

DIVERSIDAD GENÉTICA DE RHIZOBIA ASOCIADA A CUATRO
LEGUMINOSAS NATIVAS DEL NORESTE DE MÉXICO

MARCIA MARIBEL MARTÍNEZ SCOTT

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRONÓMICA



Universidad Autónoma Agraria "AntonioNarro"
Unidad Laguna - Subdirección de Postgrado
Torreón Coahuila, septiembre de 2001.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

**DIVERSIDAD GENÉTICA ASOCIADA A CUATRO LEGUMINOSAS NATIVAS
DEL NORESTE DE MÉXICO**

TESIS

POR

MARCIA MARIBEL MARTÍNEZ SCOTT

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRONÓMICA

COMITE PARTICULAR

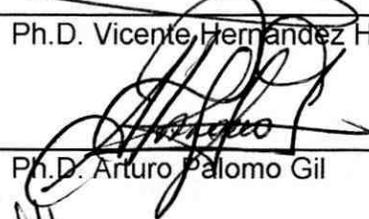
Asesor Principal


Dr. Jesús Vasquez Arroyo

Asesor:


Ph.D. Vicente Hernández Hernández

Asesor


Ph.D. Arturo Palomo Gil


Dr. Raúl Villegas Vizcaíno
Jefe del Departamento de Postgrado

Dr. Ramiro López Trujillo
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

A la **“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARÍA ANTONIO NARRO”** MI **“Alma Terra Mater”**, por permitirme obtener una carrera y una maestría de la cual se sienten orgullosos mi familia y amigos.

Al Ing. Elíseo Raygoza Sánchez. Por el apoyo brindado durante mi estancia en la universidad, por su amistad incondicional, lealtad y respeto, por ser una persona excelente a quien admiro.

Al Dr. Jesús Vásquez Arroyo. Gracias por tener el honor de ser su discípula, por la comprensión y paciencia que me mostró, por su amistad y por la oportunidad que me brindó de trabajar con él.

A El Dr. Vicente Hernández y al Dr. Arturo Palomo Gil. Por la cooperación que me extendieron, por sus consejos y por su amistad muchas gracias, les admiro.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero. Por haberme permitido trabajar a su lado en la unidad de ribotipificación del Centro de fijación sobre el nitrógeno, por la atención brindada y por el apoyo que me ofreció para terminar este proyecto de investigación.

Al los Ing. Juan Martínez Medina y el M.C. Gustavo Lara. Por el apoyo que siempre me brindaron, por su amistad y por todos los momentos que compartimos para la realización de este proyecto, también agradezco a **SIREYES**, por la oportunidad de trabajar en un proyecto muy importante y por las facilidades que me brindaron Gracias.

A mis amigos: Francisco Sánchez R., Graciela Armijo, Norma Rangel, Gaby, Esther, Rosalba, Aurelia Najera y Víctor R. Por la ayuda prestada para la realización de este trabajo y por su amistad gracias a todos ustedes.

A mis compañeros de maestría: Mario, Juan, Sergio, Norma, César y Lucero. Por hacer mi estancia más amena en la Universidad, por los momentos felices que compartimos, por la ayuda prestada así como la amistad brindada.

DEDICATORIAS

A Mi Padre Celestial

Te agradezco señor, por las cosas maravillosas que tengo en mi vida, por mis padres, hermanos, hijo, sobrinos y demás familiares, así como a mis verdaderos amigos; porque sin ellos y sin Ti, no tendría motivo alguno para mejorar como persona, porque la vida que me has dado es la más maravillosa que pueda tener ser humano, gracias por la salud que gozan todos los seres a quienes amo, gracias porque tengo todo para ser feliz, solamente te suplico que nos conserves y nos fortalezcas para seguir adelante; es mi oración.

A mis padres: Rafael y Ruth Idalia. Que siempre han confiado en mi, por la paciencia que han tenido, por el amor que me han dado, por sus consejos, por las noches que los he desvelado y por los sacrificios que han hecho para que hoy pueda tener un triunfo más en mi vida y que es de ellos, que Dios me los conserve siempre.

A mi hijo Aarón. Que eres mi mayor orgullo, te dedico mi tesis y mi vida, te agradezco la paciencia que tuviste, tantas veces cuando no estuve a tu lado, por la comprensión que siempre me demostrases, por las sonrisas que siempre me has regalado y por el amor que siempre me has brindado.

A mis hermanos: Esmeralda, Nelson y Adán. Porque de una manera u otra contribuyeron para que yo, hoy pudiera escalar un peldaño más, por la satisfacción que también ellos comparten y por los cuidados que le han brindado a mi hijo y a mis padres.

A mis sobrinitos Pamela, Daniel, Efrain y Sheyla así como mis cuñadas y cuñado. Por compartir su tiempo con mi hijo cuando yo estaba ausente, por brindarme apoyo, respeto y una felicidad incomparable.

A mis abuelitos Francisco, Lolita, Juanita y Manuel. Por el aliento que siempre me dieron para seguir adelante luchando y venciendo todos los obstáculos y por darme unos padres maravillosos.

COMPENDIO

DIVERSIDAD GENÉTICA DE RHIZOBIA ASOCIADA A CUATRO LEGUMINOSAS NATIVAS DEL NORESTE DE MÉXICO

MARCIA MARIBEL MARTÍNEZ SCOTT

Palabras claves: rhizobia, *Prosopis*, diversidad genética, movilidad electroforética de enzimas (MLEE), perfiles de plásmidos, ribotipificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En el noreste de México existe una gran diversidad de leguminosas nativas que son utilizadas en baja escala como forraje para el ganado caprino y en algunos casos para el ganado vacuno. La rhizobia es un grupo de bacterias del suelo que pueden formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas leguminosas de una manera específica, estos organismos pertenecen a cinco géneros del dominio Bacteria: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* en la subdivisión alfa de las *protobacterias*. El presente estudio consistió en determinar la diversidad genética de la rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas de la región noreste de México a través del empleo de la técnica de MLEE y perfiles de plásmidos por la técnica de Eckhardt modificada. Un total de 249 nódulos fueron obtenidos de plantas de

Prosopis glandulosa L. (74), *Acacia farnesiana* L (97), *A. Amentacea* L. (26) y *Leucaena leucocephala* (52). Cerca de la mitad de los nódulos fueron perdidos en el proceso de aislamiento (45%). 92 aislados fueron empleados para realizar el estudio de la diversidad genética mediante el estudio de seis enzimas: IDH, G6P, G2D, ALD, MDH Y PGM, se emplearon seis de las cepas de referencia *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN42^T), *R. tropici* II A (CFN-299^T), 73'F (*Sinorhizobium* spp. Por definir aislada de *Acacia farnesiana*) y 156'P (*Sinorhizobium* spp. Por definir aislado también de *Acacia*). Se confirma una amplia diversidad genética de la rhizobia asociada a leguminosas arbóreas del noreste de México (H=0.824) y una amplia diversidad de perfiles de plásmidos. Es probable que diferentes especies de rhizobia se encuentren asociadas a estas leguminosas.

ABSTRACT

Index Word: ribotyping, polymerase chain reaction, *Prosopis*, Multi Locus Enzyme Electrophoresis, plasmid profile.

In the Northeast of Mexico exists a great diversity of native leguminous that are used as forage for goats and in some cases for cows. Rhizobia are soil bacteria that can form nodules, in which they fix nitrogen, on leguminous plants in a host-specific way. The rhizobia belong to five genera of the domain bacteria: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* in the alpha subdivision of the protobacterium. The objective of the study was to assess the genetic diversity of rhizobia associated to four leguminous tree of the northeast of Mexico trough the MLEE and plasmid profile techniques. A total of 249 nodules were obtained from plants of *Prosopis glandulosa* (74), *Acacia farnesiana* L. (97), *A. amentacea* L. (26) and *Leucaena leucocephala* (52). Forty five percent of nodules was lost by the isolating technique. A total of 92 isolates were analyzed for the determinations of genetic diversity using six enzymes: IDH, G6P, G2D, ALD, MDH , PGM; *Bradyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN42^T), *R. Tropici* II A (CFN-299^T), 73F (*Mesorhizobium* spp.) and 156'P (unknown specie of *Sinorhizobium* spp. isolated from *Acacia* were used as reference strains).The results confirm that there is a great diversity of the rhizobia associated to leguminous trees in the notheast of México (H=0.824) there is also diversity of plasmid profiles . It probable that different species of rhizobia are associated to these leguminous.

INDICE

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.2. Objetivos	4
1.3. Hipótesis	4
1.4. Metas	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. El nitrógeno como elemento	5
2.2. Organismos fijadores de nitrógeno	7
2.3. Fijación biológica de nitrógeno	7
2.4. Descripción general de la simbiosis de rhizobia	9
2.4.1. La simbiosis	10
2.4.2. Penetración	11
2.4.3. El reconocimiento entre planta y rhizobia	11
2.4.4. La infección	11
2.4.5. Síntesis de la nitrogenasa	12
2.4.6. La Hidrogenasa	13
2.4.7. Genes nod	13
2.4.8. Regulación de la expresión de los genes simbióticos	14
2.5. Fijación de nitrógeno en regiones áridas	14

2.6. Importancia de las leguminosas	17
2.7. Ubicación taxonómica de las leguminosas	17
2.7.1. Descripción de “mezquite” (<i>Prosopis glandulosa</i>)	18
2.7.2. Descripción de “huizache” (<i>Acacia farnesiana</i>)	19
2.7.3. Descripción de “leucaena” (<i>Leucaena leucocephala</i>)	20
2.7.4. Descripción de “chaparro prieto” (<i>Acacia amentacea</i>)	22
2.8. Taxonomía de rhizobia	22
2.9. Diversidad genética de rhizobia	23
2.10. Especificidad al hospedero	25
2.11. Competencia entre cepas para la formación de nódulos	26
2.12. Metodologías para la caracterización de <i>Rhizobium</i>	28
2.12.1 Resistencia a antibióticos	28
2.12.2 Métodos Serológicos	29
2.12.3 Patrones de proteínas totales	30
2.12.4 Perfiles de plásmidos	31
2.12.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
2.12.6 Movilidad electroforética de enzimas (MLEE)	33
CAPITULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Descripción del área de trabajo	35
3.2. Ensayos de invernadero	35
3.2.1. Recolección de semilla de las especies a trabajar	35
3.2.2. Tratamiento de semillas	36
3.2.3. Establecimiento de macetas con las especies nativas	36
3.2.4. Preparación de la solución para inocular las macetas	37

3.3. Variables evaluadas	37
3.3.1 Porcentaje de emergencia de semilla	37
3.3.2. Numero y distribución de nódulos	38
3.3.3. Longitud y peso de la raíz	38
3.3.4. Análisis estadístico	38
3.4. Análisis de suelo	38
3.5. Obtención de nódulos	39
3.6. Obtención del número más probable (NMP) de rhizobia	39
3.7. Ensayos de campo	39
3.7.1. Obtención de nódulos en campo	39
3.7.2. Almacenaje de los nódulos	40
3.7.3. Esterilización de nódulos	40
3.8. Aislamiento de rhizobia	40
3.9. Inoculación de plantas	41
3.10. Caracterización de los aislados de rhizobia	42
3.10.1. Preparación de lisados rhizobiales para movilidad electroforética de enzima (MLEE)	42
3.10.2 Determinación de la diversidad genética	43
3.10.3. Aislamiento de ADN como templado para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	44
3.10.4. Cepas de referencia de <i>Rhizobium</i>	45
3.10.5. Definición de especie	45
3.10.6. Perfiles de plásmido	45

CAPITULO IV	47
RESULTADOS	
4.1. Ensayos de invernadero	47
Análisis de suelos	49
Obtención de nódulos de las plantas en invernadero	50
Número más probable de rizobia	54
4.2. Ensayos de campo	55
Recolección de nódulos en campo	55
Aislamiento de rizobia	57
Inoculación de plantas	61
Diversidad genética	78
Perfiles de plásmidos	73
Ribotipificación	73
CAPITULO V	79
CONCLUSIÓN	
CAPITULO VI	80
LITERATURA CITADA	

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Organismos fijadores de nitrógeno	8
Cuadro 2. Porcentaje de emergencia de leguminosas de la primera siembra	47
Cuadro 3. Porcentaje de emergencia segunda siembra.	48
Cuadro 4. Resultados físico-químico de los tres suelos de estudio de la Región Lagunera.	49
Cuadro 5. Promedio de nodulación presentada bajo condiciones de Invernadero	51
Cuadro 6. Obtención de NMP de Rhizobia g-1 de suelo de Tres sitios de a Región Lagunera	54
Cuadro 7. Recolección de nódulos en campo	56
Cuadro 8. Aislados obtenidos	58
Cuadro 9. Inoculación de plantas en solución de Fahraeus	60
Cuadro 10. Movilidad electroforética de Enzimas No. 1	62
Cuadro 11. Movilidad electroforética de Enzimas No. 2	64
Cuadro 12. Movilidad electroforética de Enzimas No. 3	66
Cuadro 13. Movilidad electroforética de Enzimas No. 4	68
Cuadro 14. Numero de Plásmidos encontrados para cada aislados	75
Cuadro 15. Patrón de ribotipificación presentado por la digestión enzimática.	76
Cuadro 16. Patrón de Ribotipificación 2.	77

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T) 63
- Figura 2. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), *S. meliloti*, *R. tropici* tipo B (CFN-299^T) *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T). 65
- Figura 3. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06). 67
- Figura 4. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06). 69

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La atmósfera contiene aproximadamente 10^{15} Tm de N_2 gaseoso; el ciclo del N, involucra la transformación de aproximadamente 3×10^9 Tm de N_2 al año. Sin embargo la transformación (e.g. fijación de N_2) no es exclusivamente biológica. Se estima que los relámpagos, contribuyen con un 10% del suministro mundial del N fijado. La producción de N fijado por los fertilizantes químicos contribuye con el 25% y los procesos biológicos lo hacen con un 60%. De manera global, el consumo de fertilizantes nitrogenados se incrementó de 8 a 17 kg ha^{-1} en tierras agrícolas en un período de 15 años (1973-1988). El crecimiento significativo del uso de fertilizantes nitrogenados ha ocurrido tanto en países en vías de desarrollo como del primer mundo. Se prevé que en el futuro se requerirá de una gran cantidad de estos compuestos, sin embargo, los precios de los mismos llegará a ser prohibitivo para los más necesitados (Zaharan, 1999).

Varios miembros de la familia de las leguminosas son de considerable importancia económica y ecológica, debido en parte a su capacidad para formar simbiosis y fijar nitrógeno con bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que son de los principales habitantes del suelo. De tal manera que el N suministrado por parte de la rhizobia a las leguminosas reemplaza la costosa fijación industrial de nitrógeno.

La familia de las leguminosas es una de las más grandes, agrupando unos 650 géneros y 18,000 especies a nivel mundial (Carranza y Villareal, 1997;). En el noreste de México existe una gran diversidad de leguminosas nativas que son utilizadas en baja escala como alimento para el ganado caprino y en algunos casos para el ganado vacuno. Entre las principales especies nativas se encuentra el "mezquite" (*Prosopis glandulosa* L.), el "huizache" (*Acacia farnesiana* L.), "chaparro prieto" (*A. amentacea* L.) y "leucaena" (*Leucaena leucocephala* L.) recientemente introducida y adaptada a las condiciones áridas. Esta área corresponde a una superficie de 4'189,718 hectáreas de las cuales el 24% es de riego; para esta superficie, se requieren 200 mil toneladas de nitrógeno al año para satisfacer las necesidades de los cultivos (Maldonado y Garza, 2000).

En el pasado, los estudios sobre la diversidad de rhizobia se han visto obstruidos por las dificultades metodológicas respecto al muestreo, identificación y métodos disponibles para llevar a cabo el seguimiento de dichos organismos y sin embargo se ha relacionado a éstos con una alta diversidad (Laguerre *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 1993). Se ha estimado que el número de especies bacterianas pudiera estar por encima de 110, 000 de las cuales únicamente una fracción de éstas han sido identificadas y aun solamente unas cuantas están siendo estudiadas o se encuentran en centros de colección.

La diversidad microbiana y el efecto que el hombre ejerce sobre ésta por la aplicación excesiva de fertilizantes nitrogenados, siembras de monocultivos, movimiento constante de suelo, etc., ha ocasionado que esta diversidad se vea afectada con una disminución considerable de rhizobios por gramo de suelo; por lo

tanto, se recomienda conocer y establecer medidas de control que se deberán seguir y/o implementar, evitando reducir la diversidad genética de la rhizobia.

Con base en las anteriores consideraciones el presente trabajo tiene como objetivo principal estimar la diversidad genética de las poblaciones nativas de rhizobia asociadas a cuatro leguminosas del Noreste de México mediante las técnica de movilidad electroforética de enzimas (MLEE) y perfiles de plásmidos.

1.1. Objetivo

Estimar la diversidad genética de las poblaciones nativas de rizobia asociadas a las leguminosas: "mezquite" *Prosopis glandulosa*, "huizache" *Acacia farnesiana*, "chaparro prieto" *A. amentacea* y "leucaena" *Leucaena leucocephala*, con uso agropecuario para el Noreste de México.

1.2. Hipótesis

Existe una gran diversidad genética de rizobia que puede ser aprovechada para la producción de inoculantes.

1.3. Metas

Establecimiento de un cepario de rizobia nativa asociado a leguminosas del Noreste de México.

Contar con al menos cuatro cepas potenciales para uso como inoculantes en ensayos de laboratorio y posteriormente de campo.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El nitrógeno como elemento

Según la teoría geoquímica, el nitrógeno que se encuentra ahora en la atmósfera se integró en sus orígenes en materia sólida de la tierra en forma de nitratos y compuestos amoniacales. Cuando la temperatura de la tierra se elevó, el nitrógeno fue expulsado a la atmósfera donde permaneció principalmente en forma de amoniaco. Como resultado de la fotosíntesis la atmósfera se enriqueció de oxígeno y el amoniaco se oxidó convirtiéndose en nitrógeno elemental (Stevenson, 1965).

En los países desarrollados, la agricultura es dependiente de los fertilizantes químicos y plaguicidas para alcanzar y mantener los altos rendimientos que son posibles para las variedades de cultivos modernos. Sin embargo, reciente documentación de los efectos adversos de estos químicos enfatizan la importancia de desarrollar nuevos métodos de producción que sean sustentables tanto en lo agronómico como lo económico (National Research Council, 1994).

El nitrógeno está presente en un 78% de la atmósfera terrestre, la cual contiene aproximadamente 10^{15} toneladas; lo anterior se debe a que el nitrógeno atmosférico está en forma molecular N_2 (dinitrógeno) es un gas inerte. El ciclo del nitrógeno involucra la transformación de algunas 3×10^9 toneladas de N_2 por año. Se estima que los relámpagos se encargan de fijar un 10% del nitrógeno en la atmósfera terrestre. La industria de fertilizantes también provee de cantidades. La producción mundial de nitrógeno fijado por los fertilizantes químicos representa alrededor del 25% de N_2 fijado

y aproximadamente el 60% se fija por los procesos biológicos. Globalmente el consumo de fertilizante en forma de nitrógeno se ha incrementado de 8 a 17 kg ha⁻¹. Los requerimientos de fertilizante nitrogenados probablemente se incrementen en un futuro cercano. Sin embargo, con la tecnología actual para la producción de fertilizantes y los métodos ineficientes empleados para la aplicación de los mismos, los costos económicos y ecológicos harán prohibitivos el uso de los fertilizantes (Zaharan, 1999).

Por más de 100 años, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) ha captado la atención de los científicos interesados en la nutrición mineral de la planta, y la fijación biológica de nitrógeno no ha sido ampliamente explotada en la práctica de la agricultura. Sin embargo la FBN puede proveer nitrógeno a la agricultura de una manera sustentable aprovechando el uso de los recursos renovables y manteniendo un equilibrio con el medio ambiente. El mayor interés en la ecología ha llamado la atención al hecho de que la fijación biológica de nitrógeno es ecológicamente benigna y esta es mayormente aprovechable, reduciendo el uso de combustibles fósiles y pudiendo ser provechosa en la reforestación y en la restauración de los recursos terrestres. La producción de fertilizantes no es solamente un desgaste de energía y dinero sino que también acarrea serios problemas de contaminación, principalmente en aguas subterráneas. La FBN sería de gran importancia debido a que el uso de fertilizantes nitrogenados en niveles inaceptables ocasiona que exista contaminación del agua (incrementando concentraciones de nitratos tóxicos en el agua empleada para beber) y la eutroficación de los lagos y los ríos, así como pérdidas de más del 50% por deslaves (Zaharan, 1999).

2.2. Organismos fijadores de nitrógeno

Las bacterias que inducen nódulos fijadores de nitrógeno en asociación con plantas leguminosas (Familia fabaceae) todas pertenecen a la subdivisión alfa de las protobacterias, pero representan al menos seis géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, y *Allorhizobium* (Velásquez *et al.*, 2001). En años recientes, los estudios de poblaciones nativas de rhizobia aislada de una variedad de hospederas naturales en todo el mundo, han revelado una considerable diversidad genética y han llevado a la descripción de dos nuevos géneros: *Azorhizobium* y *Allorhizobium*; así como varias especies nuevas de los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* (Lafay, y Burdon, 2001). Estos organismos, reducen el dinitrógeno a amonio por medio de la enzima nitrogenasa. La nitrogenasa es inactivada irreversiblemente por el oxígeno, y en los procesos de fijación de nitrógeno usa grandes cantidades de energía. La actividad de la nitrogenasa se determina mediante ensayo de reducción del acetileno, el cual es barato y sensible (Dunn, 1998).

