



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO DE ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE
DE BACTERIAS APLICABLES EN EL
DESARROLLO AGRÍCOLA SOSTENIBLE EN CHIHUAHUA**

LINA HERNÁNDEZ FLORES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PUEBLA, PUEBLA

2011



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ


CAMPUS PUEBLA

CAMPUE-43-2-03


CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Lina Hernández Flores** alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Dr. Engelberto Sandoval Castro** por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Aislamiento y evaluación del potencial biofertilizante de bacterias aplicables en el desarrollo agrícola sostenible en Chihuahua**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla noviembre de 2011



Lina Hernández Flores
Nombre y Firma



Dr. Engelberto Sandoval Castro
Vo. Bo. Profesor Consejero
Nombre y Firma


La presente tesis, titulada: **Aislamiento y evaluación del potencial biofertilizante de bacterias aplicables en el desarrollo agrícola sostenible en Chihuahua**, realizada por la alumna: **Lina Hernández Flores**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. ENGELBERTO SANDOVAL CASTRO


DIRECTORA DE TESIS:


DRA. MARIA DEL CARMEN VILLEGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:


DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:


DR. MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ

Puebla, Puebla, noviembre de 2011

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOFERTILIZANTE DE BACTERIAS APLICABLES EN EL DESARROLLO AGRÍCOLA SOSTENIBLE EN CHIHUAHUA

Lina Hernández Flores, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2011

El impacto ecológico es importante en los sistemas de producción y el uso de productos amigables con el medio ambiente es elemental para preservar y mantener los recursos naturales. Así, la aplicación de biotecnologías, como el uso de microorganismos benéficos, permite sustituir de manera parcial o total la fertilización nitrogenada. Para ello, es importante la adecuada selección de microorganismos aplicables a diferentes cultivos y condiciones edafoclimáticas como fertilizantes biológicos. El interés de desarrollar una investigación acerca de estas bacterias es el de poder utilizarlas eficientemente en la agricultura. Por ello, se aislaron cepas bacterianas de nódulos de leguminosas y de suelo con los cultivos económicamente más importantes en comunidades menonitas y mormonas, a partir de tres localidades de Chihuahua (Delicias, Ojinaga y Casas Grandes). Se aislaron y purificaron 31 cepas, las cuales se identificaron preliminarmente por morfología colonial y microscópica. Se efectuó la caracterización con el análisis de propiedades morfológicas y fisiológicas, (crecimiento en medio de cultivo a pH de 4.0, 5.5, 6.8 y 8.0; concentración de NaCl de 0.01, 0.51 y 0.85 moles/L y temperatura de incubación a 32 y 42°C) y análisis de secuencias parciales del 16S rDNA. Las cepas mostraron capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo, y diversidad en las tasas de nodulación y reducción de acetileno. En general, las cepas provenientes de Delicias, Ojinaga y Casas Grandes mostraron gran capacidad de adaptación al crecimiento en altas temperaturas, medio de cultivo con diferentes valores de pH y concentración de sales (NaCl). Resaltó la cepa LMS485 por mostrar crecimiento a más altas temperaturas y en valores extremos de pH del medio de cultivo; mientras que la cepa LMS479 presentó mayor resistencia a altas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo. Se desarrolló un análisis FODA y se establecieron los requerimientos de una estrategia factible para disminuir la aplicación de fertilizantes químicos. En este contexto, la aplicación de bacterias como biofertilizantes debe ser probada como una posible herramienta económica para confrontar los problemas existentes en las localidades en estudio.

Palabras clave: Agricultura sustentable, biofertilizantes, nódulos, rhizobia, suelo.

ISOLATION AND EVALUATION OF POTENTIAL BIOFERTILIZER OF APPLICABLE BACTERIA IN THE SUSTAINABLE AGRICULTURAL DEVELOPMENT IN CHIHUAHUA

The ecological impact is important in productive systems and the use of environmental friendly products is elemental to preserve and to keep natural resources. Hence application of biotechnologies, as the use of beneficial microorganisms, allows partial or total replacement of nitrogen fertilization. Then the suitable selection of microorganisms to apply as biofertilizers to different cultures under particular edafic and environmental conditions becomes very important. The interest in developing a research about these bacteria is the possibility to use them more efficiently in agriculture. Thus, bacterial strains from nodules and from cultivated soil with the most economically important cultures for Mennonites and Mormons communities were isolated, this from three localities of Chihuahua (Delicias, Ojinaga and Casas Grandes). So, 31 strains were isolated, purified and preliminary identified by macroscopic and microscopic morphology. Characterization was achieved with analysis of morphologic and physiological properties (growth in media with pH of 4.0, 5.5, 6.8 and 8.0; concentration of NaCl of 0.01, 0.51 y 0.85 moles/L temperature of incubation at 32 and 42°C) and partial sequence analysis of 16S rDNA. Strains showed capability of adaptation to culture conditions and diversity in nodulation and acetylene reduction rates. In general, strains obtained from Delicias, Ojinaga and Casas Grandes showed great capacity of adaptation to growth when incubated at high temperatures, in media with different pH values and resistance to high concentrations of salts (NaCl). Strain LMS485 highlighted since it showed better growth under high temperatures and extreme pH values; whereas strain LMS479 showed better resistance to high concentrations of NaCl in culture media. A FODA analysis was developed and the requirements of a feasible strategy for diminishing the application of chemical fertilizer were established. In this context, the use of bacteria as biofertilizers should be tested as an economic tool to confront the existing problems in the localities in study.

Key words: sustainable agriculture, biofertilizante, nodules, rhizobia, soil.

AGRADECIMIENTO

Al Colegio de Postgraduados por permitirme desarrollar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca para mis estudios de doctorado.

Al Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la B.U.A.P. y al Centro de investigación en biotecnología aplicada del I.P.N., por permitirme desarrollar parte de la investigación en sus invernaderos y laboratorios.

A la Dra. María del Carmen Villegas Hernández, por la dirección de este trabajo, mi eterno agradecimiento y gratitud por permitirme desarrollar en esta área bajo su tutela y exigirme para que cada vez lograra superarme más, por esas palabras que me animaron en los momentos difíciles.

Gracias al Dr. Sergio Trejo que me recomendó a la Dra. Villegas.

Al Dr. Engelberto Sandoval Castro por su apoyo y confianza brindada durante el tiempo que estuve bajo su asesoría, así como por los valiosos conocimientos brindados a lo largo de mi estancia en el CP.

Al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera por sus múltiples enseñanzas.

Al Dr. José Antonio Munive Hernández, del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la B.U.A.P., por haberme dado la oportunidad, la confianza y el apoyo proporcionado para efectuar este proyecto.

A la empresa Bioformuladora Agrícola Sayta y Asociados, del Estado de Chihuahua, quienes contactaron a productores y empresarios de las localidades de Delicias, Casas Grandes y Ojinaga para la obtención de muestras de suelo y nódulos para su estudio.

A los doctores Miguel Ángel Villalobos López, Samuel Vargas López y la Dra. Blanca Alicia Salcido Ramos, asesor y sinodales en este trabajo.

Al Dr. Raúl Ríos Sánchez y al Dr. Juan Francisco Aguirre Medina, gracias por impulsarme a efectuar mis estudios de doctorado.

A los profesores del Colegio, compañeros y amigos, por sus palabras de aliento, por todo el apoyo recibido, el cual contribuyo a mi formación profesional y personal.

DEDICATORIA

Pidan y se les dará, busquen y encontrarán, llamen y se les abrirá. Porque todo el que pide, recibe; el que busca, encuentra, y al que llama, se le abrirá
(Lc. 11, 9-13).

Dios me puso en este camino, no pudo equivocarse al haberme dado esta vida.



Dedico esta tesis al Sr Gaudencio Hernández A., la persona que estuvo conmigo a lo largo de mi vida y mi carrera, tolero mis ausencias y siempre confió en mí, me llevo de la mano y me cuida cuando era niña y me dio la oportunidad de sostener sus manos y cuidarlo al ser ya una mujer;

Hoy que no estas, sabes que vives en mi corazón y que tu presencia me acompaña a donde quiera que valla, me duele tu ausencia y busco tus palabras, pero tu recuerdo me impulsa para continuar:

Gracias papi †

A mi mamá Irene que me apoyo con su gran amor y consejos, y mis hermanos Francisco, Norma, Ángel y Roció: que crecimos juntos, papá se fue, pero nos queda sus enseñanzas y sabiduría, estos frutos son por el y ustedes.

