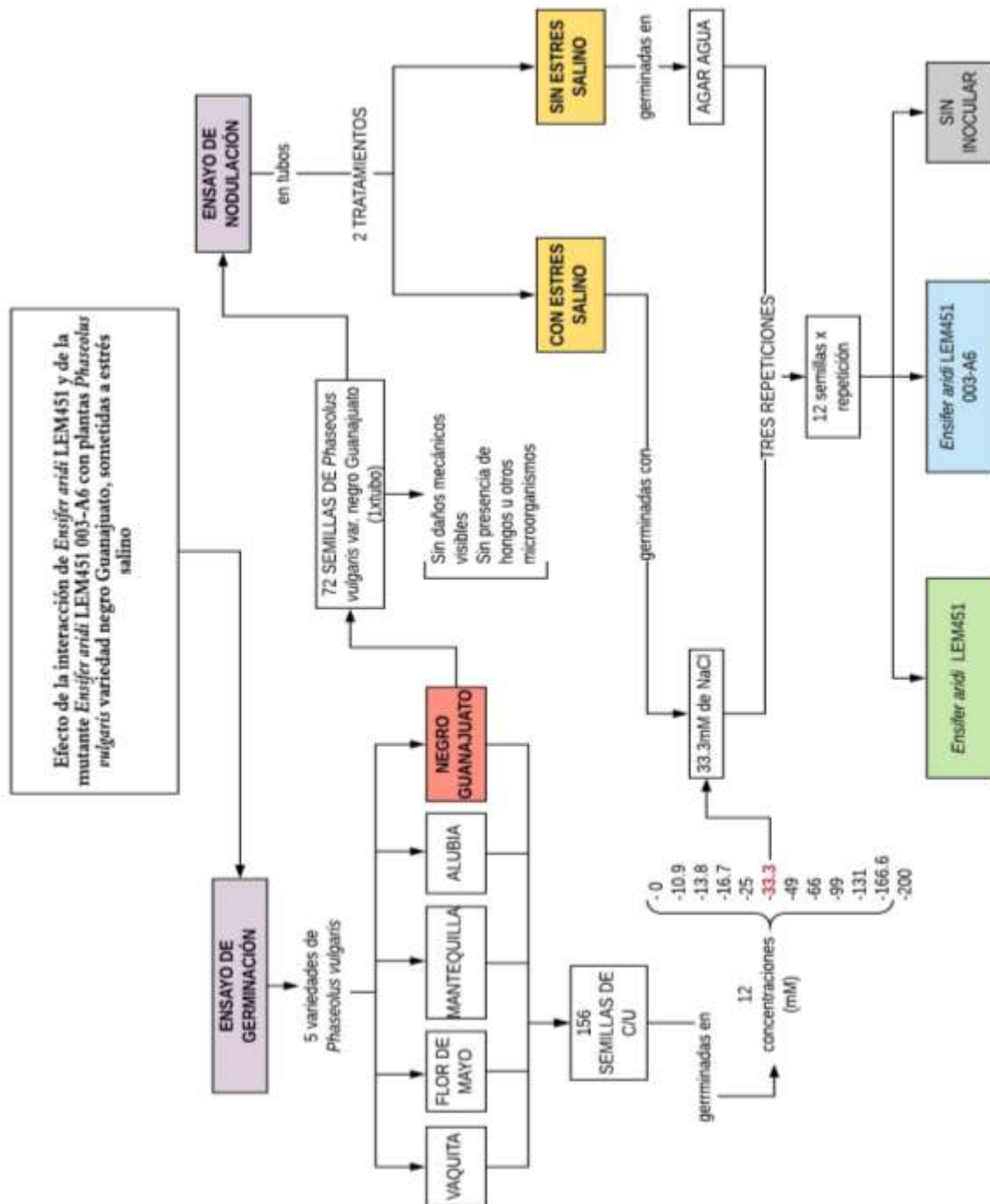


Figura 4. El experimento se dividió en dos ensayos: ensayo de germinación y ensayo de nodulación,

6.1.1 Material biológico, colección de cepas.

Las semillas utilizadas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) variedad negro Guanajuato, fueron donadas por el Dr. Jorge Acosta Gallegos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

Las cepas utilizadas, *Ensifer aridi* LEM451 la cual fue aislada por Cuéllar-Sánchez (2011) y la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 obtenida por Rocha-Bonilla (2016) fueron tomadas de la colección perteneciente al laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

6.1.2 Ensayo de germinación.

Para el ensayo único de germinación (sin réplicas) se utilizaron cinco variedades de frijol las cuales son: vaquita (T1), flor de mayo (T2), negro Guanajuato (T3), mantequilla (T4) y morelos (T5); de cada una de ellas se seleccionaron 156, dando un total de 780 semillas que no presentaran un daño mecánico visible y en los cuales no fuera notoria la presencia de hongos o algún otro microorganismo que pudiese estar dañando a la semilla. Posteriormente se desinfectaron, primeramente, lavándose con una solución jabonosa evitando dañar la semilla enjuagándose tantas veces fuese necesario hasta retirar los residuos de jabón, se sumergieron posteriormente durante tres minutos en una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 20% y se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril.

Tras haber realizado su desinfección, las semillas se colocaron en cajas con agar agua al 0.7%, cada una en diferentes concentraciones de NaCl: 0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131, 166.6 y 200 mM. Se colocaron 12 semillas por cada concentración y por cada variedad de semilla (figura 5).



Figura 5. Ensayo de germinación. En cada caja se colocaron doce semillas de cada variedad de *Phaseolus vulgaris* con agar agua en diferentes concentraciones Mm de NaCl (: 0, 10.9, 13.8, 16.7, 25, 33.3, 49, 66, 99, 131, 166.6 y 200 Mm)

6.1.3 Ensayo de nodulación.

Se utilizaron 150 semillas de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato las fueron seleccionadas y desinfectadas de la misma manera ya descrita en el ensayo de germinación. Una vez realizado el proceso se germinó la mitad de las semillas en placas con agar-agua al 0.7% y la otra mitad en placas con agar-agua al 0.7% adicionadas con 33 mM de NaCl, para la identificación de las semillas para tratamientos control y bajo estrés salino.

El ensayo de nodulación para las semillas control, consistió en utilizar tubos de vidrio esterilizados de 200x25 mm en los cuales se les agregó medio Jensen (aproximadamente 75 ml) para el mantenimiento de las plantas. Para el ensayo bajo estrés salino se utilizó el mismo número de tubos, adicionándoles medio Jensen con 33 mM de NaCl. En cada uno de los tubos se trasplantaron las semillas ya

germinadas anteriormente en cajas Petri, introduciendo al sistema únicamente la raíz, para que de esta forma quedara en contacto directo con la solución y el crecimiento de las plántulas no se viera afectada (figura 6).

El ensayo se distribuyó de la siguiente manera:

Tratamiento sin NaCl:

- **CSNaCl:** 12 plantas sin inocular (control negativo)
- **451SNaCl:** 12 plantas inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 (control positivo)
- **A6SNaCl:** 12 plantas inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 003-A6.

Tratamiento con NaCl:

- **CNaCl :** 12 plantas sin inocular (control negativo)
- **451NaCl:** 12 plantas inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 (control positivo)
- **A6NaCl:** 10 plantas inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 003-A6.



Figura 6: Ensayo de nodulación en tubos, la mitad de semillas germinadas distribuidas en tubos con medio Jensen y la otra mitad con medio Jensen y 33Mm de NaCl.

Las plantas se inocularon con un mililitro de cultivo bacteriano que se preparó de la siguiente manera: previamente se realizaron cultivos de las cepas *Ensifer aridi* LEM451 y de la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 en un medio de cultivo Triptona- Levadura (TY por sus siglas en inglés) H₂O a 28 °C en condiciones aerobias, a estos cultivos se le agregó, para la cepa silvestre kanamicina en 20 µg/ml y para la mutante 10 µg/ml de gentamicina. La composición del medio TY es Triptona (5g) y Extracto de levadura (3g) en 990 ml de H₂O. Los cultivos se emplearon como inóculos hasta que lograron alcanzar una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 620 nm, lo cual equivale aproximadamente a 8x10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC), esto se realizó usando un espectrofotómetro UV/Visible Jenway 6305.

Las plantas se mantuvieron a una temperatura aproximada de 25-28°C con ciclos de luz/oscuridad de 12 h cada uno durante aproximadamente 30 días.

6.2 Análisis de datos

6.2.1 Ensayo de germinación

Con el número de semillas germinadas en cada tratamiento se calcularon variables de respuesta con base en los trabajos de González-Zertuche y Orozco-Segovia (1996) y kader (2005). Solo se consideraron los resultados obtenidos en los ensayos hasta 5 días después de la siembra.

Las variables de respuesta medidas durante la germinación fueron el total de semillas germinadas (TSG), el porcentaje de germinación (PG), velocidad media de germinación (VMG) y el coeficiente de velocidad (CV).

6.2.1.1 Porcentaje final de germinación.

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

N= Numero de semillas germinadas

N_t= Total de semillas

6.2.1.2 Velocidad media de germinación.

Definida como la relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación.

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

Donde:

VMG: Velocidad media de germinación

n_i = número de semillas germinadas en el días

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

6.2.1.3 Coeficiente de velocidad de germinación.

Este índice se basa en el número de semillas germinadas inversamente relacionado con el tiempo y el número de semillas germinadas por día.

$$CV = \frac{\Sigma n_i}{\Sigma (n_i * t_i)} * 100$$

CV: Coeficiente de velocidad

n_i : Número de semillas germinadas por día

t_i : Número de días después de la siembra

Así como también se midieron la longitud (cm) de la parte aérea y de la raíz de cada semilla obtenida de las diferentes concentraciones salinas.