Alrededor de 87 especies agrupadas en dos géneros del Dominio Archaea, 38 géneros de bacterias y 20 de cianobacterias pertenecientes al Dominio Bacteria que se han identificados como organismos diazotróficos, es decir que pueden fijar nitrógeno (Zaharan, 1999).

2.3. Fijación biológica de nitrógeno

La fijación biológica del nitrógeno, se define como el proceso de reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, realizada por un grupo de organismos procariotas (rhizobios) los cuales han evolucionado sus complejos sistemas enzimáticos para la reducción del N_2 a NH_4 ; estos microorganismos del suelo incluyen: los fijadores de nitrógeno de vida libre que generan nitrógeno para su propio uso (*Klebsiella*); los

asociativos que están cerca de la raíz (ej. *Azospirillum*); los simbióticos que fijan nitrógeno asociados a las plantas y proveen a éstas de nitrógeno a cambio de carbono y un hábitat (nódulo), y por último, los endosimbióticos (por vivir dentro del hospedero sin formar nódulos), como sería el caso de *Acetobacter diazotrophicus* en la caña de azúcar (Asir Jr. *et al.*, 2000). Esta variedad de microorganismos del suelo corresponde al grupo de bacterias Gram negativas que están simbióticamente asociadas con algunas especies de las familias Mimosaceae, Caesalpinaceae y Fabaceae, las cuales en México comprenden 84 géneros y ocho tribus (Perret *et al.*, 2000) y los actinomicetes así como la bacteria Gram positiva *Frankia* que se asocia con especies arbustivas y arbóreas de crecimiento rápido.

Cuadro 1. Organismos fijadores de nitrógeno

Organismos no simbióticos	Organismos simbióticos	Organismos endosimbióticos
<i>Azotobacter</i>	Rhizobium	<i>Acetobacter vinelandi</i>
<i>Clostridium</i>	(<i>R. etli</i> , <i>R. tropici</i> , <i>R. galegae</i> , <i>R. pueblae</i> ,	<i>A. diazotrophicus</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>R. leguminosarum</i> , <i>R. gallicum</i> , <i>R. giardinii</i> ,	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
<i>Rhodospirillum</i>	<i>R. mongolense</i> , <i>R. hainanense</i>)	<i>H. rubribalbicans</i>
Alga Verde-Azul	Sinorhizobium	
<i>Azospirillum</i>	(<i>S. meliloti</i> , <i>S. terangae</i> , <i>S. fredii</i> , <i>S. saheli</i> , <i>S. arboris</i> , <i>S. kostiense</i>	
	<i>S. medicae</i>)	
	Mesorhizobium	
	(<i>M. huakuii</i> , <i>M. loti</i> , <i>M. ciceri</i> , <i>M. mediterraneum</i> ,	
	<i>M. thianshanense</i> , <i>M. plurifarium</i>)	
	Bradyrhizobium	
	<i>B. japonicum</i> , <i>B. elkanii</i> , <i>B. liaoningense</i>	
	Azorhizobium	
	<i>A. caulinodans</i> , <i>A. rhizogenes</i>	

Modificado de Haukka, 1997.

El balance del ciclo del nitrógeno se encuentra a favor de la fijación, ya que es mayor que la desnitrificación. La fijación biológica de nitrógeno es una fuente eficiente de nitrógeno. El nitrógeno total terrestre suministrado por esta fijación gira alrededor de 139 a 175 millones de toneladas métricas de N; la asociación simbiótica de cultivos incluye del 25 al 30% (de 35 a 45 millones de Tm) y se cuenta con el 30% (45 millones de toneladas de N) de praderas permanentes (Zaharan, 1999).

La contribución en la fijación de nitrógeno no simbiótica es modesta, pero ha sido útil para estudiar la bioquímica del proceso. A las algas azul-verdes se les atribuye una fijación de hasta 90 kg por hectárea por año, pero para poder realizar la fijación en la superficie del suelo, necesitan de una temperatura de 27 a 35 °C y humedad constante, condición que solo se presenta naturalmente en contadas áreas del mundo (Quiroga, 1989).

Desde el punto de vista agrícola, la cantidad fijada de nitrógeno anualmente por bacterias no simbióticas es de 140 Tm (Sessitsch, 1997).

2.4. Descripción general de la simbiosis de rhizobia

La rhizobia comprende bacterias Gram negativas aerobias obligadas que pertenecen a la familia Rhizobiaceae. Estos microorganismos forman asociaciones simbióticas en leguminosas, líquenes y algunas plantas maderables. El sistema más importante para la agricultura es la simbiosis leguminosas-rhizobia: la fijación de N se lleva a cabo dentro de los nódulos después de la penetración de la rhizobia por la raíz (National Research Council, 1994). La simbiosis es inhibida si existe un exceso de nitrato o amonio en el suelo (Caballero y Martínez, 1999). Dentro de los nódulos las bacterias se transforman en bacteroides que son células más grandes de la rhizobia y llevan a cabo la fijación simbiótica de nitrógeno porque son capaces de formar la

enzima nitrogenasa que es responsable de la conversión del nitrógeno molecular en amonio. Debido a esta simbiosis, la planta recibe nitrógeno que puede utilizar por sí misma, mientras que las bacterias utilizan moléculas de carbono que les proporciona la planta (Fisher, 1994).

Existen muchos genes característicos de la simbiosis de *Rhizobium* como por ejemplo los genes *nod*, *nol*, *nif* y *fix*. Los nódulos eficientes, característicamente presentan un color rojizo debido a la presencia de una proteína llamada leghemoglobina. Después de la fase de fijación de nitrógeno, el color del nódulo llega a ser verde debido a la conversión de leghemoglobina en biliverdina. La leghemoglobina protege a la nitrogenasa de los altos niveles de oxígeno y evita la inactivación de ésta. Cada tipo de *Rhizobium* presenta cierta especificidad en aquellas plantas con las que es capaz de formar nódulos. Por ejemplo, *Bradyrhizobium japonicum* forma una simbiosis con *Glycine max*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con *Pisum sativum* o *Vicia faba*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium meliloti*) con *Medicago sativa* y *Azorhizobium caulinodans* con *Sesbania rostrata*. *A. caulinodans* es capaz de fijar nitrógeno también fuera de su planta hospedera (Güttfert, 1993).

Estudios previos sobre fertilización nitrogenada, indican que la presencia de alto contenido de N disminuye el tamaño, número y peso de los nódulos, así como la cantidad de nitrógeno atmosférico fijado (Caballero y Martínez, 1999; Vásquez-Arroyo, 1996).

2.4.1. La simbiosis. Las leguminosas tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno en forma de nitrato o amonio para la síntesis de compuestos nitrogenados como los aminoácidos. En la simbiosis con la rizobia, se forman nódulos en las raíces, en los cuales las bacterias simbióticas fijan el nitrógeno atmosférico que proporcionan a la planta. Por ello, las leguminosas pueden crecer en suelos que no tienen suficiente

nitrate o amonio para un desarrollo normal de la planta. Por lo que en lugar de abonos, pueden utilizarse los rizobios como inoculantes para mejorar el crecimiento de leguminosas. Por otro lado, las bacterias utilizan a la planta y de esta forma, ambos simbiosis tienen una ventaja en asociación (Long, 1989).

2.4.2. Penetración. En la penetración de *Rhizobium* por el pelo radical, parece haber un debilitamiento de la pared vegetal por acción de la poligalacturonidasa, inducido por la bacteria. El polisacárido extracelular que produce la bacteria es capaz de inducir la enzima, y dicha inducción está determinada genéticamente por ciertos plásmidos bacterianos. La infectividad podría estar también determinadas por lecitinas, proteínas vegetales capaces de aglutinar específicamente a *Rhizobium* o a su polisacárido (Dazzo y Hubbell, 1975)

2.4.3. El reconocimiento entre planta y rhizobia. Las raíces de plantas exudan compuestos orgánicos que inducen la expresión de genes rizobiales que son característicos para el comienzo de la simbiosis. Uno de esos factores son los flavonoides que producen una interacción con la proteína codificada por el gen *nodD*. La proteína NodD y las sustancias flavonoides forman parte del reconocimiento hospedero-específico, debido a que no todos los flavonoides pueden interactuar con una NodD de una especie bacteriana dada. Después, las proteínas codificadas por los genes *nod* catalizan la formación de los metabolitos *nod*. Esos son oligómeros de N-acetil glucosamina con algunas modificaciones químicas (Fisher, 1994).

2.4.4. La infección. Durante la penetración, y la simbiosis, las bacterias no quedan alojadas directamente dentro del citoplasma de las células de la planta hospedadora, sino que permanecen alojadas en "vesículas" rodeadas por una

membrana derivada de la membrana citoplasmática de la célula de la planta (Alquimia, 1991). Las bacterias invaden las plantas mediante el desarrollo de cordones de infección.

El canal de infección progresa en dirección del córtex radical, ramificándose y atravesando las células del vegetal, con cuyo núcleo parece establecer alguna relación. Simultáneamente se produce una multiplicación de las células del córtex, en especial aquellas que son poliploides, dando lugar a la aparición del nódulo (Cubero 1983). En un determinado momento, los cordones de infección detienen su crecimiento y descargan su contenido bacteriano en el interior de las células radicales. Generalmente, las bacterias quedan englobadas en membranas de la célula vegetal, formando vesículas en el interior del citoplasma. Las bacterias pueden multiplicarse en el interior de las vesículas, que a su vez pueden dividirse llenando las células. La invasión de las plantas se lleva a cabo por los pelos radicales. Las bacterias inducen un encurvamiento o cayado de esos pelos, mediante el contacto con la planta y la producción de metabolitos *nod*. Finalmente, las bacterias sufren una serie de cambios morfológicos y fisiológicos, transformándose en bacteroides. Las células bacterianas se agrandan y deforman tomando el aspecto de X, Y ó T, y experimentan cambios en sus enzimas respiratorias, adquiriendo la capacidad de fijar nitrógeno molecular por síntesis de nitrogenasa.

2.4.5. Síntesis de la nitrogenasa. La nitrogenasa es la enzima responsable de la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio en la simbiosis entre rhizobia y leguminosa. Se compone de las proteínas NifH, NifD y NifK (por duplicado). La mayoría de las nitrogenasas contienen un cofactor con Fe y Mo. Sin embargo, hay también nitrogenasas que carecen de Mo y contienen Fe por ejemplo. Para la reducción del nitrógeno, se transportan electrones de la reductasa de la dinitrogenasa a la

dinitrogenasa y finalmente al nitrógeno. El amonio formado durante la fijación del nitrógeno es proporcionado a la planta en forma de aminoácidos (Long, 1989).

2.4.6. La hidrogenasa. Esta proteína que no es sintetizada por todas las especies de la familia Rhizobiaceae, cataliza la reacción de oxígeno con el hidrógeno formado durante la fijación del nitrógeno. De esta forma, reduce la concentración del hidrógeno y del oxígeno dentro del nódulo. Existen especies de *Rhizobium* que tienen la posibilidad de utilizar la energía que resulta de esa reacción para formar TFA (Trifosfato de Adenosina) (Güttfert, 1993).

2.4.7. La hemoglobina. También aparece en el nódulo el pigmento rojo leghemoglobina, localizado fuera del bacteroide, pero próximo a la membrana que lo envuelve. La leghemoglobina es una proteína con hierro unido a un grupo hemo y cuya presencia guarda una estrecha relación con la intensidad de la fijación de nitrógeno, aunque no participe en ella. Parece que su misión es evitar que las tensiones altas de oxígeno inactiven a la nitrogenasa (Zapata y Danso, 1984).

Es una proteína que contiene una porción hemo. La subunidad hemina es formada por las bacteroides, mientras que la globina es formada por la planta. La leghemoglobina, es responsable del color rojo de los nódulos activos. Sirve para limitar la concentración de oxígeno dentro del nódulo. De esta forma, los bacteroides reciben suficiente oxígeno para sobrevivir y se evita que la nitrogenasa pueda ser inactivada por el oxígeno (Bauer, 1998).

2.4.7. Genes nod. Se diferencian en genes comunes de nodulación, *nodA*, *nodB* y *nodC*, y en genes *nod* que son específicos del hospedero. Existe un mecanismo de regulación de los genes de la fijación de nitrógeno con base en gen

nodD. El producto de éste interactúa con los flavonoides característicos producidos por la planta hospedera y por eso es responsable de la especificidad de la simbiosis. Debido a la interacción con los flavonoides, la proteína NodD activa la transcripción de genes. La expresión de estos genes es específica para la simbiosis (Bauer, 1998).

2.4.8. Regulación de la expresión de los genes simbióticos. Los sistema FixLJ, NifA y RpoN en *Sinorhizobium meliloti* tienen un mecanismo de regulación de expresión de genes con relación a la concentración de oxígeno. Las proteínas FixL y FixJ tienen un papel importante en esta regulación. FixL se autofosforila y es capaz de transferir el fosfato a FixJ. En caso de baja concentración de oxígeno, se aumenta la concentración de FixJ fosforilada dentro de la célula. La proteína FixJ fosforilada activa los genes NifA y otros genes. NifA es un regulador positivo de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno. RpoN es un factor sigma, necesario para la transcripción eficaz de genes simbióticos (Bauer, 1998).

2.5. Fijación de nitrógeno en regiones áridas

Alrededor de la tercera parte de la superficie terrestre comprende climas áridos y semiáridos. Los suelos de los desiertos se consideraban sin importancia económicamente, sin embargo durante tres décadas, la economía y la utilización de las tierras áridas emergieron como un elemento crítico improvisado para mantener el suplemento alimenticio del mundo. Las tierras áridas en Egipto representan alrededor del 97% del total del área del país. En las áreas desérticas prevalece un clima sumamente árido, con altas temperaturas, baja humedad relativa, alta evaporación, y lluvia escasa (1.4 a 5.3 mm/año). El desierto también comprende áreas salinas; las tierras salinas áridas y semiáridas de la superficie del mundo representan el 15%. (Zaharan, 1999).

A menudo la productividad de la planta en muchas regiones áridas se ve limitada por la baja fertilidad de la tierra; por consiguiente, el volumen de nutrimentos de la tierra debe ser considerado junto con la cantidad de humedad al seleccionar las plantas para el desierto. Uno de los tratamientos sugeridos para reconstruir la fertilidad de tierras del desierto está dado por la aplicación de una mezcla de sedimentos del Nilo (arcilla) y el estiércol orgánico; sin embargo, esta sugerencia fue considerada una solución impráctica para mejorar la fertilidad de las tierras del desierto, donde la gran cantidad de sedimentos requerida para la mejora de áreas grandes no estaba disponible. La corrección de aplicación deficiente de fertilizantes por medio de productos orgánicos (por ejemplo las aguas negras y los estiércoles orgánicos animales) es una estrategia que se ha adoptado en muchos países en años recientes. La aplicación de fertilizantes minerales, por ejemplo el fertilizante N, es una práctica común para mejorar la fertilidad de la tierra, en países desarrollados o en vías de desarrollo; sin embargo, existe preocupación por la contaminación de nitratos en el agua potable. No obstante, se sugiere que los fertilizantes nitrogenados sean utilizados para aumentar el N en tierras pobres o tierras del desierto para lograr rendimientos sustanciales de leguminosas cuando la fijación de N_2 sea incapaz de proveer N suficiente para obtener el máximo rendimiento. La aplicación de fertilizante N en las regiones áridas, sin embargo, debe perfeccionarse para reducir sus efectos marginales. La inclusión apropiada de nitrato en la fijación de N_2 en las legumbres tolerantes aumentará al máximo el rendimiento de cosechas y también reducirá las pérdidas de N por lixiviación (Zaharan, 1999).

La FBN es la principal forma de introducir N en los ecosistemas del desierto. Las plantas actinorrizas en simbiosis por ejemplo: *Frankia-Casuarina* funcionan muy bien en climas calientes, secos y salinos y fijan cantidades apreciables de N. Estas especies sobreviven también y forman simbiosis efectivas en temperaturas altas y baja

humedad del suelo. Una nueva simbiosis de *Frankia- Atriplex* fue recientemente descubierta; esta simbiosis es un mecanismo para fijar N₂ (Zaharan, 1999). La mayoría de las leguminosas son "hospederos específicos", es decir que sólo pueden ser noduladas por algunas cepas de rizobios. A su vez, para todos los géneros y en algunos casos, especies de leguminosas, existen cepas de rizobios que producen nodulación, pero que difieren en la cantidad de nitrógeno fijado (Anónimo, 1997).

Las variedades mejoradas para tierras áridas tienen mecanismos de resistencia a sequía que les permiten crecer y sobrevivir en las áreas con baja disponibilidad de humedad. De hecho, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es actualmente una de la más importante ya que modifica el sistema que puede tener el potencial para aumentar la entrada de N en las tierras áridas. Las plantas de las leguminosas incluyen especies adaptadas a las condiciones áridas. Por ejemplo se puede mencionar a *Medicago sativa*, *Arachis hypogaea*, *Cyamopsis tetragonoloba*, y especies de *Melilotus*; estas leguminosas contienen cepas adaptadas para condiciones prevalecientes en las regiones áridas. Además de la sequía, el número y peso de nódulos, así como la fijación de N₂ ha sido evidentemente reducida. Para lograr una simbiosis eficaz se requiere una leguminosa hospedera (ej. Rhizobia de *Prosopis*) en las tierras del desierto y regiones áridas (Jenkins, *et al.* 1987; 1989). Los rizobios eficaces sean competitivos y capaces de emigrar bajo las condiciones de ausencia de humedad. Ésta podría ser una manera económicamente factible de aumentar la producción de alfalfa (*Medicago sativa*) con relación a las limitaciones ambientales o disponibilidad del agua. La rhizobia que fueran más eficaces para la fijación de N₂, se seleccionarían de la leguminosa hospedera y serían aquéllas que crezcan rápidamente cuando la temperatura y condiciones de humedad no son favorables (Johnson *et al.*, 1981). Estas asociaciones podrían ser en plantas anuales o perennes (Zaharan, 1999).

2.6. Importancia de las leguminosas

EL Noreste de México, presenta una fisiografía de valles, sierras, bolsones, llanuras y lagunas. Las rocas sedimentarias y calizas son las más frecuentes. Los suelos son de gran diversidad prevaleciendo los xerosoles y yermosoles. El clima es semiárido en la mayor parte del territorio y templado en partes altas de las sierras. La vegetación dominante es matorrales, con algunos bosques y zacates en las sierras y presentando también vegetación alpina, subacuática y riparia. (Carranza y Villareal, 1997).

Las leguminosas presentan una de las familias más vastas del reino vegetal y uno de los pocos grupos cosmopolitas en su distribución. Agrupa unos 60 géneros y 18,000 especies a nivel mundial. En la República Mexicana las leguminosas ocupan un segundo lugar en la flora fanerogámica con, aproximadamente, 130 géneros y 1,800 especies. Las Leguminosas conjuntamente con las Poaceas, son los grupos de planta de mayor importancia económica en el mundo (Anónimo, 1998).

2.7. Ubicación taxonómica de las leguminosas

Las leguminosas son arboles, arbustos o hierbas, erectas, rastreras, trepadoras o volubles inermes (sin ningún tipo de espina o aguijón) o armados con estípulas o aguijones; estípulas persistentes o caedizas; hojas simples, pinnadas o bipinnadas alternas o raramente opuestas, solas o en fascículos; inflorescencia usualmente en racimos, espigas, cabezuelas o panículas, axilares o terminales; flores actinomorfas o cigomorfas, bisexuales (en ocasiones unisexuales); brácteas y bractéolas generalmente presentes; cáliz valvado (prefloración en la que en las distintas partes que constituyen la yema o botón floral se tocan por sus bordes sin que ninguna de ellas se coloque encima o debajo de la inmediata) o imbricado (con los márgenes

sobrepuestos), con cinco lóbulos fusionados en parte mínima, en algunos géneros cuatro lóbulos por la fusión de dos lóbulos libres (estambres unidos por los filamentos formando un solo conjunto), corola típicamente de cinco pétalos, estambres de 5-10 a numerosos, libres monodelfos o diadelfos, anteras versátiles o erectas con dehiscencia longitudinal o poricida; ovario súpero unicarpelar, unilocular, óvulos de uno a muchos; estilo y un estigma; fruto una legumbre (vaina), dehiscente o indehiscente de forma, tamaño y consistencia variables, semillas de una a numerosas, variando en forma y tamaño, casi o sin endospermo (Lanusse, 1997).

2.7.1. Descripción del mezquite (*Prosopis glandulosa*)

Familia: Fabaceae (Leguminosas) Subfamilia: Mimosoideas, Género *Prosopis*, muy antiguo con aproximadamente 45 especies en América del Sur, del Norte y Central, África y oeste de Asia. La mayoría se concentra en zonas áridas y secas de Sudamérica. Argentina es el centro de mayor diversidad, con veintisiete especies, de las cuales 8 son árboles, 11 son de carácter endémico y 27 son arbustos o plantas rastreras (Anónimo, 1997).