A Devany, Abril, Victor e Israele que con su ternura hacen que mi vida sea más dulce.

A Maximino que llego en el momento menos esperado, estando conmigo en las alegrías y en los momentos más difíciles de mi vida, gracias a este gran amor he podido continuar en este camino junto a ti, apoyándonos mutuamente hasta el final.

A mi gran amigo el Ing. Román de Jesús Barajas Carlos, por la gran amistad que me brindo por muchos años, así como el apoyo para no decaer y seguir adelante en mis estudios de doctorado, ahora eres un ángel en el cielo†.

A todos los que contribuyeron en este camino.....mil gracias

ÍNDICE

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
ANTECEDENTES.....	3

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	9
2.1 Diversidad microbiana.....	9
2.2 Poblaciones bacterianas en suelos agrícolas.....	11
2.3 Fijación biológica de nitrógeno.....	13
2.3.1 Enzima nitrogenasa.....	16
2.3.2 Genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno.....	20
2.3.3 Microorganismos fijadores de nitrógeno.....	23
2.4 Simbiosis rizobia-leguminosa.....	25
2.4.1 Proceso de nodulación.....	29
2.4.2 Genes involucrados en la nodulación en rizobia.....	33
2.5 Rhizobia.....	36
2.5.1 Taxonomía de rizobia.....	37
2.5.2 Nomenclatura moderna de rizobia.....	39
2.6 Biofertilizantes.....	43
2.6.1 Experiencias obtenidas con la inoculación de rizobia.....	44
2.7 Marcadores molecular.....	46
2.7.1 Análisis de secuencias del 16S rDNA.....	47
2.8 Los fertilizantes en la agricultura mexicana.....	49
2.9 Comunidades de estudio en Chihuahua.....	51
2.9.1 La comunidad menonita en Chihuahua.....	51
2.9.1.1 La comunidad menonita y la agricultura mexicana.....	52
2.9.2 La comunidad mormona en Chihuahua.....	55
2.9.2.1 La comunidad mormona y la agricultura mexicana.....	56

CAPÍTULO III

3.1 Planteamiento del problema.....	57
3.2 Hipótesis.....	59
3.3 Objetivo general.....	60
3.4 Objetivos particulares.....	60

CAPÍTULO IV

POBLACIONES BACTERIANAS.....	61
4.1 Resumen.....	61
4.2 Introducción.....	62
4.3 Metodología.....	63
4.3.1 Muestreo de suelo y nódulos.....	63
4.3.2 Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo.....	65

4.3.3 Aislamiento de cepas de rhizobia a partir de nódulo radicular.....	65
4.4 Resultados y discusión.....	66
4.4.1 Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo.....	66
4.4.2 Aislamiento y purificación de cepas de rhizobia.....	69
4.5 Conclusiones.....	72
CAPÍTULO V	
IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE RHIZOBIA.....	73
5.1 Resumen.....	72
5.2 Introducción.....	74
5.3 Metodología.....	75
5.3.1 Análisis de secuencias del gen 16S rDNA.....	75
5.3.2 Identificación genética de cepas aisladas.....	76
5.4 Resultados y discusión.....	77
5.4.1 Análisis de secuencias del gen 16S rDNA.....	77
5.4.2 Caracterización de cepas aisladas.....	81
5.5 Conclusiones.....	84
CAPÍTULO VI	
DIVERSIDAD FENOTÍPICA DE RHIZOBIA.....	85
6.1 Resumen.....	85
6.2 Introducción.....	86
6.3 Metodología.....	87
6.3.1 Pruebas fisiológicas.....	87
6.4 Resultados y discusión.....	88
6.4.1 Pruebas fisiológicas.....	88
6.4.1.1 Crecimiento a 32°C y 42°C.....	88
6.4.1.2 Crecimiento a diferentes pH.....	89
6.4.1.3 Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl del medio.....	90
6.4.2 Caracterización de cepas aisladas.....	81
6.5 Conclusiones.....	94
CAPÍTULO VII	
EVALUACIÓN DE CEPAS DE TIPO RHIZOBIA CON FINES DE INOCULACIÓN.....	96
7.1 Resumen.....	96
7.2 Introducción.....	97
7.3 Metodología.....	98
7.3.1 Trampeo de cepas de rhizobia.....	98
7.3.2 Evaluación de cepas en invernadero.....	98
7.3.3 Estimación de la actividad reductora de acetileno.....	99
7.4 Resultados y discusión.....	100
7.4.1 Trampeo de cepas de rhizobia.....	100
7.4.2 Evaluación de cepas en invernadero.....	102
7.4.3 Estimación de la actividad reductora de acetileno.....	106
7.5 Conclusiones.....	110

CAPÍTULO VIII

ESTRATEGIAS DE DESARROLLO AGRÍCOLA.....	112
8.1 Problema de Investigación.....	112
8.2 Identificación del problema y oportunidades.....	116
8.2.1 Problemas.....	116
8.2.2 Oportunidades.....	117
8.2.3 Problemática.....	117
8.2.4 Análisis de las alternativas de solución.....	118
8.3 Objetivos para la producción de biofertilizantes.....	119
8.3.1 Objetivo técnico.....	120
8.3.2 Metas.....	120
8.4 Estrategias en el uso de microorganismos como biofertilizantes.....	121
8.5 Resultados esperados.....	122
8.5.1 Obtención de cepas altamente potenciales.....	124
8.6 Aplicaciones estratégicas.....	124
8.7 Variables de respuesta.....	130
8.8 Recomendaciones.....	130
8.9 Impactos sociales, económicos, ecológicos y tecnológicos de los resultados.....	131
8.9.1 Comercialización y difusión.....	133
8.9.2 Demostración.....	133
8.10 Procesos de producción de biofertilizantes.....	134
8.11 Conclusiones.....	135

CAPÍTULO IX

9. Conclusiones generales.....	136
--------------------------------	-----

LITERATURA CITADA.....	139
-------------------------------	------------

ANEXOS.....	157
--------------------	------------

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Superficies sembradas, cosechadas y PIB en Chihuahua.....	4
Cuadro 2. Principales cultivos agrícolas producidos en Chihuahua.....	4
Cuadro 3. Ubicación de las localidades muestreadas en Chihuahua.....	63
Cuadro 4. Cultivos referidos por los productores en los sitios de muestreo.....	64
Cuadro 5. Características físicas y químicas de los suelos muestreados.....	65
Cuadro 6. Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo.....	67
Cuadro 7. Identificación de las cepas por análisis del 16S rDNA.....	82
Cuadro 8. Cepas con mayor crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo.....	92
Cuadro 9. Presencia de nódulos en plantas de frijol, cacahuete y alfalfa.....	101
Cuadro 10. Evaluación de parámetros en plantas de frijol inoculadas.....	103
Cuadro 11. Evaluación de parámetros en plantas de alfalfa.....	104
Cuadro 12. Evaluación de peso seco de plantas de frijol y alfalfa inoculadas.....	105
Cuadro 13. Actividad reductora de acetileno en nódulos obtenidos por trampeo.....	107
Cuadro 14. Actividad reductora de acetileno en nódulos de frijol y alfalfa.....	108
Cuadro 15. Taller de ideas del proyecto.....	126
Cuadro 16. Marco lógico del proyecto.....	127
Cuadro 17. Análisis FODA.....	129
Figura 1. Componentes de la raíz y el suelo.....	12
Figura 2. Reacción y mecanismo molecular de la fijación biológica de nitrógeno.....	18
Figura 3. Componentes en la actividad de la nitrogenasa.....	19
Figura 4. Cascadas reguladoras de los genes nif en tres fijadores de N ₂	22
Figura 5. Nódulos de raíz de planta de frijol.....	27
Figura 6. Establecimiento de la simbiosis rhizobia-leguminosas.....	28
Figura 7. Moléculas reconocidas como señales para la inducción.....	29
Figura 8. Esquema general del proceso de nodulación.....	32
Figura 9. Estructura química de los factores Nod (LCOs).....	34
Figura 10. Estructura de los lipo-quito-oligosacáridos.....	35
Figura 11. Imagen de microscopia electrónica de <i>Rhizobium</i>	36
Figura 12. Precios de los fertilizantes en México.....	50
Figura 13. Menonitas de Chihuahua.....	54
Figura 14. Climas del estado de Chihuahua.....	64
Figura 15. Aislados provenientes de suelo de alfalfa en medio TY.....	69
Figura 16. Aislados con morfología típica de rhizobia, de suelo de alfalfa.....	70
Figura 17. Fragmento representativo de la secuencia obtenida.....	76
Figura 18. Amplificado del gen 16s rDNA de aislados de nódulos de alfalfa.....	77
Figura.19. Árbol filogenético basado en el análisis de secuencias del gen 16S.....	79
Figura.20. Árbol filogenético basado en el análisis de secuencias del gen 16S.....	80
Figura 21. Crecimiento de cepas en 2 diferentes valores de temperatura.....	88
Figura 22. Crecimiento de cepas en 4 diferentes valores de pH.....	89
Figura 23. Crecimiento de cepas en 4 diferentes valores de NaCl.....	91