6.2.2 Ensayo de nodulación

6.2.2.1 Evaluación de los efectos de la salinidad.

Para llevar a cabo la evaluación se tomaron datos de los siguientes parámetros: longitud de parte aérea y raíz (cm), peso fresco (g) y peso seco (g) de ambas partes, así como la cuantificación de los nódulos que se llegaron a formar de cada una de

las variedades vaquita (T1), flor de mayo (T2), negro Guanajuato (T3), mantequilla (T4) y morelos (T5).

Transcurridas tres semanas (desde el trasplante y la inoculación de las plántulas), se procedió a extraer las plantas de los tubos de ensayo teniendo cuidado de no causarles un daño mecánico. Se midieron de cada una la longitud de raíz y de la parte aérea (distancia desde el cuello de la raíz hasta el ápice del tallo central). Se pesaron tanto el tallo como la raíz de cada planta en una balanza analítica para obtener el peso fresco. Posteriormente, éstas estructuras se deshidrataron y se pesaron nuevamente cuantificando el peso seco de cada una. Finalmente se contaron los nódulos formados en cada una de las raíces (figura 7). Los datos se analizaron mediante ANOVA y se estableció como estadísticamente significativo $p < 0.05$



Figura 7. Balanza analítica utilizada para los pesos frescos y secos de cada una de las plantas.

7. Resultados

7.1 Ensayo de germinación.

7.1.1 Porcentaje final de germinación (PFG)

Se cuantificaron el total de las semillas germinadas hasta el día cinco después de la siembra de cada variedad en las diferentes concentraciones salinas, con lo que se pudo medir el porcentaje final de germinación. Se observó que *Phaseolus vulgaris* var. Negro Guanajuato fue la variedad que más semillas germinadas tuvo (en nueve concentraciones de las doce, todas las semillas germinaron) teniendo que a partir de 131 mM de NaCl observa un decaimiento en el porcentaje de germinación, sin embargo, aún en la máxima concentración (200 mM) se obtuvo más del 50% de germinación. La variedad mantequilla es la segunda variedad que tuvo mayor porcentaje de germinación; la variedad que menos semillas germinadas tuvo, fue la variedad Morelos, pudiendo observar de esta manera su poca tolerancia a condiciones salinas (figura 8).

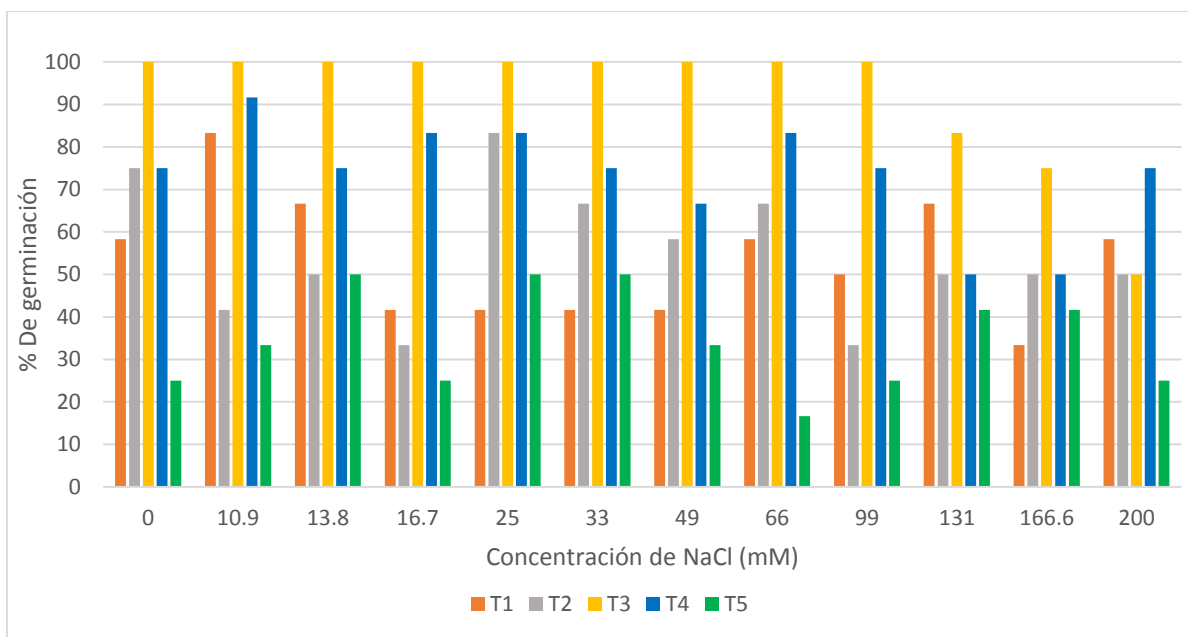


Figura 8. Porcentaje final de germinación (PFG) de *Phaseolus vulgaris* de las variedades vaquita (T1), flor de mayo (T2), negro Guanajuato (T3), mantequilla (T4) y morelos (T5) a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 10.9mM, 13.8mM, 16.7mM, 25mM, 33.3mM, 49mM, 66mM, 99mM, 131mM y 200mM).

7.1.2 Velocidad media de germinación (VMG)

La VMG se comportó similar al PFG, ya que al día uno, las semillas de la variedad negro Guanajuato, en todas las concentraciones fueron las que mayor porcentaje tuvieron en la velocidad media de germinación, aunque solamente hubo una emergencia de plántulas del 100% en la concentración 0 mM de NaCl, sin embargo, algo interesante se pudo apreciar en este tratamiento por que el porcentaje no disminuyó en forma exponencial conforme se aumentaba la concentración salina, si no que tuvo varios picos en los que se aprecia que el porcentaje de velocidad de germinación vuelve a aumentar al paso que las concentraciones lo hacen hasta decaer finalmente a partir de 133 mM. Las demás variedades no presentaron diferencia estadísticamente significativa ya que tuvieron una $p=$ utilizando un análisis ANOVA de una vía, las variedades una tendencia a disminuir la velocidad de germinación conforme las cantidades de concentración salina aumentaban como se puede observar en la figura 9.

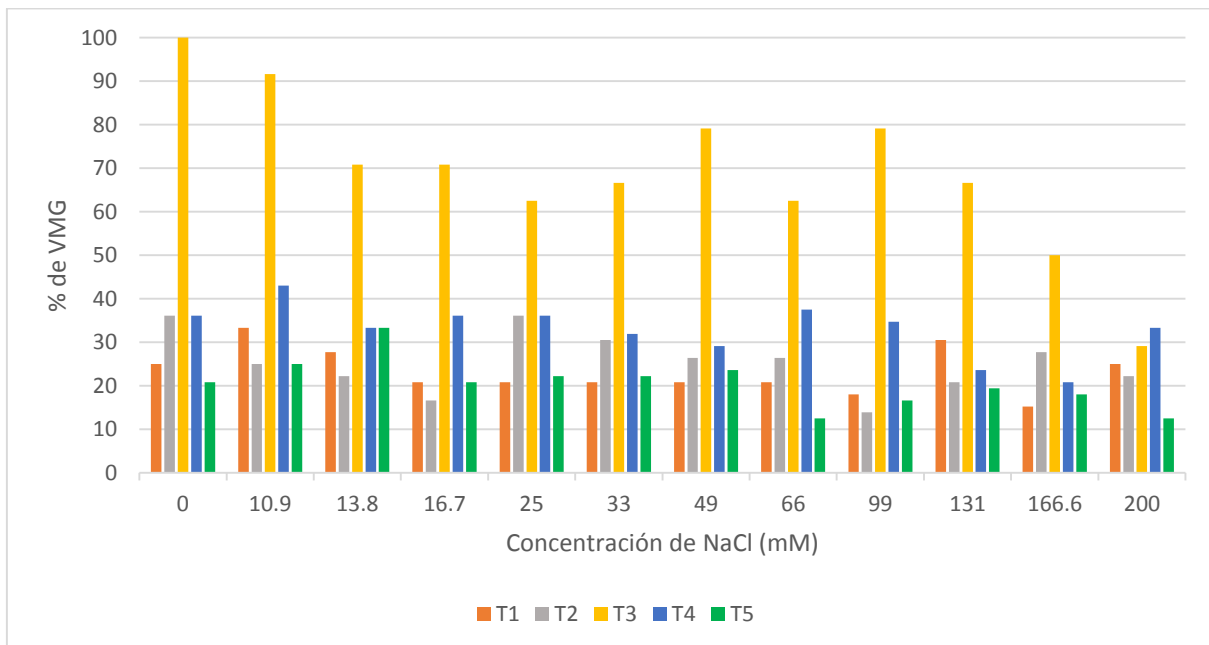


Figura 9. Porcentaje de la velocidad media de germinación (VMG) en el día 1, de *Phaseolus vulgaris* de las variedades vaquita (T1), flor de mayo (T2), negro Guanajuato (T3), mantequilla (T4) y morelos (T5) a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 10.9mM, 13.8mM, 16.7mM, 25mM, 33.3mM, 49mM, 66mM, 99mM, 131mM y 200mM).

7.1.3 Coeficiente de la velocidad de germinación (CV)

Se pudo observar que las variedades de *Phaseolus vulgaris* Negro Guanajuato y Morelos presentaron un mayor porcentaje en su coeficiente de velocidad, siendo negro Guanajuato la variedad que más semillas germinadas tuvo a los cinco días evaluados. T3 presenta una fluctuación en su coeficiente de velocidad mientras que T4 se mantiene constante a lo largo de las diferentes concentraciones salinas a las cuales fue sometido, sin embargo, estadísticamente no hay diferencias significativas (figura 10).