En el mundo, las especies arbóreas del género se encuentran desde el paralelo 38°S en Argentina y avanzan por una franja por el oeste en Chile, Bolivia, Perú, llegando hasta Centroamérica y el sur de Estados Unidos. También se encuentran especies abundantes en Paraguay y escasa presencia en el oeste de Uruguay y sur de Brasil. Existen especies autóctonas en la India, Pakistán y noroeste de África (Anónimo, 1997)

Corteza: pardo oscura, con fisuras profundas. A veces se ven manchas de un líquido oscuro (goma), que brota de las heridas. Ramas: sin espinas, o con muy pocas, flexibles, péndulas, de color oscuros. Inflorescencias y flores: flores pequeñas, perfumadas, reunidas en espigas cilíndricas amarillentas con tintes rojizos, péndulas

de 4-9 cm de largo por un cm de diámetro. Hojas: erectas, caducas, de color verde claro brillante durante la brotación primaveral, más oscuro y opaco en otoño. Bipinaticompuesta: del eje central, de 2-9 cm de largo, nacen de 1-2 (raramente tres) pares de ejes laterales, de entre 2 y 9 cm de longitud. De estos últimos nacen de 25-35 pares de hojas o folíolos de 3- 6 mm de longitud y 1-2 mm de ancho. La distancia entre los folíolos es menor que el ancho de los mismos. Fruto: vaina cilíndrica levemente comprimida, morada, de 7-18 cm de largo y un cm de ancho, carnosa, dulce, con artejos o "carocitos" rectangulares que encierran las semillas, de color marrón claro. Entre semilla y semilla la vaina se hace más angosta, tomando el conjunto un aspecto similar al de un collar de cuentas (Anónimo, 1997).

2.7.2. Descripción del huizache (*Acacia farnesiana*)

Familia Fabaceae, subfamilia: Mimosaceae, género *Acacia farnesiana* L. sinónimos: Mimosa, Nombre común: mimosa, Huizache, aroma. Lugar de origen: Incierto. Al parecer originaria de Sudamérica y hoy día difundida por todos los continentes. Etimología: Acacia, del griego akis =punta, aludiendo a las espinas de las especies de acacias africanas, ya que las australianas normalmente carecen de ellas. Farnesiana, alude a los jardines de Farnesio de Roma, de donde fue descrita.

Descripción: Árbol o arbusto muy ramificado desde la base que alcanza 3-5 m de altura. Tronco de corteza oscura y ramaje tortuoso en zigzag. Follaje semicaduco en ocasiones. Hojas bipinnadas, con dos espinas blancas y rectas de 2-3 cm de longitud en la base de las mismas. Cada hoja con 2-6 pares de pinas y éstas con 10-20 pares de folíolos o pínulas de 3-8 mm de longitud, linear-oblongas, verdes, con el ápice obtuso o ligeramente agudo. Flores en glomérulos axilares dispuestos en grupos de 2-6 cabezuelas, de color amarillo dorado, fragantes, de 1-1.5 cm de diámetro. Pedúnculos pubescentes de 1.5-2 cm de longitud. Florece de enero a mayo. Legumbre

indehiscente, cilíndrico-fusiforme, derecha o algo curvada, de color negrozco, de unos 5-9 cm de longitud. Cada fruto con 8-15 semillas insertas en una pulpa blanca y dispuestas de manera oblicua en el mismo. Se reproduce por semillas. Especie muy resistente a las condiciones adversas de suelo y humedad. Ideal para formar setos vivos impenetrables por sus espinas. Se utiliza su flor en perfumería. Suele cultivarse como seto vivo en zonas de campo. La acacia es una especie arbórea dominante que crece en suelos áridos y sitios secos inadecuados para los cultivos. Esta especie estabiliza suelos arenosos y erosionados, proporcionando sombra, forraje, leña, carbón de leña y goma. El *Rhizobium* que infecta acacia, es promiscuo para la infección, puesto que se ha encontrado que la nodulación puede darse por bacterias de crecimiento rápido (*Rhizobium*) como de crecimiento lento (*Bradyrhizobium*), pero específico en su acción porque su asociación es efectiva con una determinada especie de planta (Alarcón *et al.*, 1997).

2.7.3. Descripción de *Leucaena* (*Leucaena leucocephala*)

Familia Fabaceae, subfamilia: Mimosaceae, Género *Leucaena leucocephala*. Es un árbol versátil fijador de nitrógeno; esta leguminosa de las tierras bajas tropicales americanas circundó el globo hace cuatro siglos. Originaria de América La *Leucaena leucocephala* (Lam.) estaba ampliamente difundida en México y Centro América al momento de la llegada de los españoles en 1520. Crece en diversos países de América Central y del Sur, habiendo sido introducida en las islas del Caribe, Hawaii, Australia, India, Indonesia, Malasia, Papua Nueva Guinea y otros países del sudoeste de Asia. Introducida en Africa en 1950 (Anónimo, 1997).

Se desarrolla en regiones con precipitaciones entre 600 y 1,700 mm por año; sin embargo, puede ser encontrada en regiones con precipitaciones en torno a 250 mm. Resiste a períodos de sequía superiores a 8 meses, y déficit hídrico anual de

hasta 870 mm. Se restringe a los trópicos y subtrópicos, con temperaturas entre 10 y 40°C. Tolera parcialmente suelos salinos, desarrollándose en suelos bien drenados con pH variando entre 5.5 y 8.5. No presenta buen desarrollo en suelos que contienen alta cantidad de aluminio. Necesita calcio, fósforo, azufre, zinc, boro y molibdeno para un buen desarrollo. Es recuperadora de terrenos degradados (Anónimo, 1997). Es un arbusto siempre verde o árbol de 5-20 m de altura según la variedad. Posee hojas bipinnadas de 15-20 cm de largo, con 4-10 pares de pinas, cada una, con 5-20 pares de folíolos; folíolos con 7-15 mm de largo y 3-4 mm de ancho. Numerosas flores blancas se agrupan en capítulo globular de 1.5-3.0 cm de diámetro, siendo de amplia autopolinización. Los frutos son vainas, planas, de 12-18 cm de largo y 1.5-2.0 cm de ancho, conteniendo 15 a 30 semillas. Semillas elípticas, achatadas, brillantes, de coloración café, con 6-8 mm de largo y 3-4 mm de ancho. Las especies varían ampliamente de pequeños arbustos a hermosos árboles (20 m y 40 cm). Las hojas tienen de 15-20 cm de largo y son compuestas bipinnadamente. Las flores son blancas y en mazos de cerca de 150 flores. Es completamente autofértil y rara vez se cruza, lo que lo hace muy semiloso, con 4-10 vainas por ramo. Las vainas color café cuelgan verticalmente con cerca de 15 semillas por vaina. Hay de 10,000 a 20,000 semillas por kilogramo. Se utiliza para el enriquecimiento y mejoramiento del suelo, sombra para cultivos, control de erosión, alimentación animal y producción de energía. También se usa en diversos sistemas agrícolas como abono verde, alterando las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, por el aumento de la disponibilidad de nitrógeno para los cultivos y el incremento de la materia orgánica. El sistema radical desarrolla simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan hasta 400 kg/ha/año de nitrógeno. Se asocian también a hongos (micorrizas). En la alimentación animal, frutos, follaje y ramas delgadas verdes son utilizados en la dieta de bovinos, caprinos, porcinos y otros animales domésticos. La cantidad de proteína bruta en las

hojas es de 15.6%. Cuando es suministrada por sobre 20-30% del total de la dieta animal puede causar problemas, en función de la presencia de mimosina (Anónimo, 1998).

2.7.4. Descripción de “chaparro prieto” (*Acacia amentacea*)

Esta es una leguminosa perteneciente a la Familia Fabaceae, Subfamilia: Mimosaceae, Género *Acacia*; es un arbusto o arbolillo de 3-4.5 metros de altura; espinoso, con las espinas hasta de 5 cm de longitud; las hojas son bipinnadas con las hojuelas oblongas de 1 cm de longitud; las flores son de color amarillo, de aroma agradable, con numerosos estambres; el fruto es una vaina de 3 a 4 mm de ancho, comprimida; se le atribuyen efectos curativos en el tratamiento de parásitos intestinales. Esta es una leguminosa de gran necesidad de consumo de agua por lo que requiere de 500 mm de lluvia al año para poderse desarrollar. Se distribuye en los estados de Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí. Su centro de origen se cree que es de Brasil (Martínez, 1979).

2.8. Taxonomía de rhizobia

Se trata de una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, de dimensiones medias, normalmente 1-2 x 0.5 micras, y móvil por la presencia de flagelos peritricos o polares. Carece totalmente de formas especiales de resistencia, como esporas o quistes, aunque se ha citado la posibilidad de formar cápsulas y la existencia de ciertas formas de resistencia al calor. Poseen a menudo vacuolas en el citoplasma y gránulos de poli-beta-hidroxibutirato (Cubero, 1983).

Actualmente la rhizobia esta dividida en 5 géneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (Nick *et al.*, 1999). *Azorhizobium caulinodans*, presenta una especie de nodulación de tallo y es la única

especie de éste género (Dreyfus *et al.*, 1988) citado por Nick y Lindström, (1994); la Bradyrhizobia con especies de *B. elankii* (Kuykendall *et al.*, 1992), *B. japonicum* (Jordán, 1984) y *B. liaoningense* (Xu *et al.*, 1995) éstas nodulan las raíces pero son bacterias de lento desarrollo, para un desarrollo rápido tenemos a *Sinorhizobium* con las especies de *S. fredii* (Scholla y Elank, 1984), *S. meliloti* (Jordán, 1984), *S. saheli* y *S. teranga* corregido por de Lajudié *et al* (1994) , descrito como el miembro más nuevo de éste género tenemos a *S. medicae*. El género *Mesorhizobium* (Jarvis, *et al.*, 1997) consiste en las especies de *M. loti* (Jarvis *et al.*, 1982), *M. ciceri* (Nour *et al.*, 1994), *M. mediterraneum* (Nour, *et al*, 1995), *M. plurifarum* (de Lajudie *et al.*, 1998) y *M. thianshanense* (Chen *et al.*, 1995). El género *Rhizobium* es filogenéticamente heterogéneo con dos diferentes grupos: *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. gallicum* (Amarger *et al.*, 1997), *R. hainanense* (Chen *et al.*, 1997), *R. leguminosarum* (Jordán, 1984), *R. mungolense* (Van Berkum *et al.*, 1998) y *R. tropici* (Martínez Romero *et al.*, 1991).

2.9. DIVERSIDAD GENETICA DE RHIZOBIA

La diversidad biológica, comprende a todas las especies de plantas, animales, microorganismos, al ecosistema y procesos ecológicos de los cuales forman parte (McNeely *et al.*, 1990). La diversidad genética es la suma total de información genética contenida en los genes individuales de plantas, animales y microorganismos que habitan la tierra (McNeely *et al.*, 1990); se habla de una comunidad alfa cuando se estudia la diversidad de especies dentro de un hábitat o comunidad particular (Lincon *et al.*, 1995).

Una de las formas para demostrar la diversidad genética tanto de bacterias como de eucariotas, es mediante el estudio de las variantes electroforéticas de

enzimas, las cuales se han aplicado para el caso de *Rhizobium* (Segovia., et al, 1991) sin embargo; ésta no se ha correlacionado con la efectividad de las cepas bajo condiciones de invernadero. De manera general se ha considerado a *Rhizobium* como uno de los géneros con la más alta diversidad genética reportada donde $H=0.860$, *Bradyrhizobium* con $H=0.690$, incluyendo a las bacterias bien estudiadas como *Escherichia coli* $H=0.520$ (Martínez y Caballero, 1996). En *Phaseolus vulgaris* se ha reportado la más alta diversidad donde $H=0.780$ (Herrera et al., 1999).

Nuevos datos sobre diversidad están acumulándose rápidamente: por ejemplo la diversidad de la rhizobia asociada a *L. leucocephala* ha sido identificada en 12 tipos de rDNA e incluyen a *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Nuevos linajes han sido revelados por la caracterización de diversas poblaciones de *Bradyrhizobium* asociados a diferentes hospederos. Todos estos datos indican la existencia de rhizobia desconocida en la naturaleza y nuevas taxones serán esperada cuando se realicen investigaciones sobre nuevos aislados o grupos (Tan et al., 2001).

Algunas leguminosas, como *Prosopis*, son nativas del continente Americano y se les ha cultivado en otras regiones geográficas desde el siglo XV. La adaptación de estas leguminosas a nuevos hábitats puede incluir la nodulación de sus raíces por diferentes géneros de rhizobia en cada suelo. De tal forma que es importante estudiar la población que nodulan *Prosopis* en grandes ecosistemas en Suramérica, porque los simbiontes de éstos en América no se han estudiado ampliamente (Velásquez et al., 2001).

Por los resultados encontrados y por los estudios de hibridación DNA-DNA se concluye que las cepas aisladas de *Prosopis* en el estudio realizado por Velásquez et al., (2001) constituyen una nueva especie del género *Mesorhizobium*. Una nueva especie, *Mesorhizobium chocoense* sp. nov., es por lo tanto propuesta para aislados de *Prosopis* de Chaco Arido (Argentina).

La caracterización fenotípica de 48 aislados obtenidos de nódulos de cuatro especies de *Acacia* (*A. cyanophylla*, *A. gummifera*, *A. horrida* y *A. raddiana*) que crecen en suelos áridos y regiones del Sahara fueron estudiadas. La rizobia fue muy diversa con respecto a sus patrones de inoculación cruzada, así como sus propiedades bioquímicas y fisiológicas. Los dendogramas obtenidos a través de análisis numérico por computadora para 52 características fenotípicas, demostraron que los aislados podrían incluirse en cuatro grupos, bajo los niveles limitantes promedio de distancia de 0.85 y los cuales fueron muy diferentes a las cepas de referencia. Algunos aislados interesantes para ensayos de inoculación han sido identificados (Zerhari *et al.*, 2000).

2.10. Especificidad al hospedero

En particular, por su gran importancia agrícola, las leguminosas son el grupo hasta el momento más estudiado en cuanto a interacciones genéticas con sus microorganismos asociados (Vásquez-Arroyo, 1996).

Una determinada cepa tiene una respuesta específica al hospedero, tal como: nodulación efectiva o inefectiva; distribución de nódulos en la planta, forma característica de los mismos y su coloración e incluso morfología coloniales inusuales. Ninguna de esas características, es de aplicación general, aunque pueden ser útiles como criterios secundarios (Pastorini, 1992; Singleton y Tavares, 1986; Vincent, 1975).

Se han identificado los genes (*nod*) que controlan la infección específica y nodulación de la planta hospedera. El evento de la infección inicial es regulado por la proteína NodD o proteínas que activan la transcripción de otros genes *nod* en presencia de flavonoides producidos por el hospedero. La expresión de estos genes comunes y específicos al hospedero resultan en la producción de lipoquitooligosacárido (factores Nod) que actúan como moléculas señales morfogenética en leguminosas específicas (Zhang *et al.*, 2000).

El primer reporte de variabilidad en la respuesta simbiótica (nodulación), de una leguminosa hacia varias cepas de *Rhizobium*, fue realizado por Vorhees en 1915. Posteriormente, Wilson *et al.* (1937) establecieron que los factores genéticos del macrosimbionte están involucrados en la respuesta y el desarrollo de la asociación con el hospedero (Cadwell y Vest, 1977) citado por Hungría y Neves, (1986).

Estudios previos en frijol indican que bajo condiciones de invernadero, existe una mayor nodulación, resultados que concuerdan con los trabajos publicados por Duque *et al.*, (1985); Hungría y Neves, (1986). Por otra parte, en el campo esto se reduce, aun en suelos con adecuada humedad, lo que indica que no solamente el agua es un factor determinante de la nodulación (Vásquez-Arroyo, 1996).

2.11. Competencia entre las cepas para la formación de nódulos

Las bacterias del suelo pueden colocarse en dos grandes grupos: las especies nativas o autóctonas que son residentes verdaderos y los organismos invasores o alóctonos. Las poblaciones nativas pueden presentarse en estados resistentes y perdurar por largos períodos sin tener actividad metabólica, pero en determinado momento, estas formas proliferan y participan en funciones bioquímicas de la comunidad. Las especies alóctonas, por el contrario, no participan en manera significativa en las actividades de la comunidad (Vásquez-Arroyo 1996).

Las diferentes cepas de rhizobia pueden diferir en su habilidad para permanecer viables en suelo, para colonizar la rizosfera y para infectar y nodular una leguminosa. La habilidad de una cepa de rhizobia para formar la mayor parte de los nódulos de la planta, en presencia de otras cepas específicas, se conoce como "competitividad". La competitividad es un factor clave que se debe considerar al introducir inóculos con cepas específicas. En caso de no tomarse en cuenta lo anterior,

es muy probable que, la cepa introducida no sea responsable de la formación de la mayoría de los nódulos (Schwinghamer, 1985).

La rizobia en el suelo apenas sobreviven a temperaturas superiores a 35 °C por encima de la cual pierden totalmente la capacidad de infectar y fijar N₂. La bacteria entra en la planta por intermedio de un pelo radicular, a través de un hilo de infección llega así a una célula interna de la raíz, se transforma en bacteroides y comienza su multiplicación. Es importante señalar que cuando ocurre más temprano el proceso de formación de nódulos, éstos tendrán mayor período de vida activa, por lo que entregarán mayor cantidad de nitrógeno a las plantas, como así también, habrá mayor cantidad de nitrógeno en los sectores radicales. Otro factor a tener en cuenta es la ubicación de los nódulos en la raíz. Los de mayor eficiencia son aquellos situados en el cuello de la raíz, y los ubicados en el tercio superior de la misma (Lanusse, 1997).

Un problema crítico, en todos los programas de selección de cepas, es la competencia que se establece entre las cepas nativas y las cepas seleccionadas o mejoradas que se trata de introducir (Gussin, *et al.* 1986).

La competencia por ocupar nódulos por las diferentes cepas rizobiales es un área compleja y controversial en los estudios de la simbiosis rizobia-leguminosa. Muchas variables ambientales participan así como características intrínsecas de la rizobia y determinantes genéticos del hospedero los cuales contribuyen a una buena o mala dispersión de la cepa rizobial para que una significativa proporción de nódulos bajo series de condiciones dada (Thies *et al.*, 1992). Factores ambientales que afectan la competencia nodular incluyen la presencia de cepas nativas de rizobia (Ham *et al.*, 1971), temperatura (Klusa *et al.*, 1986), humedad (Boonkerd y Weaver, 1982), pH del suelo (Dughri y Bottomely, 1983; 1984), disponibilidad de nitrógeno (Abaidoo *et al.*, 1990) contenido de nitrógeno en el suelo (Caballero y Martínez-Romero, 1999) y antagonismo microbiano (Triplett y Barta, 1987).

2.12. Metodologías para la caracterización de rhizobia.

Se han desarrollado métodos moleculares usados para la clasificación y obtención de la diversidad genética de las bacterias. La taxonomía y filogenia de las bacterias está basada increíblemente en las características genotípicas, esto es, sobre la constitución genética de los organismos. El genoma bacteriano está dividido dentro en dos partes: DNA cromosomal (también llamado como el fondo cromosomal) y el plásmido DNA. Esta es aparentemente la filogenia de estos dos componentes; esto es interesante debido a que, en el desarrollo de rhizobia los genes del simbionte que residen en plásmidos bacterianos presentan transferencia entre ellos. Así en lugar de ser una asociación permanente, las combinaciones de plásmidos de fondo cromosómico pueden variar. Sin embargo, también se han demostrado la transferencia en el simbionte de los genes localizados en el cromosoma (Sessitsch, 1997).

Graham y Parker (1966) desarrollaron un método para la caracterización de cepas de *Rhizobium*, en base, a ciertas características de crecimiento en laboratorio, tales como requerimientos de pantotenato de calcio y tiamina, crecimiento a pH 4.5 y 9.5, crecimiento a 39°C, reducción del nitrato, crecimiento en NaCl al 2%, producción de penicilina, tamaño de la colonia y la presencia ó ausencia de gránulos metacromáticos.

2.12.1. Resistencia Intrínseca a antibióticos

Jocey *et al* (1979), desarrollaron un método para distinguir entre las diversas cepas de una población de *Rhizobium*. El método se basa en los diferentes patrones de resistencia a varios antibióticos que presenta cada cepa. De tal forma que una manera de estimar la diversidad y caracterización de cepas rhizobiales es mediante la

caracterización de aislados basados a su resistencia intrínseca a antibióticos (RIA) (Jocey *et al.*, 1979).

El empleo de cepas de *Rhizobium* resistentes a altas concentraciones de antibióticos en estudios de ecología fueron propuestos por Obaton (1971) citado por Cooper (1979) y empleados por Danson *et al.*, (1973), La más obvia aplicación de la técnica se da en los estudios de supervivencia, colonización y competitividad que son procesos asociados con la inducción de cepas al suelo (Cooper, 1979).

Finalmente cabe destacar que si bien la metodología de RIA es rápida y económica, esta no demuestra ser de gran utilidad, dado que se generan alta variabilidad en los resultados como se puede constatar por nuestros resultados y estudios previos, por lo tanto es prácticamente de poco valor el empleo de la caracterización de cepas mediante dicha metodología y en caso de emplearse, deberá ser no como tal, sino trabajando con concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), las cuales generan cambios en la agrupación de cepas, tal y como se manifiesta por Van Rossum *et al.*, (1995).

2.12.2 Métodos serológicos

Tan importante como el conocimiento de que existe variabilidad en una población de *Rhizobium*, es la capacidad de distinguir una ó varias cepas específicas basándose en ciertas características. Existe un cierto número de métodos bioquímicos, serológicos, etc., que permite establecer diferencias entre diversas cepas y capacitan al investigador para reconocer la aparición de cepas nuevas (Dudman,1977).

Las técnicas serológicas de inmunodifusión han sido utilizadas en estudios de campo y han demostrado ser más precisas que las pruebas de aglutinación en la

identificación de cepas de *Rhizobium*. Dazzo y Hubbell (1975), emplearon la técnica de inmunodifusión e inmunoelectroforesis, logrando discriminar entre el comportamiento de cepas inefectivas y no efectivas de *R. trifolii* por diferencias antigénicas; así mismo, Van Rensbrug y Strijdom (1985), lo hicieron en *R. leguminosarum*.