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En la década de los 50's se inicia en México la Revolución Verde, con el incremento del uso de semilla mejorada, pesticidas y fertilizantes químicos, que buscaban incrementar la productividad de diferentes cultivos destinados a la alimentación humana o del ganado (Núñez, 2001). Sin embargo, el uso indiscriminado de fertilizantes ocasionó que se elevaran los niveles de nitratos en mantos freáticos, ríos y lagos (Castellanos *et al.*, 2000); situación que prevalece hasta nuestros días. Así, es necesario utilizar alternativas que permitan lograr una producción sostenida y fomentar el manejo adecuado de los recursos bióticos y abióticos de los agroecosistemas (Aguirre, 2001a; Thrall, 2005). Desde la década de los '70s, el estudio de microorganismos promotores del crecimiento vegetal es una línea de investigación de gran impulso en países europeos, asiáticos y latinoamericanos, incluido México (Aguirre-Medina, 2006), destacándose aquellos microorganismos capaces de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno. Existen investigaciones cuyo objetivo es el de esclarecer los factores que permiten una mejor interacción entre diferentes especies de plantas y microorganismos (Giles *et al.*, 2008, Villegas *et al.*, 2006; Walley *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2010).

El uso de microorganismos promotores de crecimiento en la agricultura se denomina inoculación o biofertilización, es considerada una biotecnología que contribuye al desarrollo sostenible ya que favorece el desarrollo de los cultivos agrícolas, beneficia al productor, y se ha descrito como ambientalmente segura, económica y socialmente aceptable (Aguirre, 2004; Urzúa 2005; Bhattacharjee *et al.*, 2009; Cong *et al.*, 2009).

Entre los grupos microbianos del suelo más estudiados, se encuentra el grupo rhizobia, el cual agrupa a todas aquellas bacterias capaces de nodular una o más especies de leguminosas, y que llevan a cabo el proceso de fijación biológica de nitrógeno en asociación simbiótica con estas plantas (Moulin *et al.*, 2001). Tras el establecimiento de la simbiosis se genera un nuevo órgano, el nódulo radicular, al interior del cual se encuentra la bacteria fijadora de nitrógeno; éste es aprovechado por la planta e incrementa su capacidad para desarrollarse en suelos pobres, especialmente aquellos carentes de nitrógeno (Trinchant *et al.*, 2001). El grupo de los rhizobia incluye,

actualmente, trece géneros que comprenden más de 70 especies, *Rhizobium* (Jordán, 1982), *Allorhizobium* (De Lajudie *et al.*, 1998), *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*, Chen *et al.*, 1988, Casida, 1982; Young, 2003), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordán, 1982), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001; Jourand *et al.*, 2004), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002; 2004), *Phyllobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Shinella* (Lin *et al.*, 2008), entre las α -proteobacterias y dos géneros de la subclase β -Proteobacteria, *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) y *Cupriavidus* (Chen *et al.*, 2001; Vandamme and Coenye, 2004). Este grupo reviste gran importancia debido a las ventajas tanto ecológicas como económicas que puede proporcionar su adecuada aplicación (Villegas y Munive, 2005; Weir, 2011).

Una alternativa para mantener el nivel de producción agrícola, con un menor uso de agroquímicos y manejo sustentable, es la inoculación de microorganismos benéficos asociados a las especies cultivadas (Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010). Sin embargo, es fundamental cuidar la adecuada selección de los microorganismos a utilizar como inoculantes, considerando su potencial biofertilizante, su capacidad de adaptación, permanencia en el sitio de interés y su facilidad de manejo. Por ello, éste trabajo se enfocó a generar una tecnología sustentable, a base de cepas nativas de rizobia potencialmente útiles como biofertilizantes, aplicable a cultivos agrícolas en localidades del estado de Chihuahua.

ANTECEDENTES

De acuerdo al Censo de Población y Vivienda llevado a cabo por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) con fecha censal del 12 de junio de 2010, el total de población del estado de Chihuahua es de 3,406,465 habitantes, lo cual le da el 11° lugar entre las entidades federativas de México por población.

De este total poblacional, 1 692 545 son hombres y 1 713 920 son mujeres. La tasa de crecimiento anual para la entidad durante el período 2005-2010 fue del 1.0 (INEGI, 2010).

En el 40% de su territorio existe clima muy seco, localizado en las sierras y llanuras del Norte; 33% de clima seco y semiseco en las partes bajas de la Sierra Madre Occidental y en el 24% templado subhúmedo, localizado en las partes altas de la misma. Sólo una pequeña proporción del territorio (3%) presenta clima cálido subhúmedo.

La temperatura media anual en el estado es de 17°C, y la temperatura más alta es mayor de 30°C, y se presenta en los meses de mayo a agosto y la más baja, alrededor de 0°C, en el mes de enero.

El estado de Chihuahua posee una superficie total utilizada para la siembra de cultivos de 1, 051,299 hectáreas, de la cual se cosechan en total 1, 017,183 hectáreas (Cuadro 1).

Las lluvias son escasas y se presentan durante el verano, la precipitación total es alrededor de 500 mm anuales. A pesar de que la escasez de agua es una limitante para la actividad agrícola, esta se practica de temporal y de riego, se cultiva: maíz, frijol, avena, alfalfa, algodón, sorgo, trigo, manzana entre otros (Cuadro 2). El clima seco y semiseco, favorece el crecimiento de pastizales en las planicies lo que ha propiciado el desarrollo de la ganadería (CNA, 2005).

Los tipos de suelo predominantes en el estado de Chihuahua son litosol 20.60%, feozem15.94%, regosol 25.33%, xerosol 20.84%, yermosol 4.61% de la superficie estatal, y en menor porcentaje cambisol, chernozem, rendzina, fluvisol, castañozem, luvisol, solonetz, ranker, vertisol, panozol, solonchak (INEGI, 2010).

La ciudad de Chihuahua es considerada la segunda mejor ciudad para invertir, a nivel nacional. En la actualidad operan en la ciudad y sus alrededores 14 mil 961 empresas de todos los giros. La razón, de acuerdo con el estudio 'Competitividad de las ciudades

mexicanas 2007', realizado por el Centro de Investigación y Docencia Económica (CIDE), Chihuahua ocupa la segunda posición como la más competitiva del país.