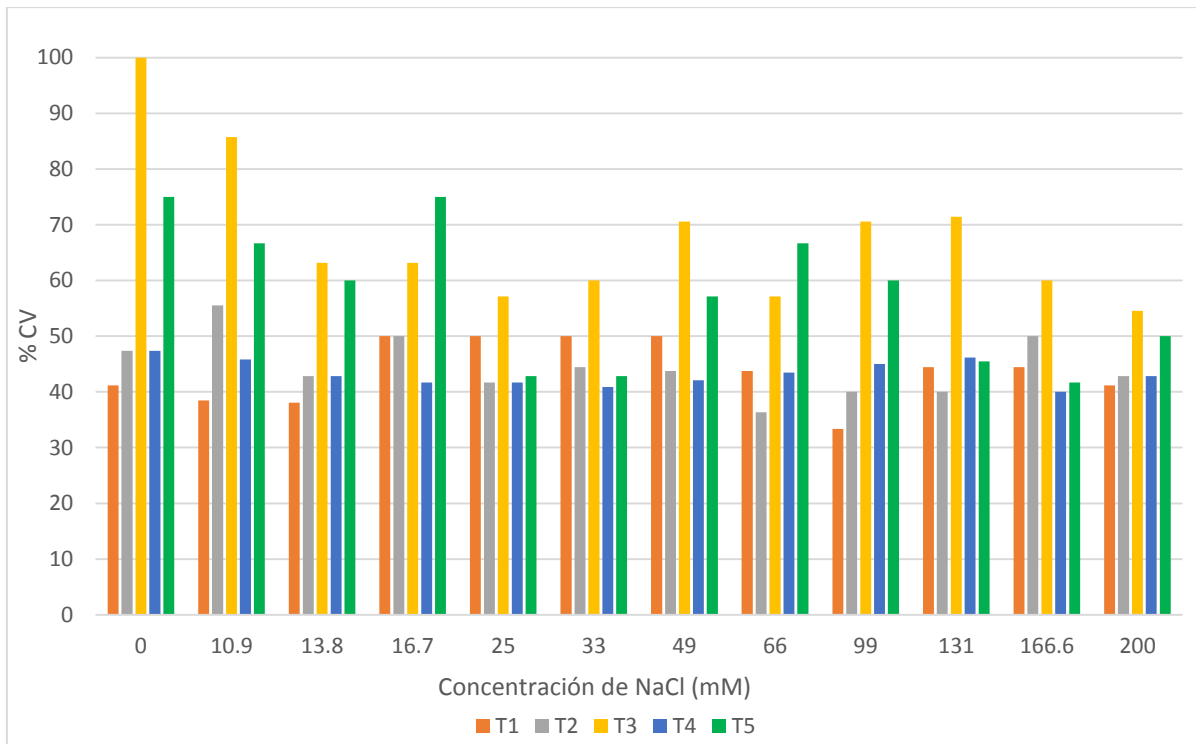


Figura 10. Porcentaje del Coeficiente de velocidad de *Phaseolus vulgaris* las variedades vaquita (T1), flor de mayo (T2), negro Guanajuato (T3), mantequilla (T4) y morelos (T5) a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 10.9mM, 13.8mM, 16.7mM, 25mM, 33.3mM, 49mM, 66mM, 99mM, 131mM y 200mM).

7.1.4 Parámetros

7.1.4.1 Longitud raíz

La variedad negro Guanajuato presentó una mayor longitud en sus raíces en cada una de las concentraciones de NaCl evaluadas (figura 11), seguida de la variedad Mantequilla. La variedad vaquita presentó longitudes cortas en cada una de las concentraciones a la que fue sometida. Las longitudes de las raíces fueron disminuyendo conforme se incrementaba la concentración salina, como se puede ver en la figura 12. A partir de 131mM de NaCl todas las variedades presentaron una disminución en su raíz, entre las variedades de frijol se obtuvo una $p=0.001$ indicando que estadísticamente encontramos diferencias entre cada una de ellas.

7.1.4.2 Longitud tallos

En los tallos las primeras tres concentraciones (0, 10.9 y 13.8), las variedades mantequilla y Morelos presentaron una mayor longitud, sin embargo, la segunda variedad mencionada tuvo un deceso en su tamaño conforme las concentraciones aumentaron. Las variedades mantequilla y negro Guanajuato mantuvieron longitudes mayores a las otras variedades en las diferentes concentraciones, la $p=0.033$ obtenida por ANOVA nos indica que hay diferencia entre estas variedades. (figura 13)



Figura 11. Longitud de las raíces de *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato conforme a las diferentes concentraciones salinas.

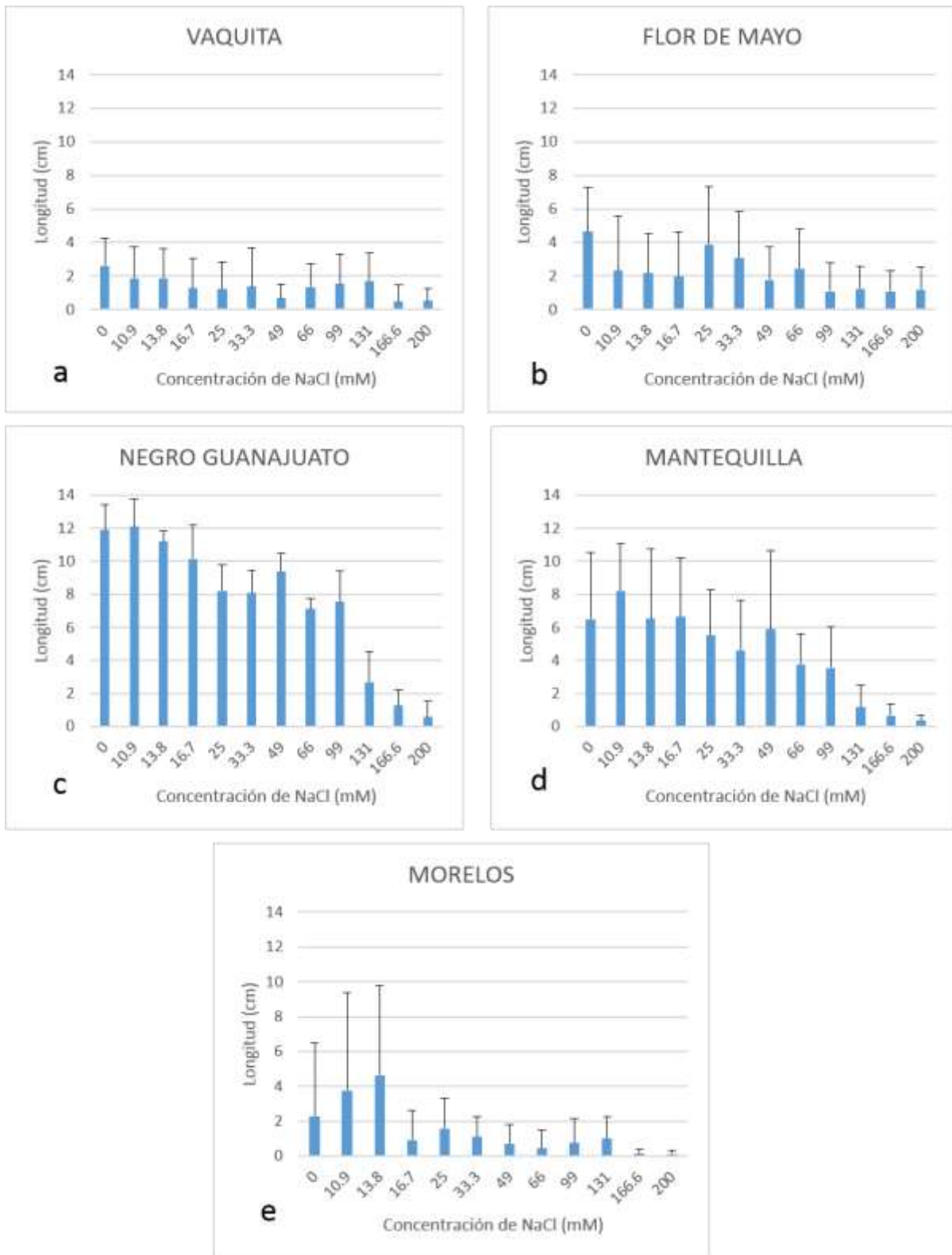


Figura 12. Longitud de las raíces de *Phaseolus vulgaris* variedades vaquita, flor de mayo, negro Guanajuato, mantequilla y morelos a diferentes concentraciones de NaCl (0mM, 10.9mM, 13.8mM, 16.7mM, 25mM, 33.3mM, 49mM, 66mM, 99mM, 131mM y 200mM).