Estudios realizados por Espinoza *et al.*, (1989) encontraron que la técnica convencional inmunoenzimática (ELISA) en la que se emplean anticuerpos policlonales, no se recomienda para la identificación de cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, debido a que las cepas comparten en mayor o menor frecuencia un alto número de antígenos.

2.12.3 Patrones de proteínas totales

Los patrones de proteínas se basan en la migración diferencial electroforética de las proteínas de acuerdo al tamaño de la molécula y de su carga. El procedimiento consiste básicamente en destruir la célula mediante lisis, purificación de las proteínas, luego se suspende en un tampón para lograr una carga negativa de las mismas. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se obtienen patrones de bandas característicos de cada cepa (Pastorini, 1992).

Los modelos de perfiles de proteínas son útiles para subdividir grupos serológicos de especies de rhizobia. Resultando una poderosa herramienta para identificación de cepas, sin embargo el procedimiento es laborioso (Vásquez-Arroyo, 1996).

2.12.4 Perfiles de Plásmidos

Una característica general en las especies de rhizobia, es la existencia de una gran cantidad de DNA extracromosómico en entidades denominadas plásmidos. Estos varían en número (1-10) y tamaño, pero en general son de alto peso molecular (de 100

a 300 Mda). Ellos pueden constituir un gran porcentaje en el genoma celular, e.g. hasta 45% en el caso de *R. etli* (Martínez y Palacios, 1990; Martínez-Romero, 1994). En la mayoría de las especies rizobiales la mayoría de los genes requeridos en el proceso simbiótico están localizados en plásmido, al cual generalmente se le conoce como plásmido Sym o pSym. Sin embargo la mayoría de la rizobia también presentan plásmidos que no son esenciales en el establecimiento de un estado simbiótico complejo, éstos se denominan no simbióticos o no plásmidos pSym o simplemente megaplásmidos (Mercado y Toro, 1996). Existe una serie de funciones que se han encontrado en los plásmidos no simbióticos como son: síntesis de bacteriocinas, eficiencia de nodulación, aumento o disminución de la efectividad, genes simbióticos reiterados, síntesis de exo y lipopolisacáridos, utilización de fuentes de carbono, síntesis de melanina, aumento o disminución del crecimiento bacteriano y supervivencia bajo diferentes condiciones ambientales (Mercado y Toro, 1996).

En rizobia, los plásmidos contienen más del 25% de la información genética (Martínez *et al.*, 1990) y el tamaño así como la cantidad del número de plásmidos varía entre cepas. Usualmente el número de plásmidos presentes va de dos a diez donde el rango de peso molecular va de 30 a más de 1000 Mda.

El plásmido mejor estudiado de la rizobia es el plásmido pSym, éste contiene genes simbióticos para la nodulación y fijación de nitrógeno. Otros plásmidos además del pSym, pueden contener genes que son necesarios para la nodulación efectiva (Hynes *et al.*, 1986, Hynes and McGregor, 1990; García de los Santos *et al.*, 1996). Sin embargo, no toda la rizobia tiene estos genes simbióticos localizados en un plásmido. *Bradyrhizobia* y *Mesorhizobium loti* tienen estos genes simbióticos localizados en el cromosoma, aunque estos también contienen plásmidos (Martínez *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1994). Al momento se tiene un pequeño

conocimiento de posibles plásmidos en mesorhizobia (Xu and Murooka, 1995; Zhang *et al.*, 1995).

En experimentos de laboratorio se ha podido comprobar que existe transferencia del plásmido pSym entre cepas y especies rizobiales (Martínez and Caballero, 1996).

2.12.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la corta historia de la biología molecular, el surgimiento de una nueva técnica (*e.g.* clonación molecular, electroforesis en gel de pulso y campo) ha transformado el pensamiento acerca del discernimiento tanto de problemas biológicos aplicados como fundamentales. La capacidad de aplicar segmentos específicos de DNA, se ha hecho posible por la técnica de PCR (Erlich, 1989).

La PCR, es un método que se efectúa *in vitro* de la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA, empleando dos oligonucleótidos como iniciadores, que hibridizan con las hélices opuestas y flanquean la región de interés en el DNA blanco. Una serie repetida de ciclos, involucra la desnaturalización de la plantilla (DNA), alineamiento del iniciador y la extensión de éste por medio de la enzima de DNA polimerasa, resultando como tal una acumulación exponencial del fragmento específico cuyas terminales son definidos por los extremos 5' de los iniciadores (Erlich, 1989). Inicialmente se llevó a cabo empleando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli* sin embargo, la enzima se inactiva por las altas temperaturas empleadas y actualmente se emplea la Taq polimerasa (Taq) aislada de *Thermophilus aquaticus*. En virtud de que el producto sintetizado por expresión del iniciador en un ciclo puede servir como plantilla en el siguiente; el número de copias de DNA blancos se duplican en cada ciclo. Así 20 ciclos de amplificación, producirán alrededor de un

millón de veces la amplificación (Erich, 1989) dicho método fue originalmente aplicado en estudios de genética humana por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987).

La técnica es de gran utilidad en la detección rápida y específica de bacterias del suelo (Herrera *et al.*, 1999; Therefework *et al.*, 1998), y caracterización de cepas de *Rhizobium* (Zhang, *et al.*, 1995; Haukka, 1997 y Sessitsch, 1997)

Para llevar a cabo una caracterización de cepas mediante esta metodología es conveniente, probar con un determinado número de indicadores, los cuales pueden ser al azar y se le denomina RAPD (polimorfismo del DNA Amplificado Aleatoriamente) (Berg *et al.*, 1994).

2.12.6 Movilidad Electroforética de Enzimas (MLEE)

La movilidad electroforética de enzimas se ha empleado por muchos años en genética eucariótica. Hasta recientemente, se ha encontrado la utilidad de este método para estudios reconocidos de taxonomía bacteriana y evolutiva; esta metodología permite además la identificación de genotipos de una población entre organismos (Selander *et al.*, 1986) identificación de nuevas especies (Martínez-Romero 1994) y la clasificación de otras especies han sido confirmadas con MLEE (Segovia *et al.*, 1993). En México, se ha trabajado con esta metodología, para determinar la estructura y Diversidad Genética de las poblaciones de *Rhizobium* que nodulan frijol (Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1993; Souza, 1990; Souza *et al.*, 1994) y poblaciones no nodulantes (Segovia, *et al.*, 1991).

Las diferentes variantes de movilidad, denominadas electroformas o electrotipos (ET's) para cada enzima, se numeran en orden decreciente de acuerdo a la movilidad, siendo igualada con los alelos de los correspondientes locus de genes estructurales y perfiles de electroformas para cada enzima. La técnica de electroforesis en gel de

almidón y tinción selectiva de enzima aplicada al estudio de la genética de poblaciones y sistemática de bacterias ha sido descrita previamente por Selander *et al.*, (1986).

La MLEE es una técnica basada en el polimorfismo de un numero significativo de genes encontrándose como codificación en una serie de enzimas. Este método detecta diferentes alelos de genes enzimas (isoenzimas). Las diferentes electroformas para cada enzima reflejan diferentes alelos al gene correspondiente de cada locus de la enzima, y los perfiles electromorfos para un numero de enzimas son identificados como fenotipos multilocus o tipos electroforéticos (ET's) cual reflejo cromosomal de genotipos (Selander *et al.*, 1986).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del área de trabajo

El área de trabajo se encuentra ubicada en las instalaciones de la UAAAN en el laboratorio de Microbiología y en invernadero, en la Ciudad de Torreón, Coah., así como en el Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno en Cuernavaca, Morelos.

La recolección de los nódulos en campo se realizó en la comarca Lagunera situada entre los paralelos 24° 05' y 26° 54' latitud norte y entre los meridianos 101° 40' y 104° 45' de Greenwich, en los ejidos El Retiro y Aquiles Serdán y en el Municipio de San Pedro Coah; así como en suelo del Municipio de General Terán, Nuevo León, se encuentra ubicado en la región sureste entre las coordenadas 25° 17' de latitud norte y 99° 10' de longitud este.

3.2. Ensayos de invernadero

3.2.1. Recolección de semilla de las especies a trabajar

Se recolectaron vainas para la obtención de semilla de la cual se obtuvieron, 5 kg para huizache (*Acacia farnesiana* L.), 1 kg de semilla de "mezquite" (*Prosopis glandulosa* y 500 g de "Leucaena" (*Leucaena leucocephala* Lam.). La recolección de las semillas utilizada en el experimento de invernadero se realizó en los Municipios de San Pedro, Matamoros y Torreón, Coah. Además se recibió semilla de *Leucaena* del

laboratorio de tecnología de semillas de la UAAAN. Saltillo, Coah. Así como de la empresa "Semillas Tlanepantla" en Villa Hermosa, Tabasco. Se recibieron 500 g de semilla de *Leucaena*. La recolección se realizó durante los meses de mayo a Julio del 2000, manteniéndose las semillas en bolsas de papel con Captan 80.

3.2.2. Tratamiento de semillas

El tratamiento que se aplicó a las semillas fue el mismo día de las siembras, se hizo con la finalidad de escarificarlas. Se depositaron 200 semillas de cada una de las leguminosas por separado en matraces Erlenmeyer y se agregó 200 ml de ácido sulfúrico concentrado de modo que se cubrieran las semillas y agitándose durante 10 minutos, enseguida se lavaron 5 veces las semillas con agua corriente para quitar el exceso del ácido y se procedió a la siembra, colocando 4 semillas por maceta en contenedores de nieve seca de 2 L..

3.2.3. Establecimiento de macetas con las especies nativas

Las semillas se sembraron en contenedores de nieve seca con capacidad de 2 L; los que se llenaron con arena de río, la cual se esterilizó con Bromuro de Metilo. Se establecieron 30 macetas por especie de leguminosa con 4 semillas por maceta; la fecha de siembra fue del 25 de julio del 2000. Las macetas se mantuvieron 30 días a temperatura ambiente (temperatura promedio de 34°C), posteriormente pasaron al invernadero manteniendo a temperatura constante de 40°C. Finalmente, se realizó una segunda siembra el día 1° de septiembre, estableciéndose 10 macetas para cada suelo a la cual se le dio otro tiempo de escarificación con H₂SO₄. A éste tratamiento de escarificación se le dio 8 minutos de tiempo. Los riegos se aplicaron cada tercer día

auxiliado de una regadera manual, las condiciones de manejo fueron similares en cuanto a los riegos y siembra.

El propósito del establecimiento de las leguminosas es para estimar la nodulación por rizobia a partir de tres diferentes suelos de La Comarca Lagunera en tres leguminosas "Leucaena", "Mezquite", y "Huizache". Aunque se trabajara con 4 especies de leguminosas, solamente se establecieron tres especies debido a la importancia económica que tienen, logrando generar información, del tiempo que tardan en nodular bajo condiciones controladas.

3.2.4. Preparación de la solución para inocular las macetas

La preparación de las soluciones del suelo se realizó tomando 40 g de cada uno de los suelos, los cuales se depositaron por separado en matraces; posteriormente, se agregaron 360 ml de una solución salina de NaCl al 85% estéril, logrando al final un volumen de 400 ml por suelo. El número de plantas de una misma especie inoculadas con los diferentes suelos fue de treinta, de las cuales diez plantas fueron inoculadas con un mismo suelo. Se tomaron 10 ml de la solución y se vaciaron en cada una de las macetas correspondientes, la operación se repitió cuatro veces en un intervalo de tiempo de 10 días. La primera inoculación se realizó inmediatamente después de la siembra.

3.3. Variables evaluadas

Durante el desarrollo del presente trabajo, se realizaron las siguientes determinaciones:

3.3.1 Porcentaje de emergencia de semilla

Dos días después de la siembra (dds), se observó diariamente la emergencia de las plántulas de invernadero para tres de las especies, leucaena, huizache y mezquite leguminosas que se establecieron, determinando el porcentaje y el tiempo de emergencia.

3.3.2. Numero y distribución de nódulos

Las plantas de invernadero se dividieron en 3 especies antes mencionadas de las cuales se inocularon 3 suelos (el Retiro, Aquiles Serdán y San Pedro) por especie induciendo a la nodulación. Del total de nódulos de la raíz de la planta, aquellos que se encontraron en los primeros 5 cm del inicio de la misma fueron considerados como nódulos de la corona; el resto se contabilizó como laterales.

3.3.3. Longitud y peso de la raíz

La altura de la raíz se midió en cm, a partir del cuello del tallo y el peso de la raíz se realizó por medio de una balanza, el cual se realizó en fresco.

3.3.4. Análisis estadístico

Se utilizó el programa Statistical Analysis System (SAS), para la realización de los análisis estadísticos de los diferentes suelos, así como para analizar los datos de nodulación por medio de una correlación, (1989-1996) by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. SAS (r) Proprietary Software Release 6.12 TS020. Licensed to UAAAN UNIVERSITY, Site 0008979001.

3.4. Análisis de suelo

Se realizó un análisis físico-químico a los suelos empleados para la inoculación de las macetas de invernadero en el que se incluyó pH, densidad aparente, conductividad eléctrica, contenido de macro y micro elementos, clasificación de los suelos y contenido de materia orgánica.

3.5. Obtención de nódulos

De invernadero fueron recolectados nódulos de nueve plantas de cada especie, tres para cada suelo, a los 40, 49, 57 y 111 dds, se extrajeron las plantas y se lavaron con agua natural para quitar el exceso de arena de la raíz, a continuación se tomaron los nódulos separando en tubos de ensayo los nódulos de la corona y de los laterales, registrando el número de estos así como el tiempo de aparición de los nódulos.

3.6. Determinación del número más probable (NMP) de rizobia

Para la determinación del NMP, se establecieron 63 macetas, el día 26 de Mayo del 2001, con la especie *Phaseolus vulgaris*, debido a su gran precocidad para nodular y por su capacidad para hospedar a numerosas especies de rizobia (Comunicación personal de la Dra. Esperanza Martínez Romero). La primer solución se preparó en un matraz conteniendo 30 g de suelo y 270 ml de agua destilada estéril, y a partir de allí se tomaron 50 ml, 40 de los cuales se usaron para la inoculación de las 4 macetas y los 10 ml restantes se utilizaron para preparar las diluciones: 1:50, 1:250, 1:1250 y 1:6250. Los suelos que se emplearon fueron del Retiro, Aquiles Serdán, Mpio. De San Pedro y de San Pedro, Coah. Esto con el objeto de inducir nodulación en las plantas y así determinar el NMP según la técnica de Brockwell (1982).

3.7. Ensayos de campo

3.7.1. Recolección de nódulos en campo

Para la obtención de nódulos en campo, se realizó un muestreo en las áreas del Retiro, Aquiles Serdán, Mpio de San Pedro, así como en San Pedro, Coah. y en Monterrey, N.L. de acuerdo al formato para muestreo proporcionado por el INIFAP de NL. El muestreo de plantas de "Mezquite", "Leucaena" y "Huizache" se realizó en plantas que presentaron una altura de 1.5 a 2 metros, debido a que las plantas menores a esa altura no presentaban nodulación; la técnica consistió en excavar 1.0 m alrededor de la raíz y .75 a 1 m de profundidad, para no dañar a ésta extrayéndose toda la planta para contar la cantidad de nódulos totales por planta de los cuales se analizó solamente el 15% según lo propuesto por Moreira *et al.*, (1993).

3.7.2. Almacenamiento de los nódulos

Los nódulos recolectados de cada planta fueron depositados en tubos de ensayo conteniendo silica gel los cuales se etiquetaron para su rápida identificación; posteriormente fueron conservados en refrigeración a 10°C durante 7 días.

3.7.3. Esterilización de nódulos

La esterilización de nódulos se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Somasegaran y Hobell (1985), primeramente, como los nódulos fueron recolectados directamente en campo y conservados en silica gel, se rehidrataron en agua destilada estéril durante 30 minutos, posteriormente se lavaron con alcohol etílico al 70%,

enseguida se agregó cloro al 25% dejándose reposar durante 5 minutos para después enjuagarlos 8 veces con agua destilada estéril.

3.8. Aislamiento de rhizobia.

Se tomó un nódulo con ayuda de las pinzas de disección y se agregó una gota de agua destilada estéril encima del medio de cultivo "extracto de levadura y peptona" (PY) utilizado para el crecimiento y desarrollo de la bacteria (Vincent, 1975) la composición del medio para un litro de agua es: 3 g de extracto de levadura, 5 g de peptona caseína (Noel, *et al*, 1984). Se agregó 1 ml de calcio (0.14 mM) por cada 100 ml del medio de cultivo previamente esterilizado; el calcio se agregó al momento de vaciar a las cajas Petri, al que se adicionó 20 mg L^{-1} del antibiótico cicloheximida (Caballero and Martínez, 1999) las cajas fueron incubadas a 30°C .

Al tercer día se procedió a reaislar la bacteria en el mismo medio conteniendo 20 mg L^{-1} del antibiótico ácido nalidixico, debido a que se presentó contaminación en las cajas (hongos y bacterias), sin embargo este antibiótico es selectivo de rhizobia. Posteriormente se sembraron colonias aisladas en PY únicamente con ayuda de un palillo de dientes para posteriormente estriar la superficie de las cajas incubándose a una temperatura de 30°C . Ésto se repitió hasta que se obtuvo en aislado puro en PY.

3.9. Inoculación de plantas

Semillas de *Phaseolus vulgaris* fueron lavadas y esterilizadas con alcohol al 70% e hipoclorito de sodio al 40%, por separado (Martínez *et al.*, 1985) y las semillas se colocaron para su germinación en cajas Petri conteniendo agar-agua al 1% e incubando las cajas a 30°C durante 36 horas (Comunicación personal con la Dra.

Esperanza Martínez Romero). Las plántulas germinadas se inocularon con cada uno de los aislados puros obtenidos, para la confirmación de la rhizobia; este procedimiento se hizo directamente de caja. En contenedores de nieve seca de 250 ml, tapados con papel aluminio estéril se depositaron 7 g de algodón y se vaciaron 120 ml de la solución de Fahraeus (1957), la cual consiste en la preparación de una solución para un litro conteniendo 10 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de KH_2PO_4 , 10 ml de CaCl_2 , 10 ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml de Fe citratos y 1 ml de solución traza (Martínez and Rosenblueth, 1990). La inoculación de las plantas se realizó de acuerdo a la metodología de Faraheus; se tomó una asada de una caja sembrada y se mezcló con unas gotas de la solución de Faraheus; con ayuda de unas pinzas estériles se tomó una semilla germinada y se bañó la raíz con esta suspensión de células, posteriormente se depositó la semilla encima del algodón mojado y se incubó durante 20 días a 30°C. Este procedimiento se realizó para todos los aislados obtenidos.

3.10. Caracterización de los aislados de rhizobia

El análisis para identificación y/o caracterización de rhizobia incluyó estudios utilizando los protocolos establecidos de aislamiento de ADN como templado para la técnica de PCR, definición de especie asociada (s) a plantas nativas, preparación de lisados para MLEE y obtención de perfiles de plásmidos.

3.10.1. Preparación de lisados rhizobiales para movilidad electroforética de enzimas (MLEE).

Se tomó una asada de cada uno de los aislados, los cuales fueron crecidos durante la noche ($0.D_{600nm} > 1$) en agitación continua a 250 r.p.m. a 30°C en matraces conteniendo 50 ml de PY, añadiendo 500 μl de cloruro de calcio. Las células se

cosecharon por centrifugación a 8000 r.p.m. durante 10 min. El sobrenadante se desechó y los tubos se dejaron en hielo, se adicionaron 300 μl de sulfato de magnesio 10 mM y la lisis celular se realizó adicionando 500 μl de sulfato de magnesio 10 mM, en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 10 mg de lisozima (1mg ml^{-1}), enseguida se agregó 50 μl de esta solución a los tubos contenidos en hielo, y sometidos posteriormente a dos ciclos de congelación a -70°C por 10 minutos e incubándose durante 10 minutos a temperatura ambiente para descongelación.

El gel se cortó en rebanadas y éstas se sumergieron en mezclas de reacción preparadas en el momento, se estudiaron 6 enzimas para la construcción de dendogramas. Los sistemas electroforéticos buffer empleados y enzimas estudiadas fueron: (1.1.1.42) IDH Isocitrato dehidrogenasa en trisma base 0.2M, pH 8.0; (1.1.1.44) 6GP Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, en trisma base pH 8.0; (1.4.1.1) ALD Alanina dehidrogenasa, fosfato de sodio, pH 7.0; (1.1.1.37) MDH Malato deshidrogenasa, en trisma base , pH 8.0; (1.4.1.4) GD2 Glutamato dehidrogenasa, en trisma base, pH 8.0; (2.7.5.1) PGM Fosfoglucomutasa, en trisma base pH 8.0. (Selander *et al.*, 1986). Las diferentes variantes de movilidad, denominadas electroformas o electrotipos (ET's) para cada enzima se numeran en orden decreciente de acuerdo a la movilidad, siendo igualadas en los alelos de los correspondientes locus de genes estructurales y perfiles de electroformas para las seis enzimas. Los ET's fueron comparados con los multilocus de los genotipos. Se elaboró un dendograma, mediante la construcción de matrices de distancias, empleando el programa Unweighted Pair Group Method (UPGM) con medias aritméticas, proporcionado por la unidad de Ribotipificación del Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno de la Universidad Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos.

3.10.2. determinación de la diversidad genética

De acuerdo a los valores obtenidos del seguimiento enzimático se pudo estimar la media de la diversidad genética encontrada por locus; calculándose de la siguiente manera. $h=1- [\sum Xi^2] [n/(n-1)]$, donde Xi es la frecuencia del i -ésimo alelo en el locus y n es el numero de tipos electroforéticos (ET's) en la muestra, así como la H que representa a la media aritmética de h por encima de cada loci analizado (Martínez y Caballero 1996).