Cuadro 1. Superficies sembradas, cosechadas y PIB en el estado de Chihuahua

Agropecuario y aprovechamiento forestal	Chihuahua	Nacional
Superficie sembrada total (ha)	1,051,299	21,855,443
Superficie sembrada de alfalfa verde (ha)	74,849	385,706
Superficie sembrada de chile verde (ha)	26,933	144,110
Superficie sembrada de frijol (ha)	134,874	1,676,712
Superficie sembrada de maíz grano (ha)	217,237	7,746,460
Superficie sembrada del resto de cultivos nacionales (ha)	260,767	5,682,556
Superficie sembrada de riego (ha)	473,539	5,629,789
Superficie sembrada de temporal (ha)	577,761	16,225,654
Superficie cosechada total (ha)	1,017,183	18,706,240
Superficie cosechada de alfalfa verde (ha)	73,278	382,567
Superficie cosechada de chile verde (ha)	25,821	140,440
Superficie cosechada de frijol (ha)	131,141	1,205,340
Superficie cosechada de maíz grano (ha)	213,561	6,243,397
Superficie cosechada del resto de cultivos nacionales (ha)	240,884	4,962,233
Superficie mecanizada (ha)	963,626	11,158,176
Información económica agregada		
Producto Interno Bruto Estatal (Miles de \$)	259,676,342	7,977,299,703
Producto Interno Bruto del Sector Primario (Miles de \$)	18,328,856	324,551,124
Producto Interno Bruto del Sector Secundario (Miles de \$)	85,765,057	2,506,895,530

INEGI 2010

Cuadro 2. Principales cultivos agrícolas producidos en el estado de Chihuahua.

Cultivos agrícolas	% en el total nacional
Avena forrajera	93.1
Algodón	57.8
Maíz	51.3
Alfalfa	59.9
Pastos	46.6
Nuez	59.3
Chile verde jalapeño	44.2
Manzano	70.7

INEGI, 2010

El estado de Chihuahua es la quinta economía Nacional con un ingreso per cápita de \$12,284.00 dólares. (INEGI, 2010; H. Congreso del Estado de Chihuahua, 2010).

La intensificación del uso agrícola ha modificado algunas características de la fertilidad nativa del suelo, principalmente ha causado la disminución de materia orgánica, nitrógeno (N) total y cationes básicos intercambiables, así como el incremento de la concentración de fósforo (P) disponible para las plantas en el suelo debido a la aplicación frecuente de fertilizantes (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004).

La aplicación de fertilizantes de origen industrial tiene un alto costo para el campesino y productores del estado de Chihuahua, así como en la agricultura de ladera es incosteable por la baja rentabilidad de las inversiones de capital (Pool-Novelo *et al.*, 2000). Por lo anterior, es importante comprender el efecto que tiene la intensificación del uso agrícola en los procesos naturales que intervienen en el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la nutrición de las plantas (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004).

El uso de microorganismos en la agricultura es nombrado inoculación (Biofertilización) (Sylvester-Bradley *et al.*, 1985; Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010). Los biofertilizantes fueron recomendados por la Agenda 21 en la llamada Cumbre de la Tierra, en Río de Janeiro, en 1992. Son considerados como biotecnologías que contribuyen al desarrollo sostenible por ser técnicamente factibles, dentro del nivel científico-técnico (Aguirre, 2004). La aplicación del biofertilizante se efectúa al momento de la siembra, recubriendo la semilla, con el fin de que pueda establecerse una buena colonización en las raíces durante las primeras etapas de desarrollo (INIFAP, 2000; Aguirre-Medina, 2006). Los biofertilizantes o inoculantes, constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles, al crear un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable, al reducir las aplicaciones de algunos agroquímicos y hacer más eficiente la asimilación de los nutrientes disponibles en cada hábitat (Aguirre, 2004; Zahir *et al.*, 2010).

Los biofertilizantes son considerados como productos que contienen microorganismos vivos que, al aplicarse a las semillas, superficie de las plantas o al suelo, colonizan la rizósfera o el interior de la planta y promueven el crecimiento vegetal al aumentar la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad general de los cultivos, los biofertilizantes

son reconocidos como una forma de manejo sostenible de los agroecosistemas (Lucy *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2008).

En general, el efecto observado con la inoculación de cepas es influido por tres razones principales: i) las condiciones ambientales y edáficas en nuestro medio difieren de las que imperan en el lugar donde las cepas fueron aisladas; ii) la diferente capacidad de nodulación y fijación entre cepas (Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010); iii) las poblaciones nativas que compiten por puntos de infección con las cepas introducidas.

Otro de los factores que favorecen el éxito en el manejo de las cepas aplicadas como biofertilizantes, reside en el estudio de cepas compatibles y específicas a un cultivo, así como de las condiciones ecológicas del suelo (Reyes *et al.*, 2008), es importante efectuar modificaciones a las prácticas agrícolas aplicadas en el campo, como parte de una alternativa viable para fortalecer el desarrollo agrícola sostenible, debido a que el uso y manejo de los biofertilizantes se adaptan a las condiciones físicas y socioeconómicas de las regiones donde es aplicado (Aguirre, 2001a; Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010).

Para la elaboración de inoculantes que puedan ser utilizados por los agricultores es necesario contar con cepas competitivas y efectivas en la fijación biológica de nitrógeno (FBN), seleccionadas de una amplia variedad de aislamientos obtenidos de diferentes lugares (Lucy *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2008).

La formulación de inoculantes con microorganismos del grupo rhizobia requiere la integración de parámetros físicos, químicos y biológicos en los cultivos en estudio, que permitan la supervivencia de las poblaciones de microorganismos en condiciones por debajo de lo óptimo a través del tiempo (Kyei-Boahen *et al.*, 2002). Esto puede lograrse a través del conocimiento de las necesidades y limitaciones del productor y de los requerimientos del microorganismo que permitan la producción de un inoculante eficiente y efectivo.

Es importante la adecuada selección de cepas de rhizobia adaptadas a diversas condiciones, así como es primordial entender los factores ambientales y biológicos que afectan la simbiosis ya que el conocimiento integral del conjunto bacteria-planta-ambiente ayuda a definir estrategias que conduzcan a la selección de cepas con alta

capacidad de fijación de nitrógeno y tolerancia a diferentes factores ambientales (Espinosa y Malpica, 2007; Zahir *et al.*, 2010).

Una alternativa para mejorar los rendimientos en los cultivos, es la utilización de inoculantes con rhizobia para incrementar la fijación biológica de nitrógeno (FBN), seleccionando cepas con criterios como la capacidad para formar nódulos (competitividad e infectividad), fijar Nitrógeno (efectividad), para sobrevivir en las semillas en el suelo, adaptación y tolerancia a situaciones de estrés, estabilidad genética y capacidad de crecimiento en las condiciones de producción de los inoculantes. Al ser la simbiosis un fenómeno tan complejo, la nodulación de las leguminosas se ve influida por un gran número de factores, tanto por los ambientales como los genéticos propios de ambos simbioses, y la cantidad de nódulos, tamaño y momento de aparición, entre otros, son caracteres que dependen de la planta o de la bacteria (Punos e Iglesias, 2005).

Como alternativas naturales que beneficien sus cultivos, el sector agroindustrial de comunidades Menonitas y Mormonas de diferentes localidades del estado de Chihuahua tiene interés en resolver los problemas existentes en la producción agrícola debido a la utilización excesiva de fertilizantes químicos, así como al manejo tecnológico inadecuado de sus cultivos lo que ha causado afectaciones en sus suelos, agua y cultivos, además de considerar el incremento del precio de los agroquímicos y el efecto que se atribuye a su utilización excesiva, siendo necesario hacer un uso cada vez más racional de los fertilizantes.

Cultivos como alfalfa, cacahuete, algodón, chile, durazno, manzano, nogal entre otros, son estimados como recursos de gran importancia en las regiones del estado de Chihuahua (INEGI, 2010), sin embargo el manejo inapropiado de los suelos en pendientes y la continua degradación de los mismos por los efectos climáticos y edáficos, así como la baja disponibilidad de N y P, principalmente, y los problemas de contaminación de los suelos, aguas y alimentos por el uso excesivo de agroquímicos exigen la gestión agrícola en términos de sostenibilidad, por lo tanto, la evaluación de microorganismos del grupo de rhizobia representa una opción para el manejo sostenible de estos agrosistemas, de allí la necesidad de realizar aislamientos en los suelos con cultivos de interés para el estado de Chihuahua, por consiguiente, el estudio y la

obtención de microorganismos de estas localidades, en condiciones edafoclimáticas presentes en estas regiones nos darán la oportunidad de obtener cepas bacterianas con mayor potencial biofertilizante, considerando que se ha determinado que existe potencial para el incremento de la fijación de nitrógeno, sobreviven en condiciones de estrés osmótico, altas temperaturas y diferente pH mediante una adecuada combinación entre cepas y cultivares, son consideradas como altamente competitivas en el proceso de colonización en la planta.