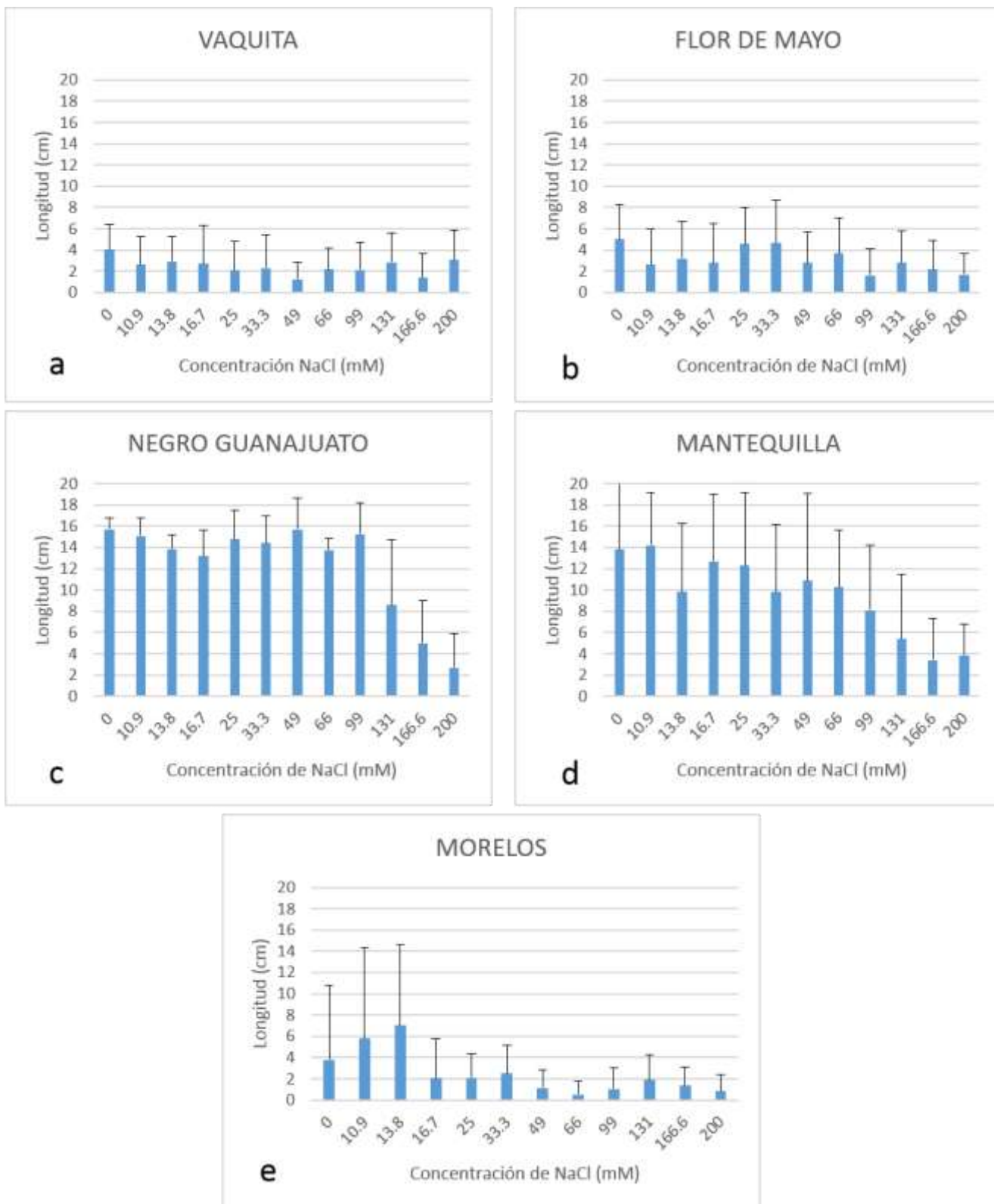


Figura 13. Longitud de tallos de *Phaseolus vulgaris* variedades vaquita, flor de mayo, negro Guanajuato, mantequilla y morelos a diferentes concentraciones de NaCl(0mM, 10.9mM, 13.8mM, 16.7mM, 25mM, 33.3mM, 49mM, 66mM, 99mM, 131mM y 200Mm).

7.2 Ensayo de nodulación

7.2.1 Parámetros

7.2.1.1 Longitud de tallo y raíz

El tratamiento con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 tuvo el mayor promedio en cuanto a la longitud de los tallos sin embargo su desviación estándar es muy grande. Se observa una tendencia a diferencia significativa entre la longitud de los tallos de las plantas de *Phaseolus vulgaris* que fueron inoculadas en comparación de aquellas que no fueron inoculadas, sin embargo, se puede observar una mayor longitud en las plantas que no presentaron estrés salino, estadísticamente tanto los tratamientos que presentaron un estrés salino como los que no presentan una $p=0.112$ y $p=0.248$, respectivamente. Las diferencias en los valores medios entre todos los grupos de tratamiento son mayores de lo que cabría esperar por azar; hay una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.001$). (figura 14).

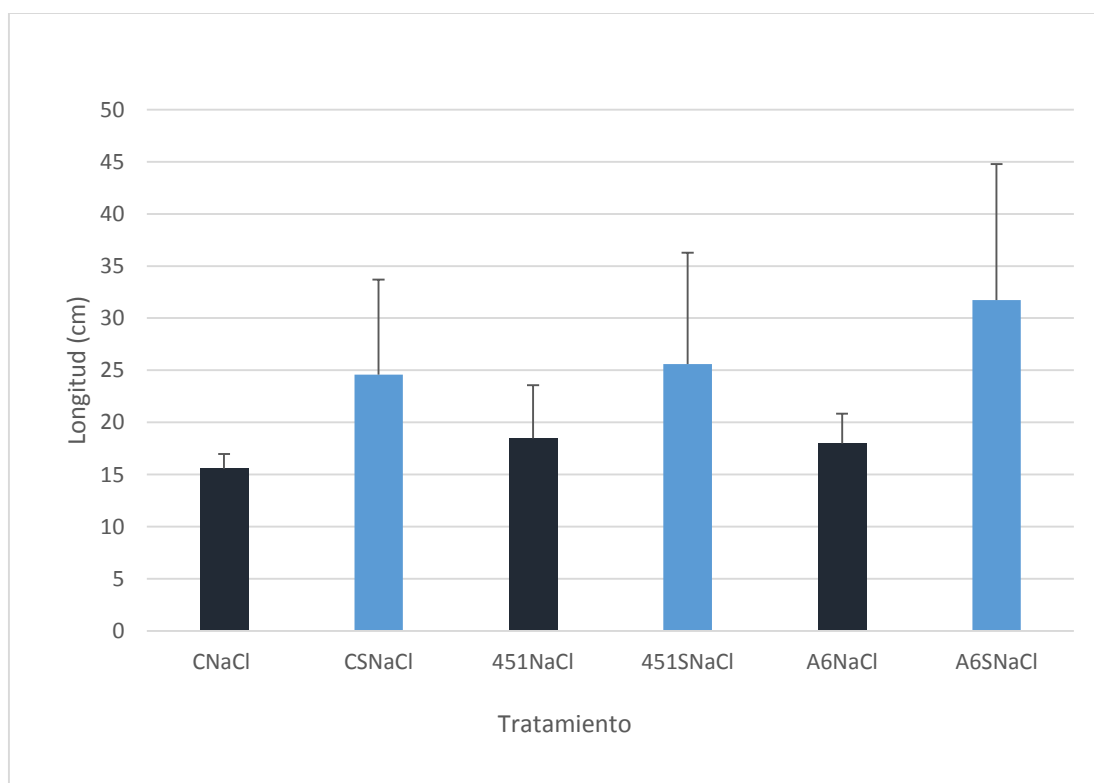


Figura 14. Longitud de los tallos de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en los diferentes tratamientos en condiciones con estrés y sin estrés salino.

Para las raíces el tratamiento con la cepa *Ensifer aridi* LEM451 sin estrés salino (451SNaCl) presentó la mayor longitud siendo 18 cm con una desviación estándar de 7.57 (figura 15). Podemos observar que en los tratamientos los cuales las plantas estuvieron bajo un estrés salino tienen una longitud menor aquellos que no presentaron dicho estrés, excepto en los tratamientos 451NaCl y 451SNaCl donde no se muestran diferencias significativas entre ellos ($p=0.532$). También se puede observar que en los tratamientos en los cuales las plantas fueron inoculadas con bacterias sin condiciones salinas presentan una mayor longitud a aquellas que no fueron inoculadas en condiciones salinas. Lo que nos indica que al inocular las plantas con la bacteria silvestre como mutante sin estrés salino hay mayor crecimiento en la raíz.

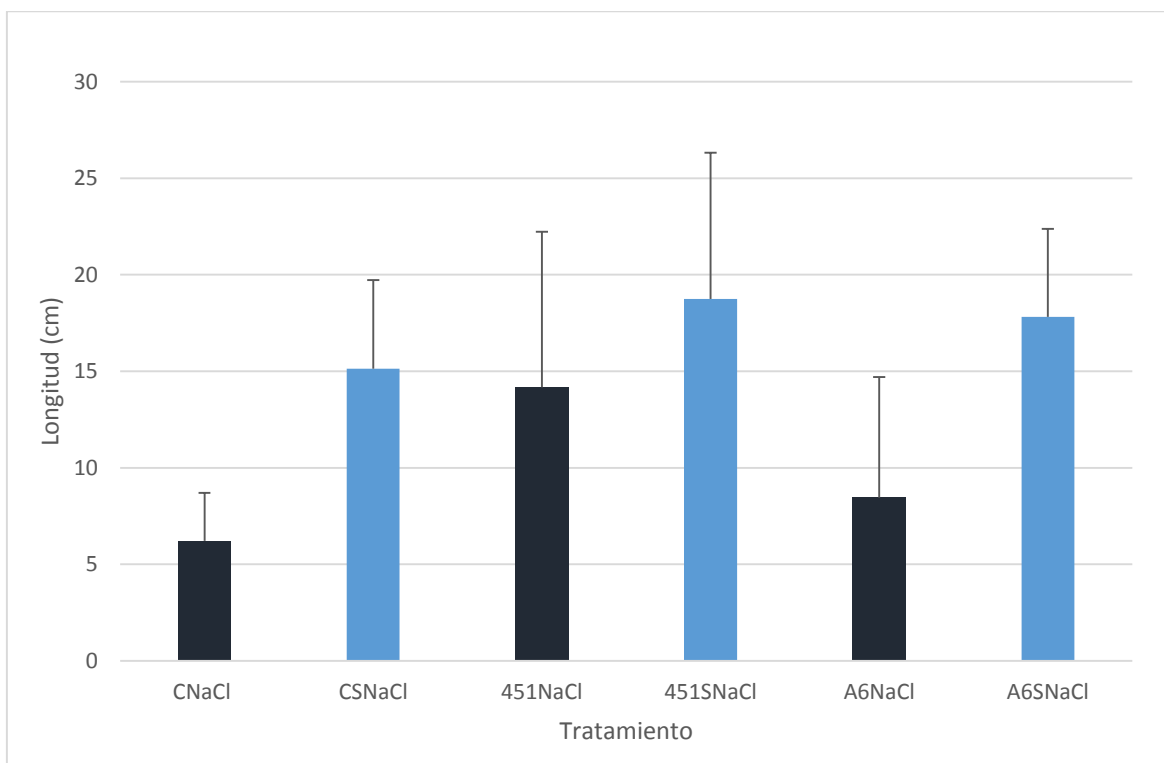


Figura 15. Longitud Raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en los diferentes tratamientos en condiciones con y sin estrés salino.