3.10.3. Aislamiento de ADN como templado para la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se tomó una asada de células rizobiales y se depositaron en tubos eppendorf previamente etiquetados, éstos se numeraron de acuerdo a las cajas y se agregaron 50 μ l de tween 20 (Martínez and Rosenblueth, 1990) (tween 20 es un detergente que se prepara de la siguiente manera: se tomo una solución madre concentrada (dilución 1:10) 10X de sulfato de magnesio 10 mM y se esterilizó en cada uno de los tubos y de las cajas que contenían colonias aisladas se tomó una colonia con ayuda de un palillo de dientes estéril el cual se introdujo dentro del tubo Eppendorf y se agitaron en el vortex por 15 segundos.

Se tomaron 5 μ l de cada uno de los tubos y se depositaron en cajas nuevas conteniendo PY, cada una de éstas se etiquetó; se dejó secar la muestra y se estrió para finalmente incubar a 30°C.

Los tubos Eppendorf conteniendo las células rizobiales se calentaron en un Termociclador (Perkin Elmer mod. 480) durante 10 minutos a una temperatura de 95°C.

En un volumen de reacción de 100 μl se adicionan 80.2 μl de agua miliQ estéril, 1 μl de cada uno de los Primes fD1, rD1 ($\text{pm}/\mu\text{l}$), 3 μl de MgCl (50 mM) 10 μl del buffer de reacción 10X (Selander, 1985), se agregan 0.8 μl de DNTP'S 10 mM, y 5 μl de la enzima Taq Polimerasa (Gibco). Se tomaron 5 μl de DNA y agregan 95 μl de la reacción, se agregaron 3 gotas de aceite mineral; cada uno de los tubos se depositó en el termociclador Perkin Elmer, para amplificar la subunidad ribosomal de los 16S (1.5 Kb). Se utilizó el siguiente perfil de temperaturas para la amplificación del PCR: una temperatura inicial de desnaturalización de 1 ciclo de 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C 1 min., 35 ciclos de 57°C de 1 min., 35 ciclos de 72°C por 2 min, por último 1 ciclo de 72°C por 3 min. El tiempo de duración del programa fue de 4 horas.

3.10.4. Cepas de Referencia de *Rhizobium*

Las cepas de referencia empleadas son las siguientes: CFN42^T *R. etli*, CFN299^T *R. tropici* tipo B, USDA06 *B. japonicum*, 73f (*Sinorhizobium* spp.) y 156'P (*Sinorhizobium* spp. Por definir aislados de *Acacia farnesiana*) y *Sinorhizobium meliloti*, que se proporcionaron gentilmente por la Dra. Esperanza Martínez Romero, de la unidad de Ribotipificación del Centro de Fijación de Nitrógeno de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos; México.

3.10.5. Definición de especie

Para la definición de especie de rhizobia se empleó el procedimiento denominado ribotipificación, descrito por Schmidt, (1994), Laguerre *et al.*, (1994). Los genes de la subunidad 16S fueron sometidos a restricción, utilizando 12 μl del producto de amplificación del gen, se agrega 1.5 μl de buffer tris acetato 10X, 1.5 μl de cada una de las enzimas que se emplearon (Rsa1, SAU3A1, Msp1, Hha1 y Hinf1) los cuales se

incubaron a 37°C durante 10 horas. Se corrieron las muestras en un gel al 3% de agarosa empleando tris acetato, se tiñó con bromuro de etidio. Los patrones de bandas generados por los diferentes aislados fueron comparados contra cinco cepas rhizobiales de referencia.

3.10.6. Perfiles de Plásmidos

Se seleccionaron al azar 95 cepas representativas de los aislados obtenidos de las diferentes localidades, para obtener los perfiles de plásmidos mediante el procedimiento de Eckhardt (1978), modificado por Wheatcroft *et al.* (1990).

Se tomó una asada de células rhizobiales de cada una de las cajas seleccionadas y se introdujo al tubo de ensayo que contenía 2 ml de PY líquido. El procedimiento se realizó para cada uno de los aislados dejándose en agitación toda la noche a 30°C, hasta la densidad óptica de 0.4 a 0.5 (λ de 630 nm), se tomaron 200 μ l de cada uno de los tubos y se le agregó Sarkosil al 0.3% en tris boratos 1X, a continuación se centrifugaron a 8000 rpm en una microcentrifuga (Eppendorf 5415 Brinkman instruments). Se desechó el sobrenadante y a la pastilla celular se suspendió en solución EL (a 1 ml se le agrega unos gramos de lisozima). La determinación de los perfiles se realizó sobre geles de agarosa al 0.7%, incluyendo las cepas de referencia de CFN42^T, CFN299^T y *S. Meliloti*.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La capacidad de rizobia y de algunas leguminosas para formar simbiosis y transformar eficientemente el nitrógeno atmosférico en amonio y transferirlo al hospedero; es de gran importancia económica en la agricultura (Wolfgang *et al.*, 1998). El establecimiento de leguminosas es de gran ayuda para el suelo debido a que provee a este de nitrógeno de una forma natural, evitando que el agua sufra contaminación por nitratos resultantes de aplicaciones excesivas de fertilizantes nitrogenados (Ludwing *et al.*, 1998), así como para reducir costos de producción

4.1. Ensayos de invernadero

Los datos de germinación se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Porcentaje de emergencia de leguminosas de la primera siembra

UAAAN-UL 2001.

Especie	Días después de la siembra									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>L. leucocephala</i>	10	30	40	60	67	83	93	97	97	97
<i>P. glandulosa</i>	0	0	0	0	67	67	20	30	50	60
<i>A. farnesiana</i>	0	0	3	10	27	30	43	53	67	70

En éste cuadro se puede observar que la *Leucaena* alcanzo un 97% de germinación en nueve días después de la siembra, en tanto que *Prosopis glandulosa* y *Acacia farnesiana* solo germinaron el 60 y 70% de las semillas a los 11 dds respectivamente, tratamiento que se creía adecuado para obtener la mayor germinación en invernadero.

Cuadro 3. Porcentaje de emergencia segunda siembra

UAAAN-UL 2001.

Especie	Días después de la siembra									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>L. leucocephala</i>	0	0	60	80	90	90	90	100	100	
<i>P. glandulosa</i>	0	30	30	40	60	70	90	90	100	
<i>A. farnesiana</i>	0	0	0	50	50	70	80	100	100	

La siembra se realizo el día 1 de septiembre del 2000. El tiempo óptimo que se utilizó para la escarificación con un 100% de germinación fue a los 9 y 10 días, con 8 minutos en agitación con H₂SO₄ concentrado. Sin embargo los resultados de ambas siembras son diferentes, debido quizás al hecho de que se dio tiempos diferentes de escarificación a las semillas, fechas de siembra distintas y se podría decir que lo más importante es que, la primer siembra estuvo 30 días a temperatura ambiente, mientras la segunda siembra estuvo todo el tiempo en condiciones de invernadero a 40°C.

Para *Acacia farnesiana* se requieren tiempos de 15-20 minutos en ácido sulfúrico concentrado para poder obtener un 92% de germinación (Toledo, 2001; comunicación personal) lo cual difiere con los resultados obtenidos ya que en este trabajo ocho minutos fue suficiente para obtener el 100% de germinación en nueve días.

Obviamente, se reconoce que existe cierta relación entre la excreción de la raíz y la colonización de la rizosfera por microorganismos y que es probable que los

cambios cualitativos en los exudados radiculares durante el desarrollo de la planta se reflejen en un cambio en la población (proliferación bacteriana en la superficie de la raíz). Se ha encontrado que cuando la rhizobia se inocula a suelos estériles la población de ésta aumenta, no así en suelos no estériles. Después de ser estimulado por los exudados radicales estos microorganismos se convierten en una fuente significativa de inóculo que permite la supervivencia y permanencia de las especies rizobiales aún después de la muerte de la planta (Aceves-Orozco, 1986).

Análisis de suelos

Los resultados de los análisis físico-químico se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Resultados físico-químico de los tres suelos de estudio de la Región Lagunera. UAAAN-UL. 2001.

Localidad	Clasificación de suelo	N %	P ppm	Cu ppm	Fe ppm	Zn ppm	Mn ppm	Ca ppm	Mg ppm	Na ppm	C.E	M. O	pH
El Retiro	Franco	0.19	0.18	0.57	2.96	1.80	11.2	4.79	2.05	2.91	1.07	0.89	7.18
Aquiles Serdán	Arcillo-arenoso	0.08	0.11	1.34	4.40	3.30	12.0	9.88	2.88	2.52	1.62	1.16	7.25
San Pedro	Migajón limoso	0.09	0.08	2.02	4.06	1.34	9.36	17.2	5.43	17.3	3.88	1.18	7.21
	Promedio	0.12	0.12	3.93	3.80	2.14	10.8	10.6	3.45	7.57	6.57	1.07	7.21

El contenido de N total en el ejido Aquiles Serdán y en San Pedro, Coah. según las tablas de Echevest cae en la clasificación de pobres, lo mismo puede decirse del fósforo, lo cual podría ser benéfico para la simbiosis de la rhizobia según lo manifiestan Caballero y Martínez (1999). Sin embargo, en el ejido El Retiro el contenido de N, pertenece a la categoría de medianamente pobre y para fósforo como medio, lo cual podría interferir para que se estableciera simbiosis, sin embargo la literatura menciona que el éxito para establecer simbiosis, depende principalmente de la cantidad de fósforo, siendo un elemento indispensable para la activación enzimática y la nodulación

(Al Niemi *et al.*, 1997). El éxito de un microorganismo en un hábitat dado depende lo extenso de éste y de la rápida respuesta fisiológica a las condiciones ambientales (Aceves-Orozco, 1986)

Boncompagni *et al.* (1999) mencionan que algunas cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son sensibles a las altas concentraciones de sal, las que inhiben su desarrollo.

Obtención de nódulos de las plantas en invernadero

Las plantas en macetas crecieron lentamente y requirieron de cuatro a ocho semanas para que se llevara a cabo el proceso de nodulación y, así poder obtener aislados de la rhizobia asociada con las plantas. Se observó que la especie más precoz para nodular fue la *Leucaena*, pues a los 40 días después de la siembra dds) (cuadro 5) ya mostraba nódulos mientras que *A. farnesiana*, fue de nodulación intermedia, pues requirió 45-50 días dds, y por *P. glandulosa* presentó una nodulación a los 108 dds.

La interacción simbiótica entre rhizobia y leguminosas resulta en la formación de un nódulo en la raíz donde se realiza la fijación de nitrógeno, es un proceso específico del hospedero. La especificidad del hospedero está ampliamente determinada por la estructura de moléculas señal bacterianas llamadas factores Nod (NF). Todos los NF son lipoquitooligosacáridos, por ejemplo los oligómeros de N-acetilglucosamina, con enlaces de nitrógeno unidos al extremo no reductor del ácido graso (Ovtsyna, 2000). Modificaciones en éstos, pueden cambiar la respuesta específica de nodulación de la hospedera.

Leucaena fue la única especie que presentó inicio de nodulación a la cuarta semana (28 dds), *A. farnesiana* inició la nodulación a los 38 días dds y *P. glandulosa*; la inició a los 108 días dds.

Cuadro 5. Promedio de nodulación presentada bajo condiciones de Invernadero.

Especie	Loc.	No. planta	Corona	Laterales	Altura planta (cm)	Peso raíz (g)	Nodulación (dds)
L	R	1	1	2	10	29	40
L	A	1	0	2	11	24.5	40
L	S	1	3	0	13.2	32.4	40
L	R	2	2	0	12	29	49
L	A	2	1	1	12.5	28.7	49
L	S	2	2	2	13.5	29.5	49
L	R	3	3	3	13	34.2	57
L	A	3	1	2	12.9	31	57
L	S	3	2	0	11.5	32.5	57
M	R	1	0	0	7.5	32.4	40
M	A	1	0	0	6	28.2	40
M	S	1	0	0	6.2	20.7	40
M	R	2	0	0	7.8	33.5	49
M	A	2	0	0	6.5	29	49
M	S	2	0	0	6.7	27.5	49
M	R	3	0	0	7.5	29.8	57
M	A	3	0	0	7.8	31	57
M	S	3	0	0	7.3	32.5	57
H	R	1	0	1	7.4	19.4	40
H	A	1	0	0	8.2	21	40
H	S	1	1	1	8.1	18.5	40
H	R	2	0	0	7.6	20.5	49

Especie L= *L. leucocephala* M= *P. glandulosa* y H= *A. farnesiana*

Localidad R= El Retiro, A= Aquiles Serdán y S= San Pedro

Cuadro 5.continuación.

H	A	2	0	1	8	23.5	49
H	S	2	1	1	7.9	22.8	49
H	R	3	2	3	8.5	21.8	57
H	A	3	3	3	8	27.5	57
H	S	3	3	2	7.9	25.4	57
M	R	1	0	2	.350	9.5	111
M	A	2	1	1	.385	9.3	111
M	S	3	0	0	.420	10.5	111
M	R	1	0	1	.456	11.2	111
M	A	2	0	1	.475	12.3	111
M	S	3	0	2	.435	11	111
M	R	1	1	1	.336	8.9	111
M	A	2	1	0	.347	9.2	111
M	S	3	1	0	.375	9.8	111

Especie L= *L. leucocephala* M= *P. glandulosa* y H= *A. farnesiana*

Localidad R= El Retiro, A= Aquiles Serdán y S= San Pedro

1, 2 y 3 = numero de planta.

Se realizó un análisis de correlación para comprobar si existía relación entre las variables de nódulos por planta, altura, peso de la raíz y período de inicio de nódulos después de la siembra. Se encontraron diferencias significativas entre nódulos por planta y altura de planta indicando que la altura influye en un 43.9% para la

aparición de nódulos en la planta. También se encontró diferencia significativa entre el tiempo de aparición de nódulos y el peso de la raíz, indicando que la nodulación va aumentando a medida que la raíz incrementa su peso ocurriendo una relación positiva entre estas dos variables, tal y como lo señala el coeficiente de determinación (61.58%).

Se considera que la nodulación es común en leguminosas, sin embargo, algunas especies no pueden ser infectadas por rhizobia y por consiguiente no puedan fijar nitrógeno (Obaton, 1983). El 90% de los miembros de la subfamilia Papilinoideae y Mimosideae tienen la capacidad de nodular; en las Cesalpinoideae solo el 30% de los géneros nodulan; esto demuestra que la fijación de nitrógeno es un factor frecuente pero no constante (Mellor, 1994). La interacción compatible entre *Rhizobium* y la leguminosa hospedera, culmina con la formación de una nueva estructura en la planta, el nódulo. La formación de nódulos fijadores de N requiere de un proceso continuo de dos vías, el reconocimiento celular y de señales entre rhizobia y la planta. Tales procesos involucran la activación secuencial y/o represión de genes codificados por la planta y la bacteria (Michiels y Vanderleyden, 1994).

De acuerdo a los resultados presentados por Leidi y Rodríguez (2000) la formación de nódulos y tamaño de éstos se ven afectados por las concentraciones altas de N, sin embargo las concentraciones altas de fósforo favorecen el desarrollo de los mismos.

Toledo (2001, comunicación personal) señaló que la *Leucaena* es una de las especies precoces que nodulan a partir de la 4ª semana, y en general las acacias comienzan a nodular a partir de los 45 días después de la siembra. Por otro lado el Mezquite es una de las leguminosas de climas desérticos que nodulan tardíamente a los 150 días en campo aun cuando presentan condiciones desfavorables como cambios fisiológicos, incluyendo la pequeña disponibilidad de agua, bajo concentración

de nutrimentos en el suelo y altas temperaturas (Thomas *et al.*, 1995). En invernadero el mezquite comenzó a nodular a partir de los 110 dds.

Vásquez-Arroyo (1996) menciona que las condiciones climáticas y edáficas afectan la nodulación de las leguminosas en campo, mostrando una cantidad de nódulos menor que los que se pueden obtener en condiciones de invernadero; ésto concuerda con los resultados obtenidos. Sin embargo en condiciones de invernadero para las especies desérticas no se puede decir lo mismo debido a que mezquite y huizache presentaron muy poca nodulación, un promedio de 5 nódulos por planta, pero la *Leucaena* presentó una fuerte nodulación 30 nódulos promedio por planta a los 120 dds.

Número más probable de rhizobia

A continuación se presenta el cuadro 6, con la información del NMP a los 35 días después de la inoculación.

Cuadro No. 6. Obtención de NMP de rhizobia g^{-1} de suelo de tres sitios de La Región Lagunera. UAAAN-UL. 2001.

Sitio	NMP de Rhizobia g^{-1}
El Retiro	4,360
Aquiles Serdán	5,650
San Pedro, Coah.	28,200

De acuerdo a los resultados obtenidos, el suelo de San Pedro, Coah. mostró la cantidad más alta de rhizobia g^{-1} de suelo y el Retiro, Mpio. de San Pedro, la más baja.

La presencia de cepas rhizobiales nativas es de gran importancia en virtud de que al momento de realizar ensayos de inoculación con cepas introducidas altamente eficientes en fijar nitrógeno fallan por el alto número de rhizobios presentes en el suelo,

lo anterior concuerda con lo señalado por Thies *et al.* (1992). Se ha señalado que la leguminosa hospedera es un factor importante en la determinación de la población asociada. Los resultados, indican que existe una gran cantidad de microorganismos que van desde 26,000 hasta 120,000 g⁻¹ de suelo determinados por el método de NMP (Thurman and Bromfield, 1988).

4.2. Ensayos de campo

Recolección de nódulos en campo

Martínez *et al.* (1990) mencionan que el número mínimo de organismos para nodular en frijol oscila en un rango de 4 a 20 bacterias por planta; a partir de cada nódulo se obtendrá una colonia de bacterias del mismo género pero podrán ocupar el nódulo una o más cepas rizobiales.

El cuadro 7 muestra los resultados obtenidos de la recolección de nódulos en campo.

La localidad donde se encontró el mayor número de nódulos recolectados en campo fue El Retiro con 82 nódulos, 62 para Aquiles Serdán, 51 para San Pedro y 54 para Monterrey, N. L..

A pesar de que el NMP de rizobios por g⁻¹ de suelo para el Retiro resultó ser el más bajo, se puede observar un mayor número de nódulos planta⁻¹, lo que se podría explicar por la posibilidad de que la rizobia está adaptada a las condiciones adversas del clima y suelo.

Cuadro 7. Recolección de nódulos en campo UAAAN-UL. 2001.

Localidad	Especie	Numero de plantas						Nódulos totales	\bar{X}
		1	2	3	4	5	6		
El Reito	H	12	5	3	7	3	3	33	5.5
	M	4	3	6	5	2	5	25	4.2
	L	5	6	3	4	4	2	24	4.0
Aquiles	H	4	6	8	6	6	3	33	5.5
	M	5	8	4	5	3	4	29	4.9
San Pedro	H	5	3	7	5	5	6	31	5.2
	M	2	3	4	4	4	3	20	3.3
Monterrey	L	5	4	4	3	6	6	28	4.6
	C	2	4	5	5	4	6	26	4.3

Localidad R= El Retiro, A= Aquiles Serdán, S= San Pedro y M= Monterrey

Especie H= *A. farnesiana*, M= *P. glandulosa*, L= *L. leucocephala* y C= *A. amentacea*

Por el reducido numero de nódulos encontrados en planta, es posible que las plantas estudiadas presenten un inhibidor de la nodulación, más que la presencia de un activador, fenómeno demostrado en leguminosas por Lee *et al.*, (1991).

El aborto de los cordones de infección es común y varía dependiendo tanto del hospedero como de la bacteria. En algunas asociaciones, por lo tanto únicamente el 1.5% de los cordones de infección llegan a formar nódulos (Irving *et al.*, 2000).

Una vez desarrollados los nódulos, la aplicación de N, puede causar la inhibición de su actividad fijadora de N₂ y, provocar una senescencia prematura (Rodríguez-Navarro, 1996). No obstante, existen diferencias entre las especies y cultivares de leguminosas en cuanto a su sensibilidad a la adición de NO₃.

Los ensayos de campo han demostrado que la nodulación se reduce, aun cuando los suelos presenten buenos niveles de humedad, lo que indica que no solo el agua es un factor determinante en la nodulación (Tsaito *et al.*, 1984), sino que, quizás también estén involucrados otros factores bióticos y abióticos del suelo como el pH, arcillas, elementos químicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.), materia orgánica, entre otros (Graham, 1990). Pereira *et al.*, (1993), señalan que el aumento de nódulos por planta es el resultado de cierta disponibilidad fisiológica-genética de la planta para presentar un mayor número de sitios de nodulación. Los componentes de la simbiosis y nodulación han sido obtenidos por genética clásica (StClair *et al.*, 1986, 1988; Pereira *et al.*, 1989; 1993).

Aislamiento de rizobia

En el cuadro 8 se presentan los aislados obtenidos para cada una de las especies con las que se trabajó así como para las localidades en donde se obtuvieron.

Del total de nódulos (249), solamente se logró obtener 137 aislados lo que implica que debido a que la metodología es destructiva, en este trabajo se tuvieron pérdidas del 45% al momento de realizar los aislamientos, siendo este dato de importancia práctica para futuros experimentos para poder definir el número de nódulos por planta a seleccionar, principalmente para las especies estudiadas ya que la información al respecto es limitada.