El uso de cepas bacterianas como biofertilizantes, así como la modificación de las prácticas agrícolas, resultan fundamentales como parte de una alternativa para fortalecer un desarrollo agrícola sostenible.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

2.1 Diversidad microbiana

Los microorganismos del suelo son de gran importancia para mantener la vida en nuestro planeta. El estudio de su diversidad es importante, porque estos organismos forman parte de comunidades complejas y dinámicas conformadas por numerosas especies. Para comprender su función en sus nichos específicos, es esencial identificar y cuantificar cada uno de los miembros que conforman estas comunidades (Escalante-Lozada *et al.*, 2004).

Existe una gran cantidad de microorganismos presentes en el suelo, estos microorganismos son especialmente abundantes en la rizósfera y llevan a cabo funciones importantes (Khan, 2005; Suneja *et al.*, 2007). Se sabe que ocurren interacciones benéficas entre plantas y microorganismos que viven en la rizósfera, mismas que han sido atribuidas a la gran diversidad de microorganismos presentes en el suelo (Chabot *et al.*, 1996; Khan, 2006). En la rizósfera se ejerce quimioatracción de determinados grupos microbianos, dando lugar a la producción de fitohormonas tales como giberelinas, citocininas y auxinas (Bastian *et al.*, 1998; Khan, 2005), además de ocurrir diversas relaciones entre grupos microbianos que estimulan o inhiben la proliferación de determinados microorganismos. La gran diversidad microbiana existente en diferentes ecosistemas ha propiciado el interés por la búsqueda de microorganismos con actividad fisiológica específica y benéfica para los cultivos (Khan, 2005; Khan, 2006).

El componente microbiano del suelo es importante para los ecosistemas y los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales, todos ellos inciden sobre la biodiversidad y la densidad de las poblaciones, por lo que la desaparición de cualquier especie biológica implica la pérdida irreversible de un conjunto único de información genética (Olalde y Aguilera, 1998; Khan, 2006).

Aún cuando los estudios sobre los microorganismos del suelo son numerosos, no se tiene un ejemplo en el que se determine completamente la diversidad de las poblaciones presentes en un suelo y, aún más, tampoco se sabe cuál es la diversidad microbiológica necesaria para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Tate

III, 1995; Villarreal *et al.*, 2000; Rengel y Marschner, 2005). La comunidad microbiana del suelo comprende miles de organismos, entre los cuales se encuentran hongos, actinomicetos, algas y bacterias (Álvarez y Ferrera, 1994; Khan, 2005). Por ello, el conocimiento de la diversidad microbiana puede ayudar a definir sistemas de reforestación o rehabilitación de zonas perturbadas, debido a que los microorganismos influyen directamente el desarrollo de las plantas por su aporte nutrimental, o bien, mejorando características del suelo como la agregación de partículas, la porosidad, la retención de agua y el control de la erosión (Tate III, 1995), por lo que el monitoreo de microorganismos debe ser utilizado para evaluar el beneficio aportado por éstos a los sistemas de laboreo, así como el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Villarreal *et al.*, 2000; Wertz *et al.*, 2006).

Además, algunos estudios han mostrado que existe correlación entre la diversidad genética de las poblaciones y la variabilidad del hábitat, sin embargo, en pocos trabajos se han comparado las diferencias fenotípicas y genotípicas de bacterias presentes en ambientes como la rizósfera (Escalante-Lozada, *et al.*, 2004).

Es importante resaltar que, la selección natural afecta la frecuencia alélica, promueve la diversidad genética en las poblaciones bacterianas y puede reflejar la influencia de condiciones alternas que una población ha experimentado a través del tiempo; por lo que un análisis de similitud entre organismos con base en características genéticas es más consistente a través de generaciones, por contener éstos la porción heredable; sin embargo, un análisis de similitud fenotípica involucra los efectos ambientales además de las características genéticas (Escalante-Lozada, *et al.*, 2004).

La diversidad microbiana surge como resultado de procesos de mutación y de recombinación genética que actúan en un ambiente reflejando la variedad fisicoquímica de los hábitats (Madigan y Martinko, 2006; Patra *et al.*, 2006).

El análisis de la diversidad bacteriana basado en técnicas moleculares ha incrementado la información disponible y facilita la comprensión de los ecosistemas y sus interacciones, además de aportar datos valiosos para mejorar los sistemas de identificación y caracterización, apoyándose en técnicas confiables y más rápidas (Patra *et al.*, 2006).

2.2 Poblaciones bacterianas en suelos agrícolas

El suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana y, la misma definición de suelo quedaría incompleta, si ésta no considerara la actividad de este componente (comunidad microbiana), ya que es fundamental para el equilibrio de los ecosistemas (Olalde y Aguilera, 1998; Patra *et al.*, 2006).

Por otro lado, la actividad microbiana influye en los procesos biológicos en el suelo vinculados con la nutrición de los cultivos, la eficiencia en la utilización del carbono por los microorganismos está en función de la cantidad del substrato orgánico, humedad, temperatura y de las características físicas y químicas del suelo (Hoegen, 1995; Khan, 2006).

La interacción entre la planta y los microorganismos en el suelo se puede explicar describiendo todos los procesos que ocurren en esta zona; el concepto rizósfera fue descrito por Hiltner en 1904, como la zona de las raíces donde se estimula el crecimiento de las bacterias; “Es el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz” (Khan, 2005). Aunque esta definición en la actualidad es más compleja, refleja el equilibrio ecológico que se establece entre las poblaciones microbianas y las raíces de las plantas, en la actualidad sabemos que no sólo las bacterias actúan en la rizósfera, sino también hongos, actinomicetos, protozoarios, colémbolos y ácaros. (Ferrera-Cerrato, 1995; Khan, 2005; Khan, 2006). Lynch describió el medio ambiente rizosférico como una trinidad de entidades en interacción; en la que intervienen la planta, los microorganismos y el suelo, en una compleja interacción de beneficios mutuos en la parte biótica y una definida intervención de la parte abiótica de la trinidad que es el suelo (Palacios *et al.*, 2000; Khan, 2005).

También se considera la rizósfera constituida de dos fracciones:

Rizósfera en sentido estricto es una fina capa de suelo firmemente adherida a las raíces, sin embargo puede ser fácilmente desprendida.

Rizoplano: región del suelo adyacente a la raíz sin que llegue a estar directamente en contacto con ésta.

Agrupando las anteriores definiciones dentro del área de microbiología, en la figura 1 se muestra la rizósfera, además de otras partes de la raíz donde actúan los microorganismos. En la rizósfera se reduce el pH cuando las raíces exudan iones

hidrógeno para mantener un balance dentro de la planta, esto se observa en el mucigel en las raíces, el cual se compone de ácidos orgánicos como ácido málico, ácido succínico, vitaminas como biotina, piridoxina, además de carbohidratos como sacarosa, entre otros (Ferrera-Cerrato, 1995; Whitelaw, 2000).

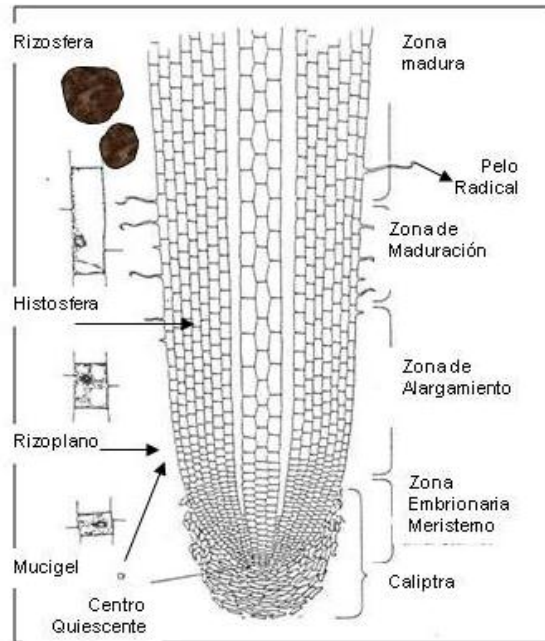


Figura 1. Componentes de la raíz y el suelo. Tomado de Ferrera-Cerrato, 1995.