7.2.1.2 Peso fresco

7.2.1.2.1 Peso fresco tallo.

El tratamiento con la cepa *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 sin estrés salino (A6SNaCl) presenta un mayor promedio en su peso en comparación con los demás tratamientos, pero la planta que presentó el mayor peso fue una correspondiente al tratamiento *Ensifer aridi* LEM451 con estrés salino (451SNaCl). En este estudio se encontró que hay una diferencia significativa entre los tratamientos que no presentaron estrés salino con aquellos que lo tuvieron ($p=0.001$), sin embargo, si los comparamos con aquellos cuyas plantas no fueron inoculadas bajo condiciones de estrés salino CNaCl, solo el tratamiento A6NaCl no presenta diferencia significativa ($p=526$) como se puede observar en la figura 16.

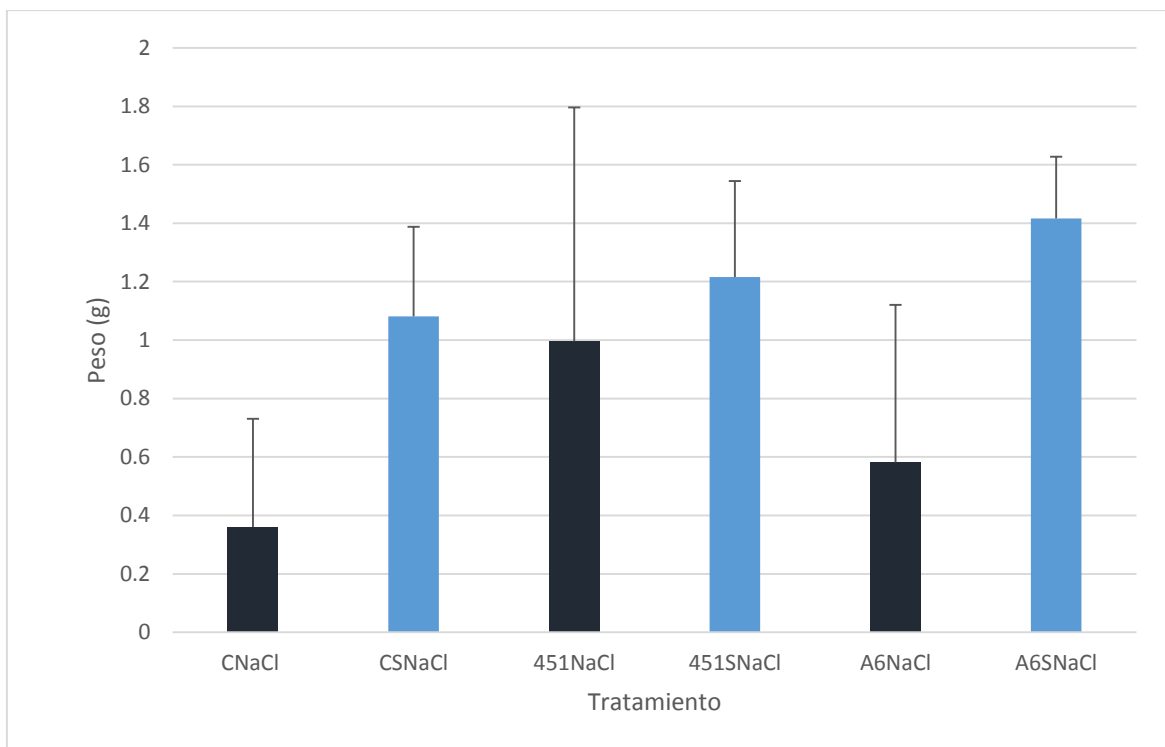


Figura 16. Peso fresco de los tallos de las raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en condiciones con y sin estrés salino.

7.2.1.2.2 Peso fresco raíz.

Las plantas *Phaseolus vulgaris* variedad negro Guanajuato sin estrés salino inoculadas con la cepa *Ensifer aridi* LEM451 (451SNaCl) tuvieron un promedio de 0.576 g con una desviación estándar de 0.32, mientras que el promedio para las plantas que fueron inoculadas con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 sin someterlas a un estrés salino (A6SNaCl), fue de 0.579 g con una desviación estándar de 0.26, siendo los promedios más altos, sin embargo, no hay diferencia significativa entre estos tratamientos ($p=0.087$). Se observó una diferencia significativa entre las plantas de los tratamientos con y sin estrés salino que fueron inoculados con la cepa mutante A6NaCl y A6SNaCl ($p=0.001$.), observándose que al inocular las plantas con la mutante hay un mayor crecimiento de las plantas si no se presenta estrés salino. (figura 17).

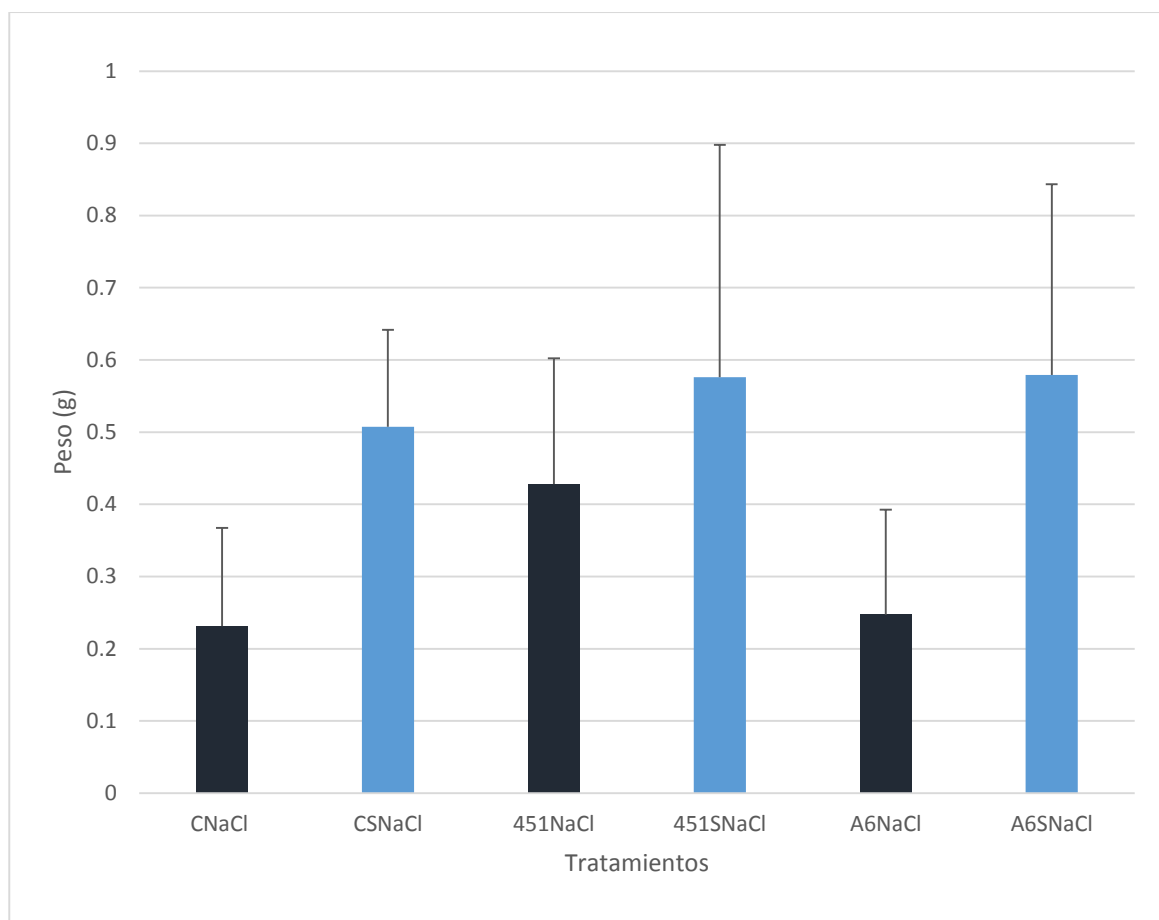


Figura 17. Peso fresco de las raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en condiciones con y sin estrés salino.

7.2.1.3 Peso seco

7.2.1.3.1 Peso seco tallo

En cuanto a los tallos los tratamientos sin estrés salino tendieron a tener un peso seco mayor, siendo la cepa *Ensifer aridi* LEM451 (451SNaCl) la mayor de éstas. Al inocular las plantas con la cepa *Ensifer aridi* LEM451 y la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 y manteniéndolas bajo estrés salino no se observa una diferencia entre ambas cepas ($p=0.838$), sin embargo al no presentar dicho estrés, las plantas con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 (A6SNaCl) tienen un mayor peso fresco, lo que nos indica que la mutante ayuda en el crecimiento de la planta. (figura 18).