Cuadro 8. Aislados obtenidos

LOCALIDAD	ESPECIE	No. DE PLANTA						Total
		1	2	3	4	5	6	aislados
Aquiles S.	<i>A. farnesiana</i>	4	3	4	2	2	1	16
Aquiles S.	<i>P. glandulosa</i>	1	1	2	2	2	1	9
El Retiro	<i>A. farnesiana</i>	3	5	5	4	6	3	26
El Retiro	<i>P. glandulosa</i>	2	3	1	2	1	1	10
El Retiro	<i>L. leucocephala</i>	3	1	2	2	3	3	14
Monterrey	<i>L. leucocephala</i>	2	2	1	2	4	5	16
Monterrey	<i>A. amentacea</i>	1	3	1	3	3	3	14
San Pedro	<i>P. glandulosa</i>	2	5	3	2	4	2	18
San Pedro	<i>A. farnesiana</i>	3	3	2	2	3	1	14
								137

Caballero y Martínez (1999) en un estudio para determinar el efecto de la fertilización sobre la diversidad genética de *Rhizobium* en frijol, aislaron 40 nódulos con alrededor de 4 nódulos por planta, por lo que el total de aislados obtenidos para esta investigación es cantidad suficiente para la continuación del trabajo. Sin embargo Herrera-Cervera *et al.* (1999), mencionan que ellos recolectaron 1000 nódulos para aislamiento de los cuales se tomaron solamente 39 aislados para caracterización de especies de rhizobia presentes en frijol en España.

Martínez y Rosenblueth (1990) analizaron 20 nódulos de 10 plantas, para estudiar la competencia en nodulación en el cultivo de frijol.

En el presente trabajo se recolectaron 249 nódulos, lográndose obtener 137 aislados puros, de éstos 38 aislados pertenecieron a *P. glandulosa*, 51 fueron de *A. farnesiana*, 33 de *L. leucocephala* y 16 de *A. amentacea*.

Inoculación de plantas

Una vez obtenidos los aislados a partir de nódulos, éstos fueron inoculados en plántulas de frijol para confirmar su autenticidad, misma que a pesar de que resulte negativa, no deberá considerarse literalmente como que no es rhizobia, en virtud de que la planta de frijol solamente se emplea como cultivo trampa. Por ser las hospederas de nodulación tardía los aislados pasaran al cepario rhizobial para futuras investigaciones. En el cuadro 9 se muestran las plantas que se inocularon y el resultado positivo y negativo de las mismas.

Cuadro 9. Inoculación de Plantas en solución de Fahraeus (Fahraeus, 1957)

Aislado	Nodulación Confirmada	Aislado	Nodulación Confirmada	Aislado	Nodulación confirmada
AA11	+	AS43	+	LM55	-
AA13	-	AS44	-	LM64	+
AA23	+	AS51	+	LR13a	-
AA31	+	AS53	+	LR14	-
AA33	+	AS54	+	LR31	+
AA42	+	CM11	+	LR51	+
AR12	-	CM21	-	LR52	+
AR12	-	CM22	+	MA21	-
AR13	-	CM36	-	MA33	+
AR25	+	CM43a	-	MA42	-
AR26	+	CM44	+	MA51	+
AR51a	+	CM51	-	MR33	+
AR52	+	CM53	+	MR41	+
AR53	+	CM61	+	MR42	+
AR61	+	CM62	+	MR52	+
AR63	+	CM62b	-	MS21	-
AS13	+	LM25	+	MS23	+
AS24	-	LM31	-	MS32	+
AS25	+	LM42	-	MS34	+
AS31	+	LM43	+	MS53	+
AS32	-	LM52	+	MS62	+

+ =Planta nodulada; - =planta no nodulada.

De acuerdo a los resultados obtenidos las plantas noduladas confirman que pertenecen a rhizobia, no obstante las que no presentan nodulación, no significa que no sean especies de rhizobia debido a que *P. vulgaris* es una hospedera de amplio

rango, pero no todas las especies la nodulan (comunicación personal con la Dra. Esperanza Martínez Romero, 2001).

Diversidad genética.

La movilidad electroforética de enzimas es una de las técnicas más confiables para la identificación y caracterización de especies de rhizobia; por lo tanto, su uso va más allá de la descripción de nuevas especies (Martínez *et al.*, 1991; Piñero *et al.*, 1988; Segovia *et al.*, 1993); diversidad genética (Barrera, *et al.*, 1997; Caballero y Martínez, 1998; Wang, *et al.*, 1999); así como la reclasificación de especies (Segovia *et al.*, 1993).

Los resultados de MLEE, obtenidos por el patrón de bandeo encontrado para los aislados analizados de presentan en los cuadros del 10-13, con su correspondiente dendograma (fig. 1-4).

Cuadro 10. Movilidad electroforética de enzimas No. 1

CEPA	IDH	6GP	IPO	GD2	ALD	MDH	PGM
LR52	6.5	5.8	3	6.5	3.3	6	6
AR53	6.5	5.8	3	6.5	3.3	6	6
LM22	6.3	5.5	-1.0	6	3.3	6	6.2
MR42	6.8	6	3	6.8	3.3	5.8	6
MS53	7.5	7.5	2.5	5.5	2.7	6	6.2
MA33	6.5	5.8	3.3	6.5	3.3	5	4.8
AS51	6.3	5.5	-1.0	6.5	-1.0	6	5.2
LR51	5.5	4.3	4.3	4.3	3.3	6	5
MA51	6.5	6	3.3	2.7	5	4	3.5
AA33a	5	5	4.7	3.7	5	3	3
AS13	9.5	9.5	-1.0	8.5	8.7	8	8
MR33	6	5.5	2.8	4.3	3.3	4	3.5
156'P	6.5	6	3.3	3.3	3.3	3.5	3.5
B. j	6	-1.0	-1.0	2.9	-1.0	2.8	2.5
CFN42	6	5.3	4.8	3.8	6.4	4.8	4.8
S. m	6.5	6	3.3	2.9	-1.0	2.2	-1.0
LR52	6.5	5.8	3	6.5	3.3	6	6
LM22	6.3	5.5	-1.0	6	3.3	6	6.2
MS53	7.5	7.5	2.5	5.5	2.7	6	6.2
LR51	5.5	4.3	4.3	4.3	3.3	6	5
AA33a	5	5	4.7	3.7	5	3	3
AS13	9.5	9.5	-1.0	8.5	8.7	8	8
MR33	6	5.5	2.8	4.3	3.3	4	3.5

Dendograma 1

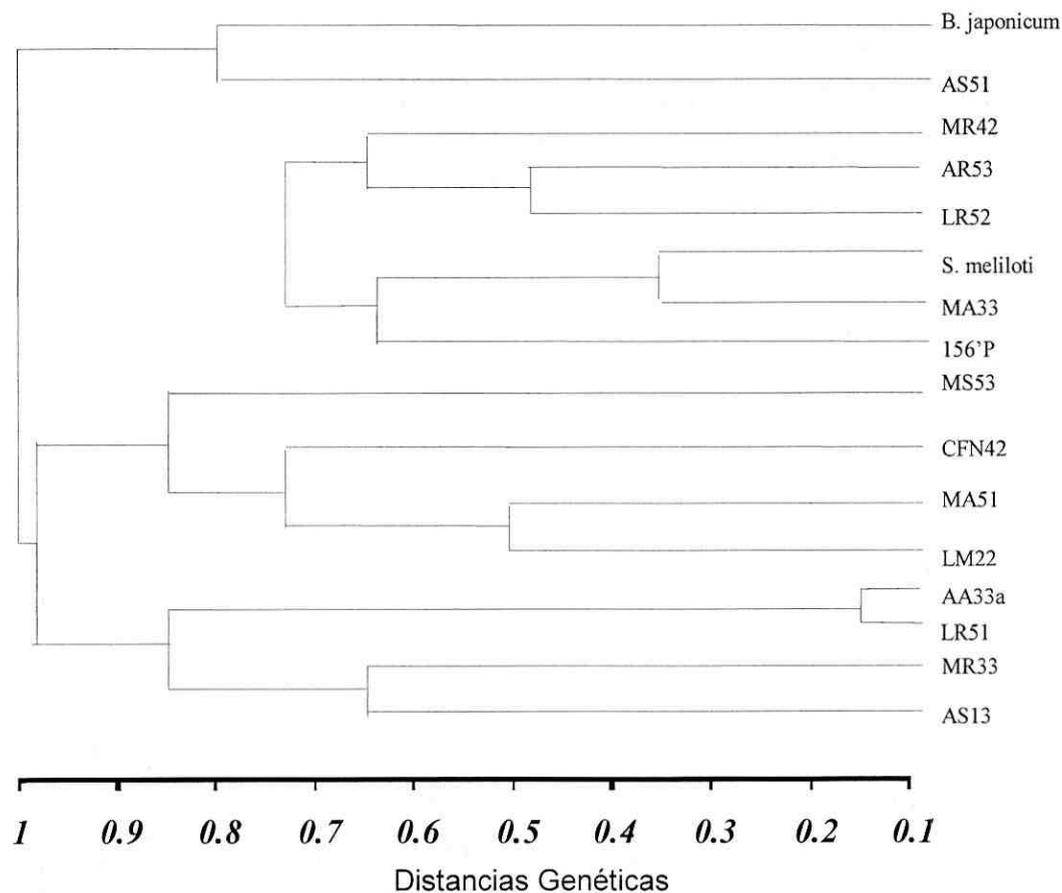


Figura 1. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T)

Cuadro 11. Movilidad electroforética de Enzimas No. 2

CEPA	IDH	6GP	GD2	ALD	MDH	PGM
MS53	1	2.5	2.6	3	3.2	3
MA51	1	2.5	2.8	3.2	3	3
MR42a	3.5	5.5	5	5	4.8	5
MS62	1	2.5	2.3	2.8	6.5	6
AS22	9.5	9	9.3	8.5	7	5
AS13	7.5	6.3	6.2	6	4	4.5
AA33	8	8.3	7.5	7	7.3	7.5
AR53b	7.5	7	7	6.8	5.8	5
CM62	3.2	5.2	5	4.5	4.8	5
CM44	7.5	7	7.3	6.5	6	5.5
LM25	7.5	6.8	6.8	7	6.5	5
LR31a	7	6.5	6.5	7	6.5	6
LR52b	7	6.3	6.2	6.5	7	6.5
156'P	8	7.8	7.6	7.4	7	6.5
S.M	7.5	6.5	5	4.5	6.3	5.8
CFN42	7	6.3	6	6	4	4.5
CFN299	8.5	6.3	5.8	5.8	3.3	3.7
B.J	6.7	5	4.5	4	2.5	2
MR42a	3.5	5.5	5	5	4.8	5
AS13	7.5	6.3	6.2	6	4	4.5
AR53	7.5	7	7	6.8	5.8	5
MA33	1	2.5	2.6	3	3.2	3
CM44	7.5	7	7.3	6.5	6	5.5
MS62	1	2.5	2.3	2.8	6.5	6

Dendograma 2

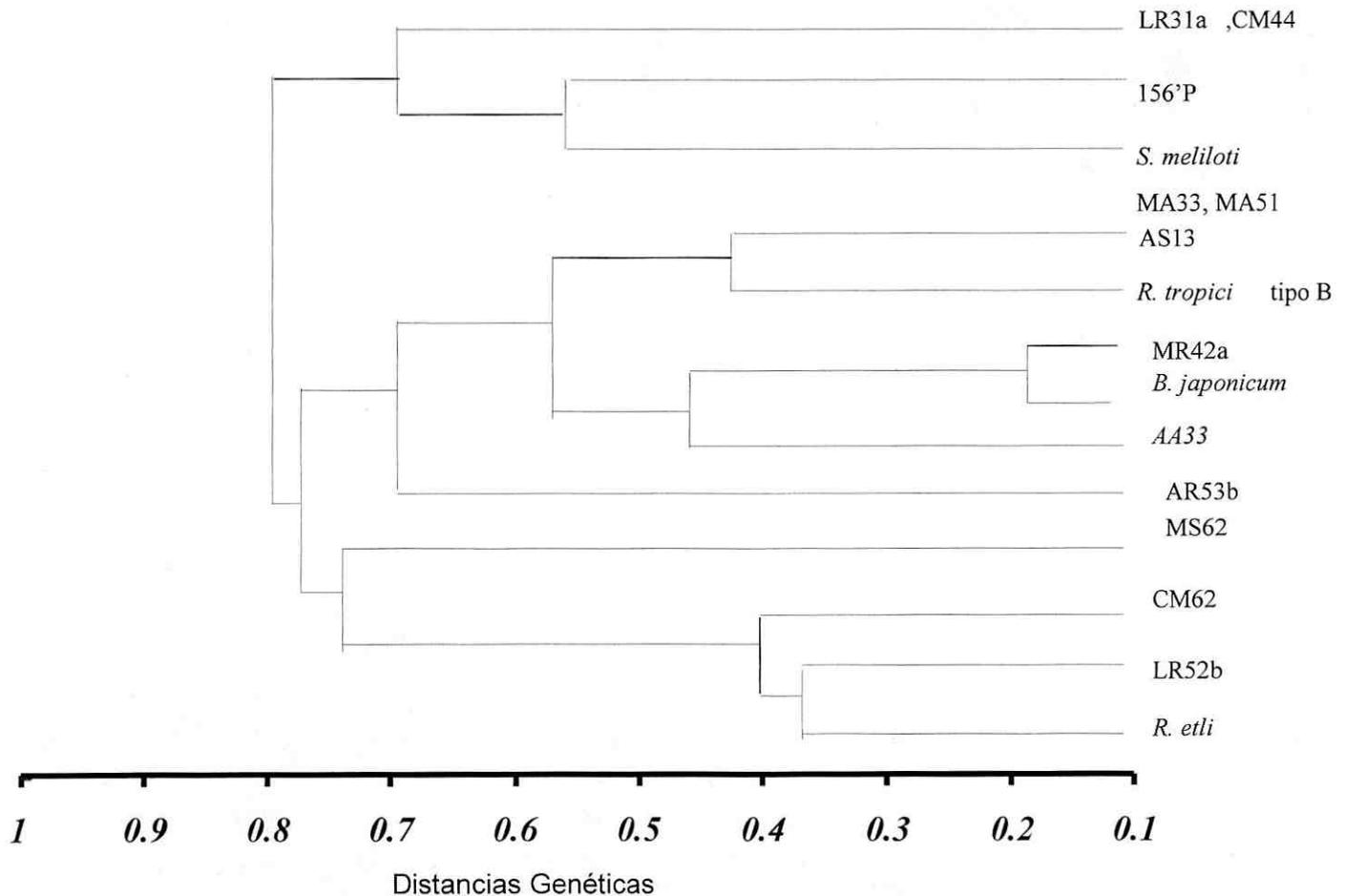


Figura 2. Dendograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), *S. meliloti*, *R. tropici* tipo B (CFN-299^T) *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06) y *Rhizobium etli* (CFN 42^T).

Cuadro 12. Movilidad electroforética de Enzimas No. 3

CEPA	IDH	MDH	GD2	IPO	ALD	6GP	PGM
AA42	7.5	3.5	4	2.8	3	3.5	3.5
AS25	7.5	2.5	3	2	2	4	3.5
AS53	7	3	3.8	3	4	4	2
MR41	7.5	4	6.8	5	4.5	4.3	3.5
MS42	6.8	6.5	5.5	4	4	3.5	2
AR53	9.5	7.5	3.5	2.5	3	6.5	2
CM22	6	9	6.8	5	3	6.5	3.8
AA11	7	5	3.5	2.5	4.5	6.8	3
MS32	7.5	5	3.5	2.5	4	7	2.8
MR21	7.5	6	3.3	-1.0	4	7	2.8
AR44	6	6.5	3.9	2.8	3.5	6	2
CM62a	7.5	6.5	4	2.8	3.5	6	2
AR51a	6	5	3	2	3.5	6.5	3.2
CM53	7.5	5.5	3	2	2	7	2.8
LM25	7	6.5	3.3	2.3	2	6.7	2
LM22	6.8	6.8	3.2	2.3	2	6	2.8
CM61	6.5	6.5	3.1	2	3.5	6	2
AR52	6.8	7.5	2.8	-1.0	2.5	7	2
B.J	7.3	7.5	3.3	2.3	3.5	7	4
156'P	7.5	7	3.5	2.5	3.5	8	4.5
CFN42	7.5	5.5	3.5	3	3.5	8	2
S.M	7	6	3.5	2.5	3	9	4.3
73F	3	3	3.3	2.5	2	8.5	4

DENDOGRAMA 3

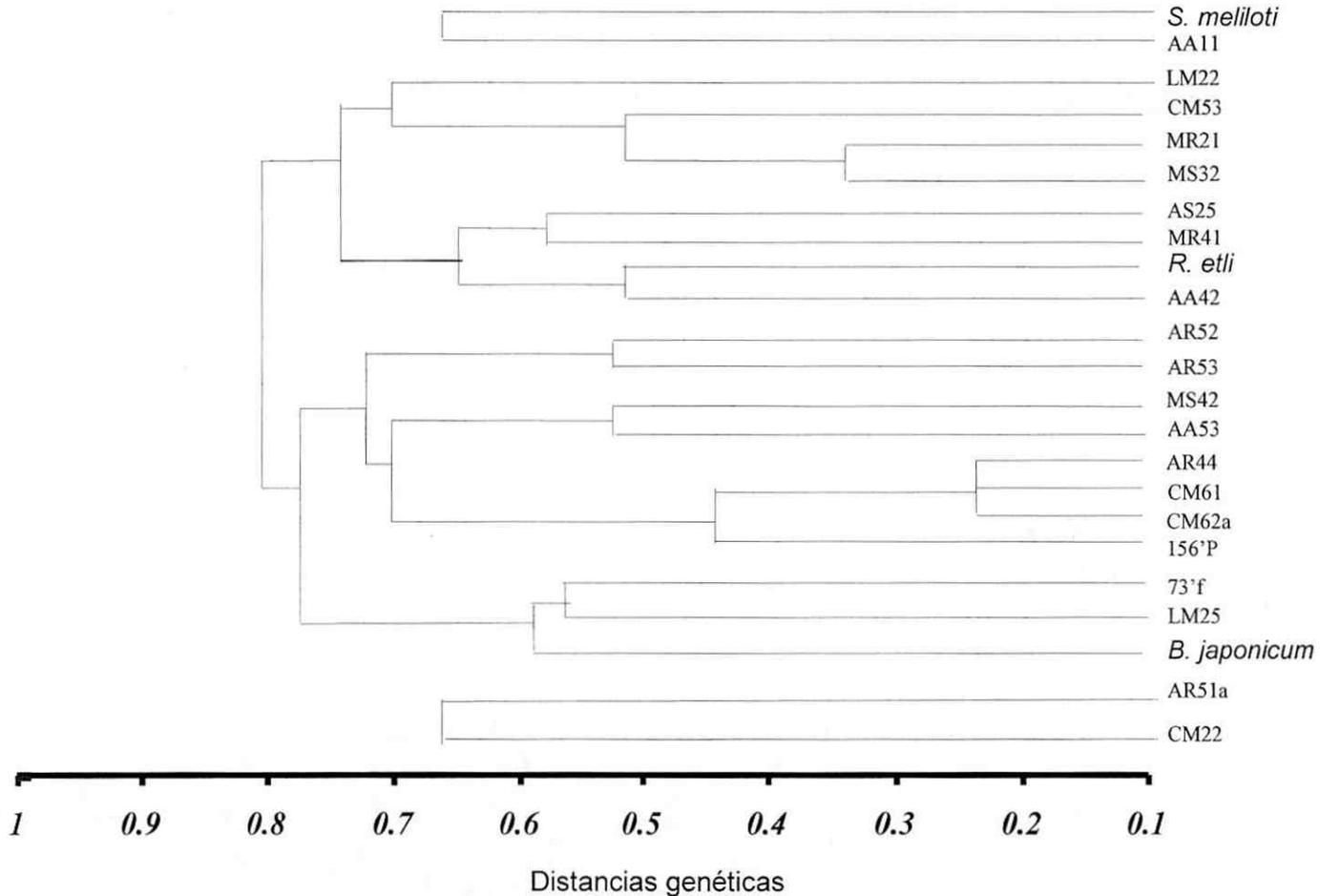


Figura 3. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06).