Se considera que la endorizosfera o histosfera inicia a partir del rizoplano y se dirige hacia el interior de la raíz e involucra la epidermis y las células de la corteza de la raíz, a los microorganismos que actúan en la histosfera se les conocen como endófitos (Alexander, 1980; Khan, 2005; Suneja *et al.*, 2007).

Por otro lado, los procesos agrícolas, así como el manejo de los recursos vegetales, inciden sobre el suelo afectando tanto su diversidad como la densidad de las poblaciones. Los resultados a largo plazo pueden ser la pérdida de fertilidad de los suelos y su progresivo empobrecimiento, debido a que los procesos microbiológicos afectan diversas propiedades del suelo y pueden ser influenciados por el manejo de residuos y el tipo de labranza utilizada (Olalde y Aguilera, 1998; Garza-Requena y Valdés, 2000).

La presencia de microorganismos es un indicativo que permite evaluar el beneficio de los sistemas de laboreo, así como el mantenimiento de la fertilidad del suelo (Villarreal

et al., 2000). El porcentaje más alto de microorganismos se localiza en suelos con altos contenidos de materia orgánica, siendo la mayoría bacterias que se agrupan como aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas. Los géneros más conocidos son: *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Pseudomonas* y *Clostridium* (Caballero-Mellado *et al.*, 1995; Khan, 2005; Suneja *et al.*, 2007).

Estudios realizados por Villarreal *et al.* (2000), determinaron los cambios en las poblaciones de bacterias, actinomicetos y hongos así como algunas propiedades físicas y químicas durante la conversión de una parcela con manejo convencional a labranza mínima y cero mostrando que, en general, la labranza convencional favoreció la preservación de mayor cantidad de bacterias y hongos que en labranza mínima y cero.

2.3 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno constituye el 78% en volumen de la atmósfera terrestre, donde está presente en forma de moléculas de N_2 , es un gas incoloro, inodoro, insípido, con un punto de fusión de $-210^{\circ}C$ y un punto de ebullición $-196^{\circ}C$. La molécula es muy poco reactiva a causa del fuerte enlace triple entre los átomos de nitrógeno.

El nitrógeno es un elemento esencial para los organismos vivos. La disponibilidad de una fuente apropiada de nitrógeno limita la producción primaria en ambientes naturales y en la agricultura (Rodionov, 2005).

El nitrógeno es un factor limitante para la nutrición de los seres vivos, debido a que es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos; aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etc. Además, el nitrógeno es el elemento primordial para el desarrollo y sobrevivencia de las plantas, y presenta la mayor cantidad de transformaciones microbiológicas; en contraste, es el elemento menos disponible en el suelo (Dance, 2008; Rodionov, 2005).

El nitrógeno molecular (N_2) es la única reserva de nitrógeno accesible en la biosfera. Prácticamente ilimitada, esta reserva no es directamente utilizada por los vegetales y animales ya que para que el N_2 pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido. El nitrógeno molecular es inerte y solamente es asimilable como amoniaco, ion amonio, nitratos y nitritos. El producto detectable de esta fijación es el amoniaco (NH_3), y es

asimilado e incorporado a aminoácidos y, más tarde, a proteínas y ácidos nucleicos (Rodríguez *et al.*, 1995; Dance, 2008).

Los únicos seres vivos capaces de reducir el nitrógeno molecular se encuentran entre las Eubacterias y las Archaea, y desarrollan el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN). La fijación del N₂ atmosférico, se lleva a cabo fundamentalmente por dos procesos naturales:

1. El primero es mediante el proceso químico, el cual se basa en descargas eléctricas, donde se forma óxido nítrico, que al reaccionar con el agua de lluvia origina ácido nítrico. Este ácido reacciona con el amoníaco (NH₃) del aire para producir nitrato de amonio (NO₃NH₄) y de esta forma, mediante las precipitaciones, llega al suelo.

Se estima que este proceso puede fijar alrededor de 10 millones de toneladas métricas de N₂ por año.

2. El segundo proceso es la fijación biológica de nitrógeno (FBN), la cual depende básicamente de la capacidad de algunos microorganismos de convertir el N₂ atmosférico en formas asimilables para las plantas (NH₄⁺), a través de la acción del complejo enzimático llamado nitrogenasa.

El proceso de fijación de nitrógeno es en su mayor parte biológico y algunas bacterias y cianobacterias son los organismos capaces de realizarlo. La mayoría del nitrógeno fijado en la Tierra es el producto de las actividades metabólicas de estos microorganismos.

La atmósfera contiene alrededor de 10¹⁵ toneladas de gas N₂ y el ciclo del nitrógeno involucra la transformación de unas 3x10⁹ toneladas de N₂ por año. Las transformaciones no son exclusivamente biológicas: las radiaciones ultravioleta representan el 10 % del aporte global; la industria de fertilizantes nitrogenados aporta un 25 %, por lo que la FBN corresponde al 60 % aproximadamente.

La luz y la radiación ultravioleta fijan otro 15% y el 25% restante proviene de procesos industriales (Rueda-Puente *et al.*, 2009).

El nitrógeno puede obtenerse por vía industrial para la producción de fertilizante, explosivos u otros productos. El método más popular es el Proceso de Haber-Bosch. Esta reducción en condiciones controladas para obtención del fertilizante ha alcanzado tal escala que ahora es la fuente más grande de nitrógeno.

La fijación de nitrógeno química se produce por el rompimiento de la unión $N\equiv N$, por reducción del enlace de la molécula diatómica de N_2 a dos moléculas de NH_3 , con el empleo de alta temperatura y presión en presencia de un catalizador. La FBN se enfrenta a las mismas barreras energéticas, pero opera en una forma más sutil a temperatura ambiente y presión parcial de N_2 de 0.78 atm; esto gracias a la acción combinada del complejo enzimático de la nitrogenasa (Cong, 2009).

A nivel mundial el consumo de fertilizantes nitrogenados aumentó de 8 a 17 Kg ha⁻¹ de suelo agrícola. Se predice que los requerimientos de fertilizantes nitrogenados aumentarán en el futuro; sin embargo, con la tecnología actual de producción de fertilizantes y los métodos de aplicación empleados que resultan poco eficientes, así como el costo y la contaminación ecológica que producen, su uso se hace más excesivo (Cong, 2009).

Por otro lado, el descubrimiento de la fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas remonta al siglo XIX. Los trabajos del francés Jean Batiste Boussingault y los de los alemanes Hermann Hellriegel y Hermann Wilfarth establecieron en 1886, que la capacidad de las leguminosas de utilizar el N_2 del aire era debida a la presencia de nudos en la raíz inducidos por fermentos localizados en el suelo (Levollay, 1988; Baca *et al.*, 2000; Cong, 2009). Este descubrimiento fue seguido por el aislamiento de *Rhizobium* por Beijerinck a partir del chícharo (*Pisum*) y, posteriormente, por otras bacteria fijadoras de nitrógeno que no se encuentran asociadas a plantas, como *Azotobacter* y *Clostridium pasteurianum* (Nutman, 1987; Baca *et al.*, 2000).

Entre las bacterias que llevan a cabo el proceso de transformar el N_2 en una molécula asimilable para las plantas, las cuales son nombradas fijadoras biológicas del nitrógeno, existe una amplia gama de mecanismos de adaptación, abarcando a las que se desarrollan y que fijan nitrógeno en vida libre, las que pueden hacerlo en asociación con otros organismos, las que sólo fijan nitrógeno cuando establecen relaciones simbióticas (Dance, 2008; Dordas, 2009).