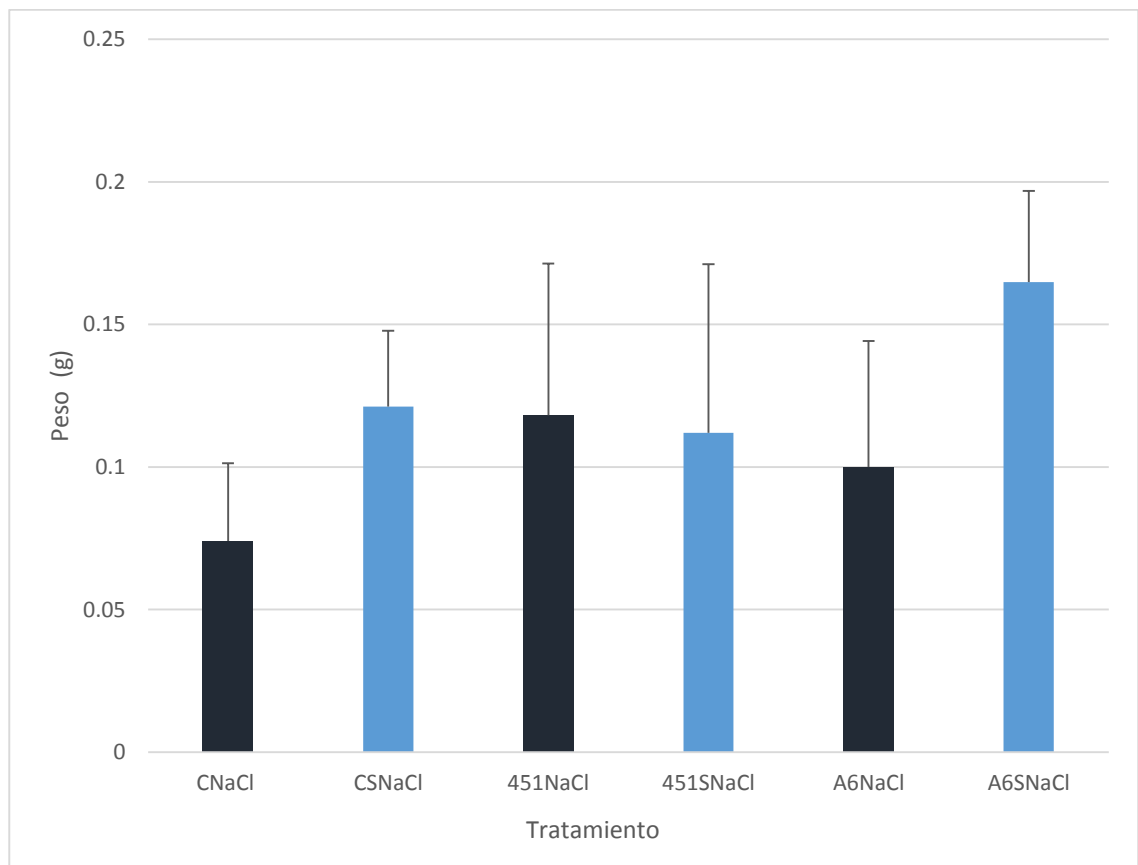


Figura 18. Peso seco de los tallos de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en condiciones con y sin estrés salino.

7.2.1.3.2 Peso seco raíz

Se puede observar que al inocular las plantas con *Ensifer aridi* LEM451 bajo condiciones de estrés salino su peso seco es mayor que en las plantas del tratamiento control ($p=0.009$). El tratamiento A6SNaCl presenta un mayor peso seco en la raíz que el tratamiento CSNaCl, presentando una diferencia significativa ($p=0,008$). El tratamiento con la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 sin estrés salino (A6SNaCl) presentó el mayor promedio de peso seco de todos los tratamientos como se puede observar en la figura 19.

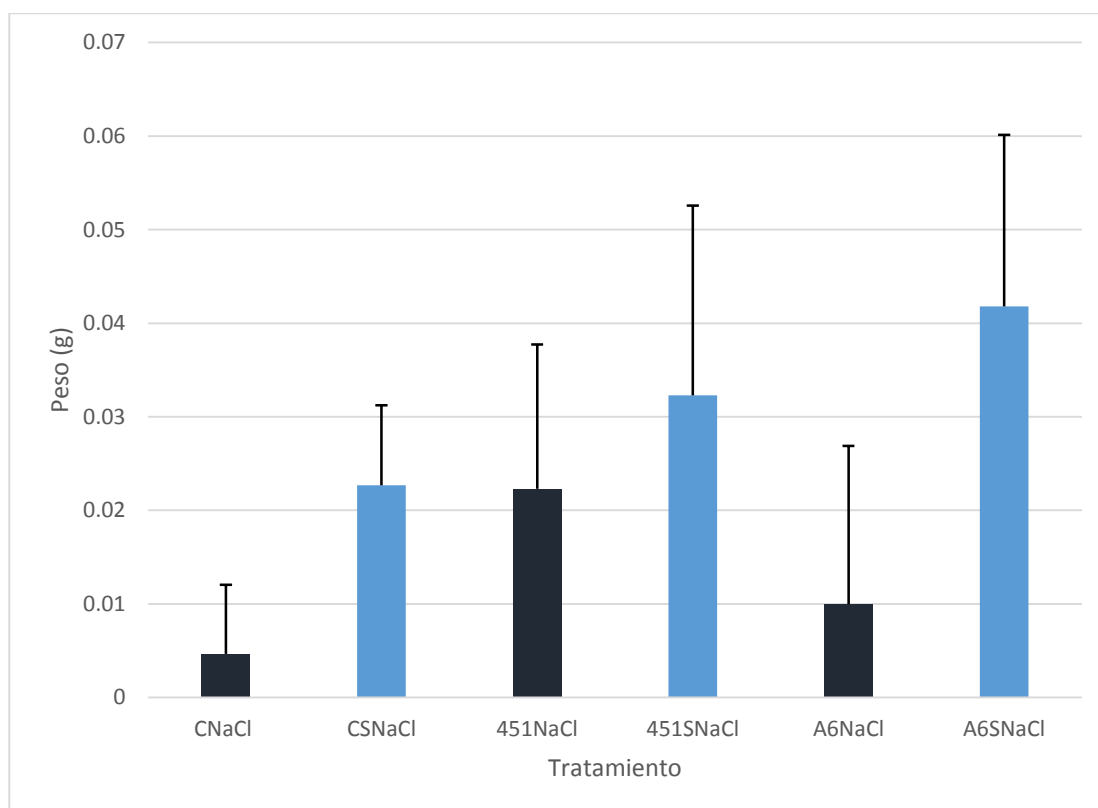


Figura 19. Peso seco de las raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* variedad Negro Guanajuato en condiciones con y sin estrés salino.

7.2.1.4 Nódulos

Las cepas *Ensifer aridi* 451 y la mutante *Ensifer aridi* 451 003-A6 produjeron nódulos en las raíces de las plantas (figura 21), sin embargo, el número de nódulos es mayor en los ensayos los cuales no presentaron estrés salino 451SNaCl y A6NaCl ($p < 0.050$). El tratamiento sin estrés salino con la cepa *Ensifer aridi* 451 fue el que presentó un mayor número de nódulos cuyo promedio es de 9.5 nódulos por tratamiento (figura 20). En la figura 22 se pueden observar los nódulos sin leghemoglobina obtenidos en las raíces de las plantas.

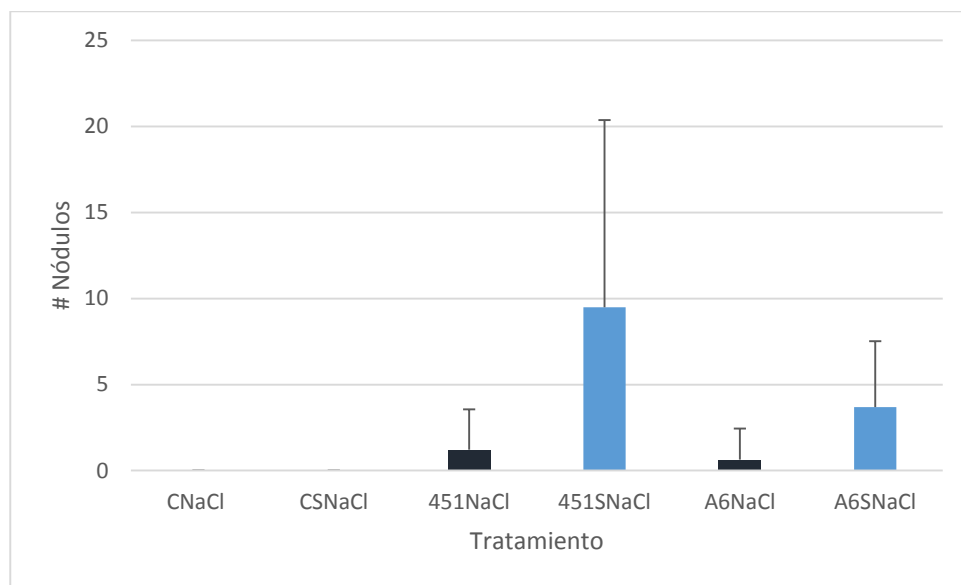


Figura 20. Número de nódulos, formados en las raíces de cuyas plantas fueron inoculadas con las cepas *Ensifer aridi* LEM451 y *Ensifer aridi* LEM451 003-A6



Figura 21 Nódulos de *Ensifer aridi* en raíces de plantas de *Phaseolus vulgaris* de coloración blanquecinos.



Figura 22. Nódulos blanquecinos de *Ensifer aridi*

Discusión

Como se ha reportado en la literatura (Cordazzo, 1999; Abud & Omran 2011; Naseri et al. 2012 entre otros), la salinidad es uno de los factores más importantes que limitan el crecimiento de la planta y retrasan la germinación de las semillas, así como el porcentaje final de germinación. El género *Phaseolus* L. incluye numerosas especies silvestres y cultivadas originarias del continente americano. Por su importancia alimentaria en el consumo humano, en este género principalmente se han evaluado los efectos que tiene la salinidad sobre la planta. De acuerdo con Wignarajah, (1990), *Phaseolus vulgaris* tolera niveles bajos de salinidad (48 mM NaCl), pero no mayores a 96 mM.