Cuadro 13. Movilidad electroforética de Enzimas No. 4

CEPA	IDH	GD2	MDH	ALD	PGM	6GP
AA22	6.5	6.5	3	4	6	2.5
AS43	6	6	3	4	6	2
AR26	6.3	6.5	3	4	6	3
MR52	6.5	6.8	7.5	7.5	9	2.5
MS25	6.8	7	7.5	5	5	9
MA12	6	6	4	5.3	5.3	4.3
LM43	5.5	6.5	4	5	5	4
LR33	5.8	6	6.8	2	2	4
CM11	9	9	6.5	5	4	2
CM23	3	3	6.3	7	4.5	3
AA41	5	5	5	5.8	3.2	4.5
LM52	5.5	6	6	5.5	3	4.5
MS53	5.5	6.5	3	7.5	5	3
AA32	5.8	6.5	6.5	4	2.2	2.5
MA42	6	5	6.5	6	3.5	4.5
MS34	6.8	5.5	6	6	3.5	4.5
LM64	7.5	6.5	4	7	4.5	3
CFN299	8.5	6.8	9	7.3	4.8	4.5
156'P	7	6.8	5	7.3	4.8	4
S.M	6.5	5.5	2.5	5.8	4.2	4
B. j	6.8	6	6.8	5	4	4
CFN42	6.5	5.5	3.5	5	4	3.5

DENDOGRAMA 4

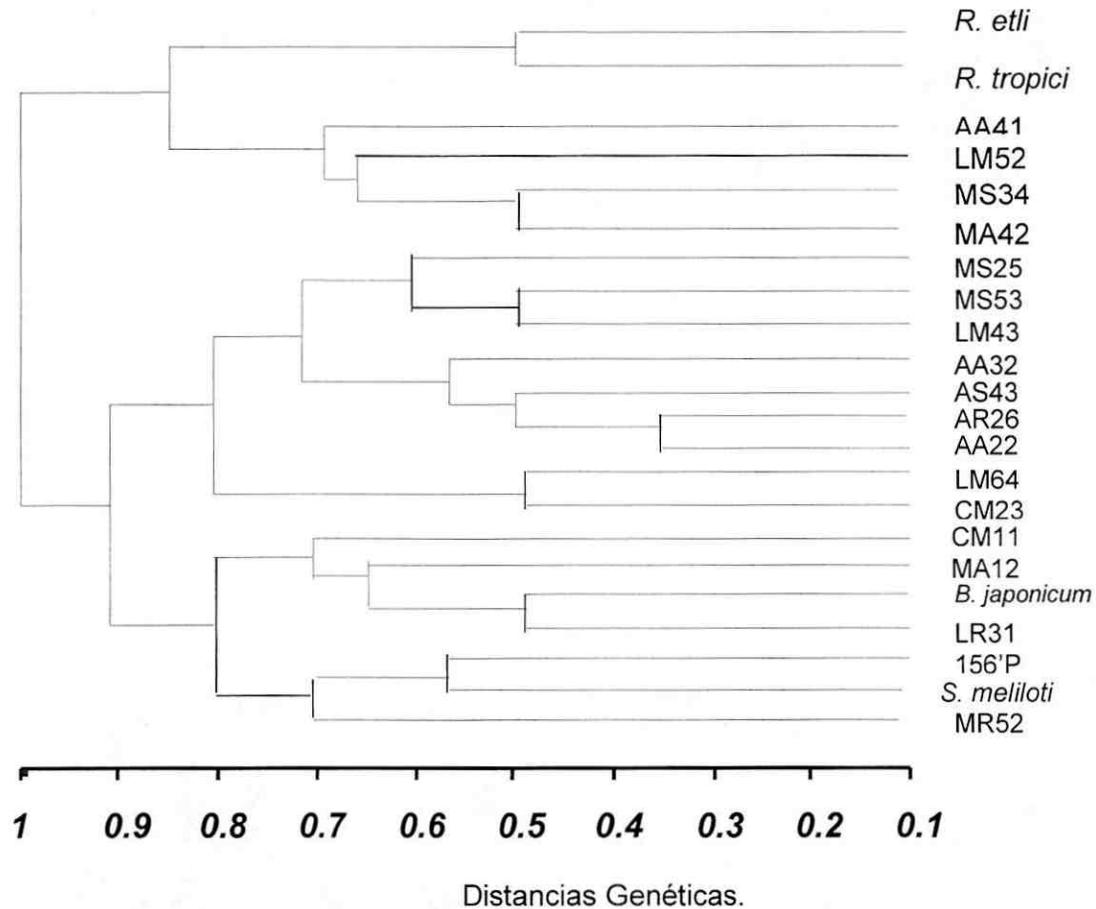


Figura 4. Dendrograma generado del análisis de MLEE con seis enzimas, en aislados obtenidos de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. Se emplearon como cepas de referencia: *S. meliloti*, *Rhizobium etli* (CFN 42^T), un aislado de Acacia (156'P, *Sinorhizobium* sp), 73'f (*Sinorhizobium* sp.) y *Bradyrhizobium japonicum* (USDA-06).

Con los valores obtenidos de la movilidad enzimática, se pudo estimar la diversidad genética media por locus; calculándose de la siguiente manera: $h = 1 - [\sum Xi^2] / [n/(n-1)]$, donde Xi es la frecuencia del i -ésimo alelo en el locus y n es el número de tipos electroforéticos (ET's) en la muestra, H representa la media aritmética de h para cada loci analizado.

El total de ET's para los 81 aislados corridos fueron: 12, 9, 17 y 18 respectivamente para cada dendograma, estos Et's, solamente contienen un aislado, sin embargo el MLEE2, presenta dos electrotipos con dos aislados, lo que indica que son cepas de rhizobia genéticamente idénticas. Cabe destacar que los aislados pertenecen a mezquite de Aquiles Serdán (MA33, MA51) y huizache de San Pedro (AS13) y *leucaena* del Retiro (LR31a) y Chaparro prieto (CM44) que son cepas genéticamente idénticas y que nodulan especies diferentes.

Los resultados indican que cepas de una misma especie pueden nodular al menos dos hospederos diferentes. En general es reconocido que en la rhizobia existen especies promiscuas con un amplio rango de hospederas (Hannin *et al.*, 1999; Perro *et al.*, 2000; Spaink, 2000).

Se puede decir que *Leucaena* es una de las especies en las que se ha encontrado un amplio rango de hospederos (Wang *et al.*, 1999). En anteriores investigaciones se pudieron identificar miembros de los géneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* asociados con *L. leucocephala* (Martínez *et al.*, 1991; Lafay and Burdon, 1998; Gao *et al.*, 1994), datos que se pudieron cotejar puesto que las especies asociadas a *Leucaena* fueron *S. meliloti*, *R. etli*, dos cepas que se encontraron en las cuatro especies estudiadas, así como algunos *Bradyrhizobium*.

Asociaciones de *R. tropici*, *R. etli*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* y las cepas de 156'P con *A. farnesiana* y *A. amentacea*, fueron encontradas incluso también en *P.*

glandulosa, comprobando que una misma cepa nodula dos o más especies, lo que podría significar que las características climáticas y edáficas de los suelos son similares no existe gran variación respecto a la diversidad genética encontrada en ellos. Para las colectas de Monterrey se pudo observar que la tendencia de las especies era muy similar a las especies encontradas en Los municipios de San Pedro Coah.

En estudios realizados con aislados de acacias y *Prosopis spp.* en Sudan y Kenya se reportaron principalmente especies de *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium* (Nick, *et al.*, 1999). En estudios recientes Clapt, *et al.*, (2001) aislaron cepas de rhizobia de *A. mangium* y de *Paraserianthes falcataria* de diferentes regiones de Indonesia, encontrando una asociación principal de *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. lupini*, *B. lianoningense*. Amora y Valdés (1992) encontraron que la rhizobia que nodula Huizache es de crecimiento lento que se asocia a *Bradyrhizobium*, pero también se encontraron especies de *Sinorhizobium* de crecimiento rápido (las colonias aisladas se obtuvieron en 24 hrs).

Por los resultados encontrados de movilidad electroforética de enzimas, se puede destacar las siguientes consideraciones para el caso de la rhizobia asociada con *Acacia*, dado que es de las especies que se cuenta con información. Apoyados por los resultados encontrados por Lafay y Burdon (2001), quienes manifiestan que los aislados obtenidos de nódulos de ésta, pertenecen a tres géneros de rhizobia, en nuestro caso, creemos que es probable que se encuentren presentes los cuatro géneros, dado que encontramos grupos de aislados que no presentan relación con alguna de las cepas de referencia evaluadas en las corridas de geles realizadas. La tendencia antes señalada se observa para los cuatro dendogramas, por ejemplo en la figura 1, encontramos que uno de los aislados se encuentra agrupado con el género *Bradyrhizobium* (AS51), otro a *Sinorhizobium* (AR53) y finalmente dos aislados que no

tienen relación con alguna de las cepas de referencia corridas (AA33a, AS13), cabe notar que los aislados provienen de sitios diferentes (San Pedro, El Retiro, Aquiles Serdán y San Pedro respectivamente). En el caso de la figura 2, se tienen dos aislados (CM44 y LR31a) que se obtuvieron de diferente hospedera (*Acacia* y *Leucaena* respectivamente) y se agrupa en *Shinorhizobium*, tres aislados que representan la misma cepa (AS13, MA33, MA51) obtenidas de dos hospederas diferentes (*Acacia* y *Prosopis* respectivamente); que se agrupan con *Rhizobium tropici* y con *Bradyrhizobium* (AA33). En la figura tres, encontramos un aislado agrupado en *S. meliloti* (AA11), dos a *Rhizobium* (AS25, AA42) y cuatro a *Sinorhizobium* spp especie por definir que se obtuvo de *Acacia* (AR44, AA53, AR52, AR53). La figura 4, encontramos un aislados agrupado con *Rhizobium* (AA41), uno a *Sinorhizobium* (CM11) y cinco asociados en un grupo diferente a las cepa de referencia empleadas en el gel (CM23, AA22, AR26, AS43, AA32).

La diversidad genética media fue de $H=0.824$ que es muy alto, lo que indica que cada aislado que se obtuvo fue una cepa diferente dentro de una misma planta y que varias cepas nodulan la misma hospedera, contrario a lo que se encuentra para frijol en un ambiente semiárido ($H=0.105$) (Vásquez *et al.*, 1998). Para estudios posteriores en esta área, será necesario evaluar la capacidad fijadora de nitrógeno de los aislados, dado que prácticamente estos son diferentes de acuerdo a los resultados obtenidos para cada MLEE1, 2, 3 y 4 siendo $H=0.779$, $H=0.8$, $H=0.863$ y $H=0.856$ respectivamente.

Por lo anterior, destaca el hecho de la confiabilidad de la técnica como un sistema confiable para la caracterización y agrupamiento de aislados que se obtengan de la rhizobia, así mismo, es de esperarse que la diversidad genética sea tan alta, dado que se ha demostrado que las leguminosas estudiadas presentan un amplio rango de hospederos y los datos muestran que es posible que al menos es probable

que los cuatro géneros de rhizobia *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* estén presentes en el área de estudio y que lo constatan estudios previos con las diferentes leguminosas estudiadas (Martínez *et al.*, 1991; Amora y Valdés, 1992; Gao *et al.*, 1994; Lafay and Burdon, 1998; Nick, *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Clapt, *et al.*, 2001; Lafay and Burdon, 2001),

Perfiles de Plásmidos

En el cuadro 14, se observan un total de 95 cepas que se corrieron para obtener el numero de plásmidos presente, de los cuales 28 cepas (26.7%) no presentaron plásmidos, 17 (11.3%) uno; 27 (25.7%) dos; 10 (9.5%) tres; 11 (10.5%) cuatro; y 2 (1.9%) presentaron cinco. De los resultados obtenidos se puede destacar, el hecho de que cepas que fueron aisladas de un mismo nódulo (colonias diferentes de un mismo cultivo) por ejemplo AA31a y AA31b, la primera no presenta plásmidos mientras, que la última presenta cuatro, este hecho también ocurre para AA11a y AA1b; AR31 y AR31b; CM62a Y CM53b; esto probablemente indica que más de una cepa puede ocupar un mismo nódulo; hecho que experimentalmente se demostró en el cultivo de frijol (Dr. Jesús Vásquez Arroyo comunicación personal).

Por los resultados obtenidos, las cepas que presentan el mismo numero de plásmidos no quiere decir que corresponden a la misma cepa, debido a que el peso y distanciamiento de éstos varía; más sin embargo sí se presentaron cepas que presentaban el mismo patrón de plásmidos, podrían corresponden a la misma especie, como sucede en las MA33, MA51 y AS13 y que se agrupan con la especie de *R. tropici* tipo B (figura 2), sin embargo, no es el único caso que se presentó, debido a que tenemos otras cepas que presentan el mismo perfil y corresponden a AA43, AA54 y AR25; otro caso similar se presenta en las cepas AR44, CM61 y CM62a (Figura 3) que

corresponderían a la especie por definir de *Sinorhizobium* spp. asociada a *Acacia* (156'P). Otro caso se presenta de manera similar con la cepa MR42, que no presenta plásmidos y también se asocia más a la especie de *Sinorhizobium* spp. (figura 1).

Ribotipificación

Los resultados se presentan en el cuadro 15 donde se observa que al menos las cepas CM53, MS53 y AS25 no pertenecen a la especie de *R. etli*, de acuerdo con la cepa de referencia empleada como control (CFN42), mismo que se confirma de acuerdo con el resultado de la Figuras 1 y 3, dado que se agrupan dentro de la especie de *R. etli*, pero diferente distancia genética entre una y otra respectivamente.

Cuadro 14. Numero de plásmidos encontrados para rhizobia aislado de cuatro leguminosas del Noreste de México.

Cepa	No. de Plásmidos	Cepas	No. de Plásmidos	Cepas	No. de Plásmidos	Cepas	No de Plásmidos
AA31a	0	MS34	0	AR33	2	AR52b	3
AA32	0	MS51a	0	AR22	2	AS53	3
AA33	0	MS61b	0	AR63b	2	CM42	3
AA41	0			AS22	2	CM43	3
AA11b	0	AA11a	1	AS31	2	CM53a	3
AA21	0	AA23	1	CM22	2	CM62a	3
AR21	0	AR32	1	CM53b	2	LM42	3
AR23	0	AR42	1	CM61	2	MR52	3
AR31	0	AR43	1	CM62b	2	MS12	3
AR31b	0	AR51a	1	LM13	2	MR21c	3
AR41	0	AR53	1	LR13a	2		
AR51b	0	AR61	1	LR42	2	AA31b	4
AR54	0	AS51	1	MA21	2	AA43	4
AR63a	0	LM12	1	MA33	2	AA54	4
CM53	0	LM33	1	MA51	2	AR25	4
LR32	0	LR51	1	MR12	2	AR34	4
MA41	0	LR52a	1	MR21b	2	AR52a	4
MR11	0	MA42	1	MR42	2	AS54	4
MR21	0	MS43	1	MS21b	2	CFN299	4
MR33	0	MS52	1	MS23	2	LR44	4
MS11	0	MS61a	1	MS32	2	MS51b	4
MS33	0			MS42	2	MS62	4
MS13	0	AA22	2	MS62	2		
MS21a	0	AA42	2	S.M	2	CFN42	5
MS22	0	AR11a	2			AA12	5

RIBOTIPIFICACIÓN (PCR)

Cuadro 16. Patrón de ribotipificación presentado por la digestión enzimática.

SAU3A1				RSA1				Hhif1				Hha1			
CM53	MS53	CFN42	AS25	CM53	MS53	CFN42	AS25	CM53	MS53	CFN42	AS25	CM53	MS53	CFN42	AS25
	-		-												
-					-		-		-		-				
-					-				-						-
		-	-					-			-		-	-	-
		-								-				-	-
				-			-								
	-		-	-		-		-			-	-	-		-
	-		-			-	-	-			-	-	-		

De acuerdo al patrón de datos presentado (Cuadro 16), se puede decir que la cepa LM25 podría considerarse como perteneciente a alguna especie de *Sinorhizobium*, diferente de *S. meliloti* y de acuerdo al patrón de bandeo presentado por la cepa de referencia del presente estudio. No obstante la Figura 3 nos agrupa a esta cepa con 73'f (cepa de *Sinorhizobium* spp. aislada de *A. farnesiana*, especie aún no descrita) y también del grupo de *B. japonicum*, por lo cual, la anterior consideración deberá tomarse con reserva.

Cuadro 17. Patrón de Ribotipificación 2.

			Patrón de Restricción					
SAU3A1			Hhif1			Rsau1		
LM25	MR52	<i>S.meliloti</i>	LM25	MR52	<i>S.meliloti</i>	LM25	MR52	<i>S.meliloti</i>
	—							
—	—	—	—	—	—	—		
—		—	—	—	—	—	—	—
				—				—
—		—	—			—	—	—
							—	

De acuerdo con los resultados obtenidos por Laguerre *et al.*, (2001), quienes apoya el punto de vista de que la transferencia lateral de genes a través de las especies de rhizobia y de manera más específica, a través de los géneos *Rhizobium* y *Sinorhizobium* tienen una función clave en la diversificación y estructura de la población natural de la rhizobia, son un apoyo más para considerar la gran diversidad existente y que como se reconoce América es el centro de origen de éstas

leguminosas (*Acacia* y *Prosopis*), se explique la riqueza genética que aquí encontramos.

Un sistema de integración de genes con la función específica de facilitar el intercambio de material genético se ha reportado que se encuentra ampliamente distribuido en bacterias, junto con la evidencia de la presencia de genes funcionales introducidos. El intercambio de genes de mantenimiento o de extensas secuencias son fundamentales para el metabolismo bacteriano, no se han documentado ampliamente, aunque existen tentadores indicadores de esta posibilidad. El intercambio genético representa más del 5% del cromosoma bacteriano e involucra la mayoría de los genes asociados con la simbiosis y se ha demostrado ocurre en la naturaleza (Young, 2001), por lo que se confirma lo antes planteado.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN

- 1.- Existe una amplia diversidad genética de rhizobia asociada a leguminosas nativas que se estudiaron en el noreste de México específicamente en la Región Lagunera ($H=0.824$).
- 2.- Es probable que especies de rhizobia diferentes a las reportadas se encuentren asociadas a leguminosas de la Región Lagunera.
- 3.- Las leguminosas estudiadas presentan una nodulación de 5 nódulos por planta para mezquite, 8 para las acacias y 30 nódulos para *Leucaena* (nodulación baja en comparación con la reportada en la literatura bajo sistema de invernadero).
- 4.- Las cepas aisladas son consideradas de crecimiento rápido (48 horas según los rangos de crecimiento establecido para bacterias).

CAPITULO VII

LITERATURA CITADA

- Abaidoo, R. C., T. George., B. B. Bohlool and P. W. Singlenton. 1990. Influence of elevation and applied nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule occupancy by different rhizobial strains on field-grown soybean and common bean. *Can. J. Microbiol.* **36**:92-96.
- Aceves-Orozco, A. 1983. Tasa de crecimiento de *Rhizobium* en medio de cultivo, suelo y rhizosfera. Tesis de Lic. F. C. B. UANL. Monterrey, N. L. pp. 6-12.
- Alarcón, E. P., A. Lozano Yunda de y H. Chaparro. 1997. Caracterización fenotípica de aislamientos rizobianos de Acacia (*Acacia* sp.) y retamo (*Teline monpessulana*) *Revista Colombiana de Química*. URL: [Hemeroteca.
icfes.gov.co/revistas/recolqu... 97260203art.Htm](http://Hemeroteca.icfes.gov.co/revistas/recolqu...97260203art.Htm).
- Al-Niemi, T. S., M. L. Summers., J. G. Elkins., M. L.Kahn and T. R. Mcdermott . 1997. Regulation of the phosphate stress response in *Rhizobium meliloti* by PhoB. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4978-4981.
- Alquimia. 1991. Las leguminosas Hospederas. Congreso Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. Cuernavaca, Morelos; México. [http://www.
Alquimia.com.ar](http://www.Alquimia.com.ar).

- Amarger, N., V. Macheret and Laguerre, G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. Nov and *Rhizobium giardinii* sp. Nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**:996-1006.
- Amora-Lazcano, E y M. Valdés. 1992. Similitud y diferencias fisiológicas de los rhizobia que nodulan al Huizache (*Acacia pennatula*). Rev. Lat-amer. Microbiol. **34**:197-204.
- Anónimo. 1997. Fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas. Instituto de Recursos Naturales. <http://www.colpos.mx/RENAT/eda643.htm>.
- Anónimo. 1997. Inoculación de leguminosas. la fijación biológica del nitrógeno. El nitrógeno, las leguminosas y los rhizobios. <URL:fp.chasque.apc.org:8081/microlab/Manual/2-1.htm>.
- Anónimo. 1998. Hoja Informativa. Una guía útil para los árboles de uso múltiple. FACT 98-01S. *Leucaena leucocephala*: Un árbol versátil fijador de nitrógeno. URL: www.winrock.org/forestry/factpub/Spleucaena.htm
- Anónimo. 1998. Leguminosas. www.orstom.sn/docu/echange/num11/art3.html
- Asir Jr. , C. A., M. Kubota, V. K. Chebotar, H. Ohta, Y. Arima, K. Nishiyama, T. K-I, and S. Akao. 2000. Endophytic bacterial population in Philippine sugarcane cultivars and isolation of nitrogen-fixing strains. Microb. Environ. **15**:209-216.
- Barrera, L. L., M. E. Trujillo., M. Goodfello; F. J. García., I. Hernandez-Lucas., G. Dávila., P. van Berkum and E. Martínez-Romero. 1997. Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. International J. System. Bacteriol. **47**:1086-1091.

- Bauer, T. 1998. Microorganism Fixing of Nitrogen: Family Rhizobiaceae. Review. Universities Erlanger-Nuremberg, Germany.
- Berg, D. E., N. S. A. Kaopyants and D. Kersulyte. 1994. Fringerprint microbial genomes using RAPD or AP-PCR Meth. Mol. Cellular Biology **5**:13-24.
- Boncompagni, E., M. Osteras., M. C. Poggi and D. Le Rudulier. 1999. Ocurrance of *Choline* and *Glycine betaine* Uptake and metabolism in the family Rhizobiaceae and their roles in osmoprotection. Appl. Environ Microbiol. **65**:2072-2077
- Boonkerd, N. And R. W. Weaver. 1982. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Appl. Environ. Microbiol. **43**:585-589.
- Brockwell, J. 1982. Application of legume seed inoculants. A treatise of dinitrogen fixation. In: C. Sidney and S. Carrey editors Section IV. pp. 277- 309.
- Caballero-Mellado J. and E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity. Symbiosis **26**:111-121.
- Caldwell, B. E. and H. G. Vest. 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the macrosymbiont. A treatise of dinitrogen fixation. Review. pp 557-576.
- Carranza P. M. A y J. A. Villareal Q. 1997. Leguminosas de Coahuila, México. Claves y Descripciones de Especies. UAAAN. Saltillo Coah., México. pp 1-58.
- Clapp, J. P., I. Mansur., J. C. Dodd and P. Jeffries. 2001. Ribotyping of rhizobia nodulating *Acacia mangium* and *Paraserianthes falctaria* from different geographical areas in Indonesia using PCR-RFLP-SSCP (PRS) and sequencing. Environ. Microbiol. **3**:273-280.