Estos sistemas, ya sean de vida libre o simbiótica incorporan, anualmente, aproximadamente 170 millones de toneladas de nitrógeno al ecosistema (González y Lluch, 1992; Mayea *et al.*, 1998). El potencial agronómico de este sistema fijador de nitrógeno ha sido objeto de un gran número de investigaciones, y han incluido métodos

de sistemas asociativos, caracterización de las bacterias involucradas, su interacción con raíces y su potencial benéfico en la agricultura (Ramírez y Luna, 1998), y los factores que permiten una mejor interacción entre diferentes especies de plantas y microorganismos (Giles *et al.*, 2008, Villegas *et al.*, 2006; Walley *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2010). Se estima que actualmente la FBN es de 200 millones de toneladas por año, es decir, dos veces la producción de fertilizantes nitrogenados producidos por síntesis industrial (Cong, 2009).

2.3.1 Enzima nitrogenasa

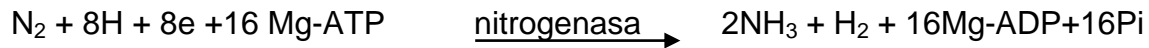
La atmósfera contiene alrededor del 78 % del N y las plantas no lo pueden usar para la síntesis de compuestos nitrogenados, por no poder romper la triple ligadura de la molécula de N₂.

La fijación de N₂ es realizada por algunas bacterias libres o asociadas en simbiosis a vegetales y ciertas arqueobacterias; desarrollado por un complejo enzimático denominado “Nitrogenasa”, constituido por dos proteínas separadas, ambas necesarias para la acción enzimática (Lanzilotta y Seefeldt, 1996; Dance, 2008).

La mayoría de los microorganismos fijadores de nitrógeno en su genoma tienen el sistema enzimático de la nitrogenasa (metaloenzima) capaz de fijar biológicamente el nitrógeno, los microorganismos que convierten el N₂ en amoníaco lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático nitrogenasa (Brady y Weil, 1999), sin embargo, se ha reportado que en ciertas cepas de bacterias como *Burkholderia* los genes de fijación (*nif*) y los genes de nodulación (*nod A*) no han sido detectados, sugiriendo que estas bacterias perdieron estas características.

El complejo enzimático nitrogenasa que cataliza la reducción de nitrógeno en amoníaco, está constituido por dos metaloproteínas: la primera es un homodímero ($\alpha:\alpha$) y la segunda un tetrámero ($\alpha:\alpha:\beta:\beta$) que contiene dos grupos P (P-clusters), uno 8Fe-7S y el otro Mo:7Fe-9S:homocitrato, que constituye el cofactor conocido como FeMoco (cofactor hierro molibdeno) donde ocurre la reducción del N₂.

La conversión de N₂ a NH₃⁺ requiere de 8 electrones y 8 protones por molécula de N₂ reducido, la energía se obtiene por la reducción en la enzima nitrogenasa que cataliza la reacción dependiente del ATP y el magnesio, la cual es la siguiente:



La fuente de electrones es la sacarosa, que al reducirse cede los electrones al NADP para formar NADPH, que actúa como donador de electrones a la ferredoxina oxidativa para formar ferredoxina reducida y donarlos al componente II de la nitrogenasa, que es la reductasa. Este componente tiene 60 KD de masa molecular, con dos subunidades idénticas donde actúan dos electrones y un centro de transferencia de electrones formado por hierro (Fe), con la adición de energía por los ATPs se llega al componente I de la nitrogenasa que es la dinitrogenasa con una masa molecular de 200 a 270 KD, con cuatro subunidades que contiene Molibdeno (Mo)-Hierro (Fe) como tetrámeros (Alcantar y Sandoval, 2001; Lanzilotta y Seefeldt, 1996; Dance, 2008).

En el componente II, participan dos electrones y en el componente I cuatro electrones de un total de ocho, que representan las condiciones óptimas de flujo de electrones del 75% para formar el NH_3 (Ecuación 1). Los otros dos electrones son la energía para formar H_2 ; este substrato reacciona con la enzima hidrogenasa membranal, que se encuentra en la membrana celular del microorganismo, capaz de recircular el H_2 , recuperando los electrones usados en su reducción (Figura 2 y 3), lo que se traduce en mayor rendimiento de materia seca por planta (Alcantar y Sandoval, 2001; Dance, 2008).

Al NH_3 se une un H^+ que se encuentra en el citosol para formar NH_4^+ (Echegaray, 1995; Dordas, 2009; Slatni *et al.*, 2008). La asimilación del nitrógeno es en forma de amonio (NH_4^+), el cual se une con el ácido glutámico (Glutamato) para formar la glutamina, esta reacción es catalizada por la enzima glutamina sintetasa (GS), a esta vía de asimilación se le conoce como vía GS.

La glutamina puede ser transportada directamente a las hojas para continuar con su asimilación o se une al ácido α -cetoglutarico para formar glutamato, reacción catalizada por la enzima glutamato sintasa (GOGAT), el glutamato se une al ácido oxaloacético para formar ácido α -cetoglutarico y ácido aspártico (Aspartato), el aspartato es catalizado por la enzima asparagina sintetasa para formar asparagina que transfiere su grupo amino a formar diferentes aminoácidos (Marschner, 1995; Lanzilotta y Seefeldt, 1996; Dance, 2008).

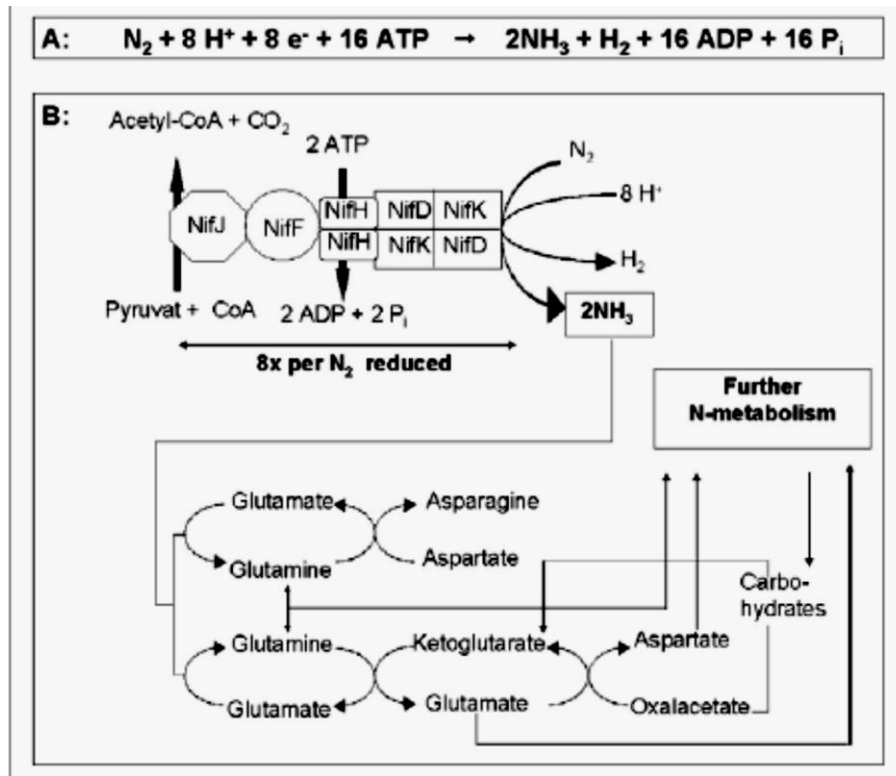


Figura 2. Reacción y mecanismo molecular de la fijación biológica de nitrógeno, a) Reacción general del mecanismo de la fijación biológica de nitrógeno, b) Estructura y operación del complejo enzimático de la nitrogenasa y el subsecuente metabolismo del nitrógeno, los electrones son transferidos de la ferredoxina reducida (o flavodoxina) vía azoferredoxina a la molibdenoferroproteína.

Cada mol de nitrógeno fijado requiere 16 moles de ATP hidrolizados por la proteína nifH. El NH_3 producido es utilizado en la síntesis de glutamato o glutamina para el metabolismo del nitrógeno (Tomado de Kneip *et al.* 2006).