Tras el ensayo de germinación se reportó que todas las variedades tienen una cierta tolerancia, hasta 200Mm NaCl, viéndose afectadas en el tiempo de germinación. Sin embargo, como se puede observar en los resultados la variedad Negro Guanajuato fue la variedad más tolerante a la salinidad en lo relacionado con la capacidad de germinación de las semillas, tolerando hasta concentraciones de 131mM de NaCl, concentración a la cual se presenta una disminución en la capacidad de germinación, sin alcanzar el 50% de inhibición.

Pio et al. (2001) encontraron que los cambios anatómicos, aparentemente son respuestas morfogenéticas de la planta para contrarrestar los efectos negativos de las sales. Wignarajah, (1990) reporta que la salinidad afecta el crecimiento de los brotes más que el crecimiento de las raíces. Se pudo observar en la figura 11, que el crecimiento de las plántulas se ve afectado entre más alta sea la concentración de NaCl, justo como lo reportan Mena et al. (2015). En cuanto al efecto sobre las raíces, se observó que la longitud de las raíces y su peso disminuyen conforme se aumenta la concentración de sal. Can et al. (2014) reportaron en su investigación que la biomasa de la raíz disminuye a mayor concentración salina, lo cual, es explicado por dos causas, la primera por el ajuste osmótico que la planta tiene que realizar para tolerar al estrés salino y poder disponer del agua que requiere para sobrevivir; y la otra es que, en un medio salino, sustrato o suelo, donde se mantienen una humedad constante, mediante el riego o

por lluvia natural, las sales tienden a permanecer en las capas más profundas y por tanto las raíces disminuyen su longitud activando un mecanismo que les permite el brote de raíces adventicias.

Martinez et al. (2011) reportaron que las variables de crecimiento vegetativo tales como: masa seca, altura de la planta y area foliar se ven afectados severamente por la presencia de sales. Tal y como se pudo observar, la longitud de los tallos de las plantas que no fueron sometidas a estrés salino, fue mayor que aquellas que sí fueron sometidas a estrés; sin embargo, las plantas inoculadas tuvieron una mayor tolerancia a la salinidad, presentando una longitud de los tallos superior a las plantas control.

El género *Phaseolus* incluye algunas de las leguminosas más promiscuas, entre ellas *Phaseolus vulgaris* la cual es la que libera mayor cantidad y variedad de flavonoides, exudados tanto por la raíz como por la semilla (Morón et al., 2006), los principales endosimbiontes de *P. vulgaris* son *Rhizobium etli*, *R. phaseoli* y *R. tropici* (Ramírez-Bahena et al., 2008) aunque en Mexico se ha encontrado *Rhizobium gallicum* (Silva et al., 2003), en cuanto al género *Ensifer* (anteriormente denominado *Sinorhizobium*) contiene dos especies capaces de formar nódulos efectivos en alubia, *S. meliloti* y *S. fredii* (Mhamdi et al., 2002; (Zurdo-Piñeiro et al., 2009)

En el año 2017, Le Quéré et al. describen la especie *Ensifer aridi*, aislada de zonas aridas de America, Africa y Asia; y proponen que el estudio de esta permitiría nuevas oportunidades para su uso en tierras degradadas con altos problemas estrés como lo es la salinidad. En este estudio se reporta a *Ensifer aridi* como nodulante de *Phaseolus vulgaris*, encontrándose una interacción en la que dicha asociación proporciona a la planta una resistencia en concentraciones de NaCl de 33.3mM, lo cual también es observado por Rocha-Bonilla (2012), quien demomstró que la cepa *Ensifer aridi* LEM451 presenta una hipertolerancia a estrés salino, y que además fue capaz de mantener viables a plantas de *Phaseolus vulgaris* durante 19 días: sin embargo, dichas plántulas fueron conservadas en condiciones de alta salinidad (0.4, 0.6, 0.8 y 1.0M de NaCl) por un periodo de 28 días. Se pudo observar en este trabajo que la cepa mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 obtenida por

mutagénesis insercional en la cepa silvestre *Ensifer aridi* LEM451 por Rocha-Bonilla (2017), es tolerante a estrés salino.

Los nódulos que se formaron en las raíces de las plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con *Ensifer aridi* LEM451 y *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 presentaron coloración blanquecina, contrario a la coloración que se puede presentar normalmente en los nódulos fijadores de N₂. La coloración rojiza es dada por la presencia de leghemoglobina, la cual es una proteína monomérica cuya función es combinarse con el oxígeno, transportándolo hasta la membrana de los simbiosomas, manteniendo en su interior una concentración de O₂ libre de tan sólo 10-50 mM (Delgado et al., 1993). Para que tenga lugar la reducción de N₂, el ambiente del simbiosoma debe ser microaerobio, puesto que la nitrogenasa es muy sensible a la oxidación por O₂ (Zehr et al., 1993). La protección de la nitrogenasa frente al oxígeno la lleva a cabo la leghemoglobina, lo que deja a la pregunta de si hubo fijación de nitrógeno y a qué se debe la ausencia de la leghemoglobina. Aunque se tiene reportado que *Ensifer aridi* LEM451 establece una relación con *Phaseolus vulgaris*, no se tiene reporte que sea buena nodulante con dicha especie, además de que sea fijadora de nitrógeno, dado que no es su hospedera habitual (aislada de *Phaseolus filiformis*).

Conclusiones.

- Las variedades de *Phaseolus vulgaris* (Mantequilla, Negro, Flor de Mayo, Vaquita y Morelos) presentan poca variabilidad en su porcentaje de germinación siendo la variedad Negro Guanajuato más tolerante a condiciones salinas teniendo un 100% de emergencia en las primeras nueve concentraciones salinas.
- Entre más alta es la concentración de NaCl durante el proceso de germinación el porcentaje de germinación disminuye, velocidad media de germinación y el coeficiente de velocidad.
- *Ensifer aridi* LEM451 y la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 es nodulante de *Phaseolus vulgaris* reportándose por primera vez nódulos formados por *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 en plantas de *Phaseolus vulgaris*.
- Tanto la longitud de tallos y raíces se ve afectada por la salinidad, presentando una disminución en su tamaño, sin embargo, al inocular de *Ensifer aridi* LEM451 y la mutante *Ensifer aridi* LEM451 003-A6 en plantas *Phaseolus vulgaris*, se observa una resistencia a condiciones salinas, presentando una mayor longitud en sus tallos y raíces en comparación a aquellas las cuales no se inocularon; así como también se observa una alta supervivencia frente a NaCl.

9. Bibliografía

- Abrol, I., Yadar, J., & Massoud, F. (1988.). Salt affected soil and their management. FAO, Soils Bulletin, 11pp.
- Abud, H. Y., & Omran, A. (2011). Effect of soil salinity on germination and growth of *Cicer arietinum*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna sinensis*. Researches of the first international conference. 5pp.
- Aringhieri, R. (2010). The salt problem in soil: an overview. EQA – Environmental quality/Qualité de l'Environnement/Qualità ambientale, 5: 15-22.
- Arroyo, J. V. (1996). Fijación biológica de nitrógeno en frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas Rhizobium. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
- Bano, A., & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with Rhizobium and Pseudomonas. Biology and Fertility of Soils, 45: 405–413.
- Bazzigalupi, O., Pistorale, S., & Andrés, A. (2008). Tolerancia a la salinidad durante la germinación de semillas provenientes de poblaciones naturalizadas de agropiro alargado (*Thinopyrum ponticum*). Ciencia e Investigación Agraria, 277-285.
- Blanco, W. A., Pinzón Sandoval, E. H., & Torres, F. (2016). Evaluación del crecimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv ica cerniza, bajo estrés salino. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, 19: 87-95.
- Blaylock, A. (1994). Soil salinity, salt tolerance, and growth potencial of horticultural and landscape plants. University of Wyoming, 4pp.
- Brewbaker, J. L., Willers, K. B., & Macklin, B. (1990). Nitrogen fixing trees: validation and prioritization. Nitrogen Fixing Tree Research Reports, 8: 8-16.
- Bronwyn J., B., Vera-Estrella, R., Balderas, E., & Pantoja, O. (2007). Mecanismos de Tolerancia a la salinidad en plantas. En Biotecnología, Vol. 14: 263-272.

- Brücher, H. (1988). The wild ancestor of *Phaseolus vulgaris* in South America. En Genetic resources of bean species and varieties to common blight and bacterial wilt of beans. P. Gepts. Dordrecht, the Netherlands, 185-214.
- Can, Á., Ortega, H. M., Ramírez, L. G., Cruz, E., Flores, D., Sánchez, E. I., & Madueño, A. (2014). Germinación y crecimiento de plántulas de *Phaseolus vulgaris* L. en condiciones de salinidad. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 5(5): 753-763.
- Chen, W. X., Yan, G., & Li, J. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 38(4): 392-397.
- Cokkizgin, A. (2012). Salinity Stress in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Seed Germination. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 40(1): 177-182.
- Cordazzo, C. V. (1999). Effects of salinity on seed germination, seedling growth and survival of *Spartina ciliata* Brong. Acta Botánica Brasileña, 13(3): 317-322.
- Cuellar-Sánchez, A. (2011). Estudio poblacional de rhizobia simbiotes de frijol silvestre *Phaseolus* spp. Tesis de maestría. ICUAP-CICM.
- De Faria, S., De Lima, H., Franco, A., Mucci, E., & Sprent, J. (1987). New nodulating legume trees from south-east Brazil. Plant and Soil, 99: 347-354.
- Debouck, D. (1999). Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. SINGH, 25-52.
- Delgado, A., & Gama L., S. (2015). Diversidad y distribución de los frijoles silvestres en México. Revista digital universitaria, 16(2): 1-11
- 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.