- Cooper, J. E. 1979. Rapid method for counting antibiotic-resistant rhizobia in soil. *Soil Biol. Biochem.* **11**:433-435.
- Cubero.1983. Leguminosas de grano. Ediciones mundi prensa. México, D. F. pp. 69-93.
- Chen, W., E. Wang., S. Wang., and. Li., X. Chen and Y. Li. 1995. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. Nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:153-159.
- Chen, W. X., Z. Y. Tan., J. L. Gao., Y. Li and E. T. Wang. 1997. *Rhizobium hainanense* sp. Nov., isolated from tropical legumes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:870-873.
- Dazzo, F.B. and D.H. Hubbell. 1975. Antigenic differences between infective and non infective strains of *Rhizobium trifolii*. *Appl. Microbiol. Aus.* **30**:172-177.
- de Lajudié, p. 1994. polyphasic taxonomy of rhizobia; emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. Nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:715-733.
- Dreyfus, B., J. L. García and M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:89-98.
- Dudman, W.F. 1977. Serological methods and their application to dinitrogen fixing organisms. *A treatise of dinitrogen fixation.* **21**:487-508.

- Dughri, M. H. and P. J. Bottomely. 1983. Effect of acidity on the composition of an indigenous soil population *Rhizobium trifolii* found in nodules of *Trifolium subterraneum* L. Appl. Environ. Microbiol. **46**:1207-1213.
- Dunn, F. M. 1998. Tricarboxylic acid cycle and anaplerotic enzymes in rhizobia. FEMS Microbiol. Rev. **22**:105-123.
- Duque, F. F., M.C.P. Neves; A. A. Franco., R. L.. Victoria and R. M. Boddey. 1985. The responses of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. Plant Soil **88** :333-343.
- Eardly, B. D. L. A. Materon., N. H. Smith., D. A. Johnson., M. D. Rumbaugh and R. K. Selander. 1990. Genetic structure of natural populations of the nitrogen fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ Microbiol. **56**:187-194.
- Erlich, H. A. 1989. Basic Methodology in: PCR technology principals and application for DNA amplification. In H. A. Erlich (ed). Stockton press. USA. pp 1-6.
- Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. **16**:374-381.
- Fisher, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in bacteria. Microbiol. Rev. **58**:352-386.
- Gao, J. L., J. G. Sun., and Li., T. Wang and X. Chen. 1994. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. Inter. J. of Syst. Bacteriol. **44**:151-158.
- Garcia, de los Santos, A., S. Brom and D. Romero. 1996. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. World J. Microbiol. Biotech. **12**:119-125.

- Graham, P. H. and C. A. Parker .1966. Manganese toxicity effects on nodulation and nitrogen fixation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in acid soils. *Plant soil.* **24**:153-166.
- Graham, P. H. and C. A. Parker. 1964 Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil* **20**:383-396.
- Graham, P. H. M. J. Sadowsky., H. H. Keyser., Y. Barnet., R. S. Bradley., J. E. Cooper., D. J. Ley de., B. D. W. Jarvis., E. B. Roslycky., B. W. Strijdom and J. P. young. W. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root and stem nodulating bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:582-587.
- Gussin, G.N., C. W. Ronson and F. M. Ausubel. 1986. Regulation of nitrogen fixation genes . *Ann. Rev. Genet.* **20**: 567-591
- Güttfert, M. 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 39-64.
- Ham, G. E., V. B. Cardwell and H. W. Johnston. 1971. Evaluation of *Rhizobium Japonicum* inoculant in soil containing naturalized populations of rhizobia. *Agron. J.* **63**:301-303.
- Haukka, K. 1997. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Doctoral Dissertation. Department of Applied Chemistry and Microbiology. University of Helsinki. Hakapaino Oy, Helsinki. pp 1-50.
- Herrera Cervera, J. A., J. Caballero Mellado., G. Laguerre., H. V. Tichy., N. Requena., N. Amarger., E. Martínez Romero., J. Olivares and J. Sanjuan. 1999. At least

five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. FEMS Microbiol. Ecol. **30**:87-97.

Hungria, M. and M. C. Neves. 1986. Interacao entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpe de *Rhizobium* na fixacao e transporte de nitrogenio. Pes. Agrop. Bras. **21**:127-137.

Hynes, M. F. and N. F. McGregor. 1990. Two plasmid than nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. Mol. Microbiol. **4**:567-574.

Hynes, M. F., R. Simon., P. Müller., K. Niehaus., M. Labes and A. Pühler. 1996. The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. Mol. Gene. Genet. **202**:356-362.

Irving, H. R., N. M. Boukli., N. M. Kelly and W. J. Broughton. 2000. Nod-factors in symbiotic development root hairs. In root hairs. Cell and Molecular biology. R. W. Ridge, A. M. C. Emons, eds. Springer-Verlag. Tokyo, Japan. **15**:241-265.

Jarvis, B. D. W., C. E. Pankhurst and J. J. Pater. 1982. *Rhizobium etli*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. **32**:378-380.

Jarvis, B. D. W., H. L. Downer and W. J. P. Young. 1992. Phylogeny of fast growing soybean nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**:93-96.

Jarvis, B. D. W., P. van Berkum., W. X. Chen., S. M. Nour., M. P. Fernandez, J. C. Cleyet Marel and M. Gillis. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*,

Rhizobium ciceri, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium thianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. Int. Syst. Bacteriol. **47**:895-898.

Jenkins, M. B., R. A. Virginia and W. M. Jarrel. 1989. Ecology of fast growing and slow-growing mezquite nodulating rhizobia in Chihuahua and Sonoran desert ecosystems. Soil Sci. Soc. Am. J. **53**:543-549.

Jenkins, M. B., W. M. Jarrel and R. A. Virginia. 1987. Rhizobial ecology of the woody legume mezquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran desert. App. Environ Microbiology. **33**:36-40.

Johnson, D. A., M. D. Rumbaugh and K. J. Assay. 1981. Plant Improvement for semi-arid range lands: possibilities for drought resistance and nitrogen fixation. Plant Soil. **58**:279-303.

Jordán, D. C. 1984. Family Rhizobiaceae. En Bergery's Manual of determinative bacteriology. Eight edition. (R. E. Buchanan and N. E. Gibbon editors) Williams and Wilkins Baltimore, USA.

Josey, D.P. J. L. Beynon., A. W. B. Johnston and J. F. Beringer. 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance". J. Appl. Bacteriol. **46**: 343-350.

Klusa, R. A., W. J. Kenworthy and D. Weber. 1986. Soil temperature effect on competitiveness and growth of *Rhizobium japonicum* and on *Rhizobium* induced chlorosis of soybeans. Plant Soil **65**:201-207.

Kuykendall, L. D., B. Saxena., T. E. Devine and S. E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. J. Bacteriol. **175**:613-622.

- Kuykendall, E. A., W. R. Root., K. E. Dashiell and J. Hohenberg. 1984. Breeding of soybeans for the tropical captable of nodulating effectively with indigenous *Rhizobium* spp. *Plant and Soil*. **82**:387-396.
- Lafay, B., and J. J. Burdon 2001. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl Environ Microbiol*. **67**:396-402.
- Lafaye, B. and J. J. Burdon. 1998. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. *Appl. Environ Microbiol*. **64**:3989-3997.
- Laguerre, G., M. Bardin and N. Amarger. 1993. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hibridization. *Can. J. Microbiol*. **39**:1142-1149.
- Laguerre, G., P. Mavingui., M. R. Allard., M. P. Charnay., P. Louvrier., S. I. Mazurier., G. L. Rigottier and N. Amarger. 1996. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environ Microbiol*. **62**:2029-2036.
- Laguerre, G., S. M. Nour, V. Macheret, J. Sanjuan, P. Drouin, and N. Amarger 2001. Classification of rhizobia based on nodC and nifH gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*. **147**:981-93.
- Lanusse, M. 1997. Cuaderno de actualización técnica. CREA INTA. Leguminosas. URL:fp.chasque.apc.org:8081/microlab/LMSCI/Manual/2-2.htm)

- Lee, S. H., D. A. Ashley and H. R. Baerna. 1991. Regulation of nodule development in supernodulating mutants and wild type soybean. *Crop Sci.* **31**:688-693.
- Leidi, E. O. and D. N. Rodríguez Navarro. 2000. Nitrogen and phosphorous availability limit N₂ fixation in bean. *Res. New Phytol.* **147**:337-346.
- Lincon, R. J., G. A. Boxshall y P. F. Clarck. 1995. Diccionario de ecología, Evolución y Taxonomía. Fondo de cultura Económica, México. D.F.
- Long, S. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**: 203-214.
- Ludwing, W. and K. H. Shleifer. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequences analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**:155-173.
- Maldonado Aguirre, L. J y F. E. Garza P. de la. 2000. El Mezquite en México rasgos de Importancia productiva y necesidades de desarrollo. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds). El mezquite árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. pp 37-50.
- Martínez Romero, E., M. A. Pardo., R. Palacios and M. A. Cevallos. 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.
- Martínez, M. 1979. Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México. p 269.
- Martínez Romero, E. 1994. Recent Developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and soil.* **161**:11-20.

- Martínez Romero, E. and Caballero-Mellado, J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Critical Review in Plant Sci.* **15**:113-140.
- Martínez Romero, E. and M. Rosenblueth. 1990. Increased *bean* (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. *Appl. Environ Microbiol.* **56**:2384-2388.
- Martínez Romero, E., D. Romero and R. Palacios. 1990. The *Rhizobium* genome. *CRC Critical Review Plant. Sci.* **9**: 59-93.
- Martínez Romero, E., F. Segovia., F. Martins-Mercante., A.A. Franco., P. Graham and M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp trees. *Intr. J. Syst. Bacteriol.* **41**:417-426.
- McNeely, J.A., K.R. Miller, W.V. Reid, R.A. Mittermeir and T.B. Werner. 1990. *Conserving the world's biological diversity.* World Bank Washington.
- Mellor, R.B. 1994. *The nodulation of legumes.* Copenhage. Doctoral Thesis. University of Copenhae.
- Mercado Blanco J. and N. Toro. 1996. Plasmid in rhizobia: the role of non symbiotic plasmid. *Mol. Plant Microbe Interaction.* **7**: 533-545.
- Michiels J. and J. Vanderleyen. 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N₂-fixing root nodule. *World J. Microbiol. Biotech.* **10** :612-630.
- Moreira, F. M. S., M. Gillis., B. Pot., K. Kersters and A. A. Franco. 1993. Characterization of rhizobia isolated from deferent divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. *Sysem Appl. Microbiol.* **16**: 135-146 p.

- Munsell soil Color Charts. Edition revised 1990. Macbeth division of kollmorgen instruments corporation. 2441 north Calvert street. Baltimore, Maryland 21218. U. S. A.
- National-Research-Council 1994. Biological Nitrogen Fixation. Research Challenges - A Review of Research Grants Funded by the U.S. Agency for International Development. National Academy Press, Wasington, D.C.
- Nick, G. and K. Lindström. 1994. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and Identify the DNA obtained by sinicating the liquid culltures and root nodules. System Appl. Microbiol. **17**:265-273.
- Nick, G., P. Lajudie de., B. D. Eardly., S. Suomalainen., L. Paulin., X. Zhang., M. Gillis and K. Lindström. 1999. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous tree in Sudan and Kenya. Inter. J. Syst. Bacteriol. **49**:1359-1368.
- Noel, K. D., F. Sánchez, L. Fernández, J. Leemans, and M. A. Cevallos. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. J. Bacteriol. **158**:148-155.
- Nour, S. M., J. C. Cleyet-Marrel., P. Normand and M. Fernandine. 1995. Genomio heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arientium* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**:640-645.

- Nour, S. M., M. P. Fernandez, P. Normand and J. C. Cleyet Marel. 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Ciceri arietum* L.)
Int. J. Syst. Bacteriol. 44:511-522
- Obaton, M. 1983. General information on nitrogen fixing symbiosis *Rhizobium*-legume.
FAO/GRET. pp 1-4.
- Olalde Portugal, J. T. Frías Hernández., A. L. Aguilar-Ledesma, N. Pescador y L. I. Aguilera-G. 2000. Caracterización microbiológica de suelos de Islas de Fertilidad de Mezquite [*Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex. Wild) M. C. Johnst.] en ambientes semiáridos. En: Frías Hernández J. T., V. Olalde-Portugal y E. J. Vernon-Carter (Eds). El Mezquite, árbol de usos múltiples. Estado actual del conocimiento en México. Universidad de Guanajuato, México. pp 95-107.
- Pastorini, D.1992. Métodos de identificación de rizobios. ALAR. **16** :12-20.
- Pereira P. A. A., B. D. Miranda., J. R. Attewell., K. A. Kmiec and F. A. Bliss. 1993. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L).
plant Soil **148**:203-209.
- Perret, X., C. Staehelin and W. J. Broughton. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity . Microbiol. Mole. Biology Rev. **64**:180-201.
- Piñero, D., E. Martínez and R. K. Selander. 1988. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2825-2832.

- Quiroga G. M. M. 1989. Fijación biológica de Nitrógeno: proceso simbiótico. Seminarios Técnicos. Vol. 6. No. 3. CIAN. Comarca Lagunera. pp 1-6.
- Rodríguez-Navarro, D. 1996. Efectos del nitrato sobre la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. VII reunión nacional de fijación de nitrógeno. Sevilla, España.
- Sanjuán, J. and J. Olivares. 1989. Implication of *nifA* in regulation of genes located on a *Rhizobium meliloti* cryptic plasmid that affect nodulation efficiency. J. Bacteriol. **171**: 4154-4161.
- Scholla, M. H, and G. H. Elkan. 1984. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**:484-486.
- Schwinghamer, E.A. 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. A treatise of dinitrogen fixation. pp 577-622.
- Schwinghamer, E.A.1985. Fijación simbiótica de nitrógeno: bioquímica, biología molecular y perspectivas de la ingeniería genética. Prospectiva de la Biotecnología en México. pp. 413-433.
- Segovia, L. D., R. Piñero; R. Palacios and E. Martínez-Romero. 1991. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:426- 433.
- Segovia, L., J. P. V., Young and E. Martínez-Romero. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Inter. J. Syst. Bacteriol. **43**:373-37.

- Selander, R. K., D. A. Caugant., H. Ochman., J. M. Musser., M. N. Gilmour and T. Whittam. 1986. Methods of Multilocus enzyme electroforesis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ Microbiol.* **51**:873-884.
- Sessitsch, A. 1997. Molecular markers to study competition and diversity of *Rhizobium*, Thesis Desertion Doctoral. Landbouw universiteit Wageningen. pp 1-159 .
- Singlenton, P.W. and J. W. Tavares. 1986. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ Microbiol.* **51**:1013-1018.
- Somasegaran, P. And H. J. Hobell. 1985. Methods in Legume-*Rhizobium* technology. Review. NifTal Hawaii. USA.
- Soto, M.J., Zorzano, A., Mercado-Blanco, J., Lepek, V., Olivares, J. and Toro, N., 1993. Nucleotide sequence and characterization of *Rhizobium meliloti* nodulation competitiveness genes *nif*. *J. Mole. Biol.* **229**:570-576.
- Souza, V., L. Eguiarte., G. Ávila., R. Cabello., C. Gallardo., J. Montoya and D. Piñero. 1994. Genetic structure of *Rhizobium etli* bv phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1260-1268.
- StClair, D.A., J. J. Wolyn., J. Dubois., R. H. Burrisand and F. A. Bliss. 1988. Field comparison of nitrogen fixation determined with nitrogen-15-depleted and nitrogen-15-enriched ammonium sulfate in selected inbred backcross lines of common bean. *Crop Sci.* pp 30-35.

- Stevenson, F. J. 1965. Origin and distribution of Nitrogen Soil in: Soil nitrogen. Bartholomew, W. V. and E. F. Clark (editors). Number 10 in series of Agronomy. American Society of Agronomy. Inc. Publisher Madison Wisconsin, U.S.A. pp. 1-4.
- Tan, Z.-Y., F.-I. Kan, G. X. Peng, E.-T. Wang, B. Reinhold-Hurek, and W. X. Chen. 2001. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:909-914.
- Terefework, Z., G. Nick., S. Soumalainen., L. Paulin and K. Lindröm. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galgae* with respect to other rhizobia and agrobacterium. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **48**:349-356.
- Thies, J.E., P.W. Singleton and B.B. Bohlool. 1992. Environmental effects of competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. *Can. J. Microbiol.* **39**:493-500.
- Thomas, P. M., K. F. Golly., J. W. Zyskind and R. A. Virginia. 1994. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1146-1153.
- Thomas, P. M., F. Kouakou., R. Golly., A. Virginia and J. W. Zyskind. 1995. cloning of nod gene regions from mesquite rhizobia and bradyrhizobia and nucleotide sequence of the nodD gene from mesquite rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3422-3429.

- Thurman, N. P. and E. S. Bromfield. 1988. Effect of variation within and between *Medicago* and *Mellilotus* species on the composition and dynamic of indigenous populations of *Rhizobium meliloti*. *Soil. Biol. Biochem.* **20**:31-38.
- Thurman, N.P., D. M. Lewis and D. Gareth Jones. 1985. The relationships of plasmid number to growth, acid tolerance and symbiotic efficiency in isolates of *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bacteriol.* **58**:1-6.
- Triplett E. W. and T. M. Barta. 1987. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* T24 on clover. *Plant Physiol.* **85**:335-342.
- Toro, N. and J. Olivares. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen.* **202**:331-335.
- Tsaito, S. M., P. M. Da silva., W. L. Cabezas and R. Bonnetti. 1984. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. *Plant soil* **152**:93-101.
- van Berkum, P., R. E. Tully and D. L. Keister. 1995. Nonpigmented and bacteriochlorophyll-containing bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:623-629.
- Van Rensburg, H. J. and B. D. Strijdom. 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:127-131.

- Van Rossum, D., F.P. Schuurman, M. Gillis, A. Muyotcka, H.W. Van Verseveld, A.H. Stouthammer y F.C. Boogerd. 1995. Genetic and phenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulation peanut (*Arachys hypogaea* L.) roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1599-1609.
- Vásquez-Arroyo, J. 1996. Fijación biológica de nitrógeno en Frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas de *Rhizobium*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. México.
- Vásquez-Arroyo, J., A. Sessitsch., E. Martínez-Romero; J. J. Peña-Cabriales. 1998. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* sp on different cvs. of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil.* **204**:147-154.
- Velásquez, E. P., F. Mateos., N. Velasco., F. Santos., P. A. Burgos., P. Villadas., N. Toro and E. Martínez-Molina. 1999. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. *Soil Biol. Biochem.* **31**:1039-1047.
- Velásquez, E., J. M. Igual, A. Willems, M. P. Fernández, E. Muñoz, P. F. Mateos, A. Abril, N. Toro, P. Normand, E. Cervantes, M. Gillis, and E. Martínez-Molina. 2001. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1011-1021.
- Vincent, J.M. 1975. Manual práctico de rizobiología. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Viprey, V., X. Perret, and W. J. Broughton 2000. Host-plant invasion by rhizobia. *Subcell Biochem.* **33**:437-56.

- Wang, E. T., and E. Martinez-Romero 2000. *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* Nodulation in Flooded Soils and Comparative Characterization of *S. herbacea*-Nodulating Rhizobia in Different Environments. *Microb Ecol.* **40**:25-32.
- Wang, T., M. A. Rogel., A. Garcia Santos de los., J. Martínez Romero., M. A. Cevallos and E. Martínez Romero. 1999. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *Inter. J. System Bacteriol.* **49**: 1479-1491.
- Weaver, R.W. and S.F. Wright. 1987. Variability in effectiveness of rhizobia during culture an nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2972-2974.
- Wheatcroft, R., D. G. McRae and R. W. Miller. 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect super coiled plasmid during bacteroid development. *Mol. Plant Microbe Inter.* **3**:9-17.
- Willems, A., F. Doignon-Bourcier, J. Goris, R. Coopman, P. de Lajudie, P. De Vos, and M. Gillis. 2001. DNA–DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1315-1322.
- Xu, L. M., C. Ge., Z. Ciu., J. Li and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**:706-711.
- Young, J. M. 2001. Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:945-953.
- Young, J.P.W. 1994. All those new names : an overview of the molecular phylogeny of plant associated bacteria. *Advances Mol. Gen. Genet Plant Microbe Int.* **3**:73-80.
- Zaharan, H.H. 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol.* **63**:968-989.

- Zapata, F. and S. K. A. Danso. 1984. Field evaluation of symbiotic nitrogen fixation by rhizobial strains using ^{15}N -methodology. *Plant Soil*. **82**: 369-375.
- Zerhari, K., J. Aurag, B. Khbaya, D. Kharchaf, and A. Filali-Maltouf 2000. Phenotypic characteristics of rhizobia isolates nodulating acacia species in the arid and Saharan regions of Morocco. *Lett Appl Microbiol*. **30**:351-7.
- Zhang, X. X., S. L. Turner, X. W. Guo, H. J. Yang, F. DeBelle, G. P. Yang, J. Denarie, J. P. Young, and F. D. Li 2000. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity *Appl Environ Microbiol*. **66**:2988-95.
- Zhang, Z., G. Nong., F. Hu., X. Zhang., X. Zou., J. Zhou., F. Li and H. Chen. 1995. The symbiotic plasmid and nodulation genes in *Rhizobium Huakuii* Chen, pp. In Tikhonovich I. A. Provoron, N. A., Romanov, V. I. and Newton, W. E. (eds) nitrogen fixation: fundamental also and applications. Kluwer Academic Publisher, The Netherlands.