- Delouche, J. C. (2002). Germinación, deterioro y vigor de semillas. Seed News. Obtenido de http://www.seednews.inf.br/espanhol/seed66/artigocapa66_esp.shtml
- Dimitri, M., & Orfila, E. (1985). Tratado de morfología y sistemática vegetal. Buenos Aires: Acme.
- Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., Msehli, S., Hopkins, J., Hérouart, D., & Frendo, P. (2012). The legume root nodule: from symbiotic nitrogen fixation to Senescence. En T. Nagata, Senescence. 8: 136-168
- FAO. (2014). El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Cambio climático y seguridad alimentaria.
- Fassbender, H., & Bornemisza, E. (1994). Química de suelos con énfasis en suelos de América latina (2da ed.). San José, Costa Rica.: Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. 398pp
- Feucher, F. (2000). Transferencia de tecnología para el rescate de suelos mediante la integración ganadera. Recuperación de suelos salinos agrícolas, mediante el establecimiento de praderas bajo riego y cultivos alternativos. Diez acciones propuestas de Bioingeniería. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, 1(3).
- Flores, A. (1993). Salinidad un nuevo concepto. Seminario Cuba – México. La Habana., 12pp.
- Flores, M. L. (2015). El cultivo de frijol en México. Revista digital universitaria, 16(2): 11pp.
- González-Zertuche, L., & Orozco-Segovia, A. (1996). Métodos de análisis lisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda Brachystachya*. Bol. Soc. Bot., 58: 15-30.
- Gutierrez Rodriguez, M., Escalante Estrasda, J., & Rodríguez Gonzáles, M. (2005). Canopy reflectance, stomatal conductance, and yield of *Phaseolus vulgaris*

- L. and *Phaseolus coccinues* L. under saline field conditions. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7(3): 491-494.
- Jamil, A., Riaz, S., Ashraf, M., & Foolad, M. (2011). Gene expression profiling of plants under salt stress. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30: 435-458.
- kader, M. (2005). A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data. *Journal & Proceedings of the Royal Society of New South Wales*, 138: 65–75.
- Kaymakanova, M. (2009). Effect of Salinity on Germination and Seed Physiology in Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23: 326-329.
- Le Quéré, A., Tak, N., Singh, H., Lavire, C., Meyer, T., Chapulliot, D., Rathi, S., Sakrouhi, I., Rocha, G., Rohmer, M., Severac, D., Filali-Maltouf, A. & Munive, J. A. (2017). Genomic characterization of *Ensifer aridi*, a proposed new species of nitrogen-fixing rhizobium recovered from Asian, African and American deserts. *BMC Genomics*. doi:10.1186/s12864-016-3447-y
- Levetin, E., & McMahon, L. (2008). Plants as a source of food. En *Plants and Society*. New York: McGraw-Hill Companies.
- Lewis, G., & Schrire, B. (2005). Leguminosae or Fabaceae? En B. Lewis, B. Schrire, & M. Lock, *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens.
- Limon, S. M. (1998). Respuestas morfofisiológicas, bioquímicas y de ultra estructura en frijol, al estrés de salinidad, altas temperaturas y sequía en etapa de plántula. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Long, S. R. (2001). Genes and Signals in the Rhizobium-Legume Symbiosis. *Plant Physiology* 125(1): 9-72 .
- Martinez-Villavicencio, N., López-Alonso, C. V., Basurto-Sotelo, M., & Pérez-Leal, R. (2011). Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*, 5(3).

- Masson Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., & Batut, J. (2009). Establishing nitrogenfixing symbiosis with legumes: how many Rhizobium recipes? *Trends in Microbiology*, 17(10): 458-466.
- Medina-Malagón, A. (2015). Diversidad molecular de cepas de *Ensifer* tolerantes a la salinidad, nodulantes de. Tesis de maestría. ICUAP-CICM.
- Mena, E., Leiva-Mora, M., Dilhara-Jayawardana, E., García, L., Veitía, N., Bermúdez Caraballos, I. & Cárdenas Ortíz, R. (2015). Effect of salt stress on seed germination and seedlings growth of *Phaseolus vulgaris* L. *Cultivos Tropicales*, 36(3): 71-74.
- Mhamdi, R., Laguerre, G., Aouani, M. E., Mars, M., & Amarger, N. (2002). Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 41(1): 77-84.
- Morón, B., Dardanelli, M. S., Sousa, C., & Megías, M. (2006). Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. En G. J. E. Bedmar, Fijación de Nitrógeno, fundamentos y aplicaciones. Granada: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). 60-171
- Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 239–250.
- Naseri, R., Emami, T., Mirzaei, A., & Soleymanifard, A. (2012). Effect of salinity (sodium chloride) on germination and seedling growth of barley (*Hordeum Vulgare* L.) cultivars. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 4(13): 911-917 .
- Oldeman, L., Hakkeling, R., & Sombroek, W. (1991). World map of the status of Human-induced soil degradation: An Explanatory note. Wageningen: International Soil Reference and Information Centre (ISRIC).
- Parsons, R., & Sunley, J. (2001). Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *J. Exp. Bot.* 52

- Pasternak, D. (1987). Salt tolerance and crop production a comprehensive approach. *Annual Review Phytopathology*, 25: 271-291.
- Pavuluri, S., Jambhekar, V., & Hommel, J. (2014). Kinetic approach for modeling salt precipitation in porous-media. ResearchGate.
- Perales, H., & Aguirre, J. (2008). Biodiversidad humanizada, en Capital natural de México. Conocimiento actual de la biodiversidad. *Conabio*, 1: 565-603.
- Pio, V., Horst B., C., Prieto M., H., Martinez H., C., & Mosquim, P. (2001). Physiological characteristics of grape-vine rootstock in saline solution. *Scientia Agricola*, 58(1): 39-143.
- Poole, E., & Lodwig, P. (2003). Metabolism of Rhizobium Bacteroids. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22(1): 37-78.
- Quinto, C., & Cárdenas , L. (2007). Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Biotecnología* , 14: 273-280
- Ramírez-Bahena, H. G.-F.-M. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889, *R. phaseoli* 1926AL and *R. trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *Rhizobium leguminosarum*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58: 2484-2490.
- Rocha-Bonilla, G. (2012). Identificación y caracterización de cepas *Sinorhizobium* del estado de Baja California Sur y de cepas de *Rhizobium* del estado de Tlaxcala con potencial biotecnológico, y aisladas del frijol silvestre (*Phaseolus spp.*). Tesis de Mastría, ICUAP-CICM.
- Rocha-Guzman , N., & Gallegos-Infante, J. (2007). Antioxidan activity in Cotyledon of Black and Yellow Common beans (*Phaseolus Vulgaris* L). *Journal Biology Science*, 2(1): 112-117.
- Romero-Arenas, O., Damián-Huato, M., Rivera-Tapia, J., Báez-Simón, A., Huerta-Lara, M., & Cabrera-Huerta , E. (2013). The Nutritional value of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and its importance for Feeding of Rural communities

- in Puebla-Mexico. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(8): 59-65.
- SIAP, Secretaría de información agroalimentaria y pesquera. (2016). Atlas Agroalimentario. México, D.F., 236pp.
- SIAP-SAGARPA. (2015). Estudio de gran visión y factibilidad económica y financiera para el desarrollo de infraestructura de almacenamiento y distribución de granos y oleaginosas para el mediano y largo plazo a nivel nacional.
- Silva, C., Vinuesa, P., Eguiarte, L., & Martínez-Romero, E. (2003). *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a traditionally managed milpa plot in Mexico: population genetics and biogeographic implications. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 884-893.
- ICSP Subcommittee on the taxonomy of *Rhizobium* and *Agrobacterium* diversity, (2012). Obtenido de <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/>
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., & Zhu, H. (2012). Symbiosis specificity in the legumerhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 14: 334–342.
- Wignarajah, K. (1990). Growth response of *Phaseolus vulgaris* to varying salinity regimes. *Environmental and Experimental Botany*, 30(2): 141-147.
- Willems, A., Fernandez-Lopez, M., Muñoz-Adelan, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., . . . Gillis, M. (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1207–1217.
- Yao, Z. Y., Kan, F., Wang, E., & Chen, W. (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of

Bradyrhizobium yuanmigense sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 52: 2219–2230.

Zahrán, H. (1991). Conditions for successful Rhizobium-legume symbiosis in saline environments. Biol Fertil Soils, 12: 73-80.

Zakhia, F., & De Lajudie, P. (2006). La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques — application à la caractérisation des bactéries nodulantes des légumineuses (BNL). Canadian Journal of Microbiology, 52(3): 169-181.

Zehr, J. P., Wyman, M., Miller, V., Duguay, L., & Capone, D. (1993). Modification of the Fe Protein of Nitrogenase in Natural Populations of *Trichodesmium thiebautii*. Applied and Environmental Microbiology, 59(3): 669-676.

Zurdo-Piñeiro, J. L.; Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaíno, N., Carrasco, J. A., Chamber, M., Palomares, A. & Mateos, P. (2009). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 784788.

11. Anexos

Medio Jensen libre de nitrógeno, (Somasegaran y Hoben, 1994) utilizado para mantener hidratadas a las plantas. Por cada L se utilizaron:

Solución P 10mL
K₂HPO₄ (20 g/L)
MgSO₄ (20 g/L)

Solución Q 10mL
NaCl (20 g/L)

Solución R 20mL
CaHPO₄ (50 g/L)

Solución D 10mL
FeCl₃•6H₂O (4 g/L)

Oligoelementos 1mL
H₃BO₃ (2.26 g)
MnSO₄•4H₂O (2.03 g/L)
ZnSO₄•7H₂O (0.22 g/L)
CuSO₄•5H₂O (0.08 g/L)
Na₂MoO₄•2H₂O (0.09 g/L)

Agua destilada cbp 949mL