La reacción de transaminación es cuando el glutamato se une con el ácido pirúvico (Piruvato), reacción catalizada por la enzima transaminasa para formar el aminoácido, ya sea alanina, glicina, treonina, tirosina, serina entre otros, para de ahí derivar en la producción de proteínas, que es la parte fundamental de la nutrición del nitrógeno (Brady y Weil, 1999).

La proteína-Fe, activada por ATP-Mg, transfiere los electrones a la nitrogenasa que a su vez los distribuye entre N_2 y protones para dar amonio e hidrógeno. Esta reducción de protones es siempre concomitante con la producción de amonio. Se supone una pérdida de eficiencia del proceso por la parte correspondiente de energía que consume. La nomenclatura para designar estas proteínas es variable, así, la proteína I es llamada también dinitrogenasa o "Hierro-molibdeno-proteína". El otro componente, la proteína II,

es nombrada dinitrogenasa reductasa o "Hierro-proteína" (Marschner, 1995; Lanzilotta y Seefeldt, 1996; Dance, 2008).

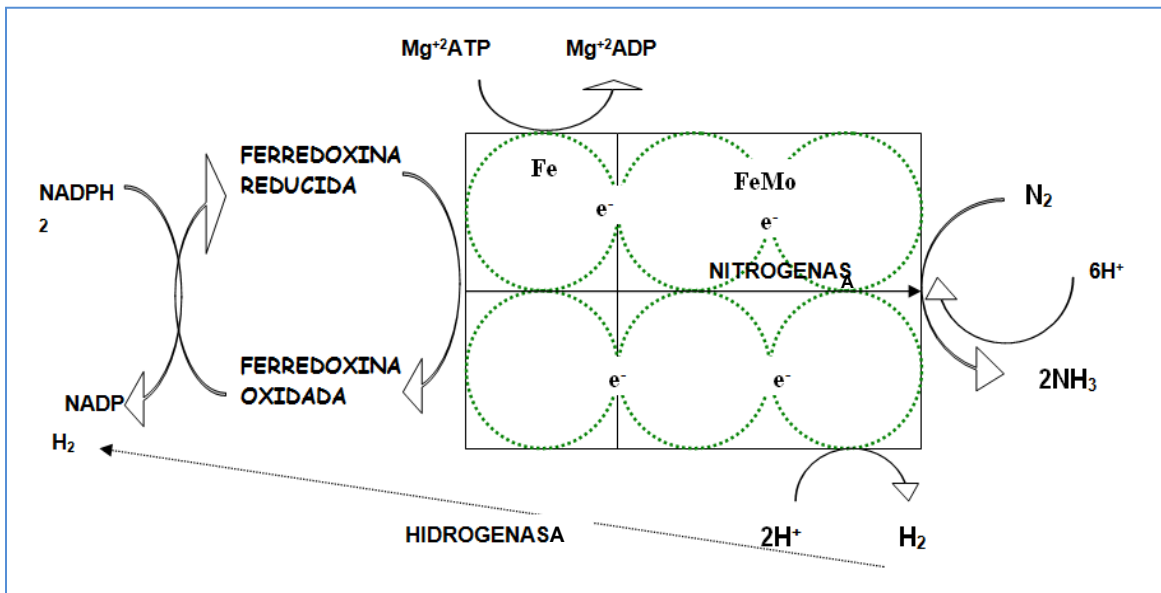


Figura 3. Componentes en la actividad de la nitrogenasa. Tomado de Ferrera-Cerrato, 1995.

Para su funcionamiento, el complejo requiere un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente estrictamente anaerobio (Baca *et al.*, 2000). La actividad de la enzima se ve favorecida al disminuir la concentración de oxígeno por incremento de la humedad en el suelo a valores mayores de la capacidad de campo (33 kpa) (Zhulin *et al.*, 1995), por lo que la enzima nitrogenasa es fácilmente inactivada por oxígeno, de tal forma que los sistemas fijadores han desarrollado estrategias para eliminar o disminuir las concentraciones elevadas de O_2 y evitar su inactivación si es que se ha sintetizado, pues la expresión de los genes *nif* está estrictamente regulada, tanto por oxígeno como por nitrógeno combinado a través del sistema Ntr-NifA. Estas estrategias van desde la anaerobiosis total, como en *Clostridium*, y la producción de gran cantidad de polisacáridos extracelulares que hacen de filtro para el oxígeno, o la compartimentalización, como ocurre en las cianobacterias. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, la estructura del nódulo crea el ambiente microaerófilico adecuado y la proteína leghemoglobina facilita el transporte de oxígeno al bacterioide para soportar el metabolismo aerobio requerido para obtener la energía necesaria para la reducción del N_2 (Alcantar y Sandoval, 2001; Dordas, 2009).

La síntesis de la leghemoglobina está coordinada por la bacteria y por la planta, el grupo globina (glicoproteína) es codificado en los genes de la planta y el grupo hemo por los genes bacterianos, y ambos conjuntos de genes sólo se activan cuando se ha conformado el nódulo en el interior de la raíz (Strozycki, 2007).

2.3.2 Genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno

La actividad fijadora de nitrógeno atmosférico está codificada por los llamados genes *nif* (nitrogen fixation), los cuales han podido transferirse por manipulación genética bajo forma de plásmidos desde microorganismos fijadores a otros que no lo son (Lohrke *et al.*, 2001; Brencic y Winans, 2005).

Los genes de fijación (*nif*) y nodulación (*nod*) se encuentran ligados ya sea en islas simbióticas cromosomales o en plásmidos simbióticos, probablemente el ancestro común de los rizobios no era simbiótico, pero posiblemente tuviera la capacidad de fijar nitrógeno (Laguerre *et al.*, 2001).

Las investigaciones actuales sobre los genes *nif* se centran en los siguientes aspectos:

- a) Caracterización y manipulación del grupo *nif* con objeto de producir plásmidos estables y de alta velocidad de replicación.
- b) Transformación de los microorganismos que habitualmente colonizan la rizósfera de las plantas, y
- c) Transferencia del grupo *nif* directamente a las plantas.

La transferencia de los genes *nif* a las bacterias y hongos rizosféricos no fijadores constituye un objetivo interesante, si bien cubierto de dificultades.

En el caso de microorganismos de vida libre, hay que tener en cuenta que la fijación biológica de nitrógeno consume tal cantidad de energía que hace difícil la obtención de niveles de fijación apreciables, mediante la conversión de parte de la microbiota rizosférica en fijadora (Gilles-Gonzalez y González. 2004; Brencic y Winans, 2005).

Genes *nif*. Una veintena de genes presentes en *Klebsiella pneumoniae* están directamente implicados en la reducción de N₂ a amonio. Se conocen como genes *nif* y en esta bacteria se hallan todos agrupados lo que ha facilitado considerablemente su estudio, junto con la particularidad de encontrarse en una especie microbiana muy asequible. Genes homólogos a muchos de ellos y particularmente a los estructurales,

que codifican la enzima nitrogenasa, se hayan en todos los fijadores, aunque con una distribución distinta (Lohrke *et al.*, 2001; Brencic y Winans, 2005). La presencia general indica un origen común para este proceso. Los genes *nif* se transcriben por grupos bajo el control de NtrA, y su expresión está sometida a una estricta regulación, de tal forma que sólo puede ocurrir en condiciones de bajas concentraciones de nitrógeno combinado y oxígeno, como corresponde a un proceso altamente consumidor de energía y en el que está implicada una enzima, la nitrogenasa, que se inactiva por oxígeno (Gilles-Gonzalez y González, 2004; Brencic y Winans, 2005). Esta regulación se realiza a dos niveles, uno, fuera del conjunto de estos genes, por NtrC, que actúa sobre el promotor del gen *nifL*, y otro, a través del activador transcripcional NifA, cuyo gen se cotranscribe con *nifL*. NtrC se activa a través de la cascada GlnD, GlnB y NtrB cuando hay bajas concentraciones de amonio, o lo que es lo mismo, una relación cetoglutarato/glutamina alta. NifL, el producto del mencionado gen *nifL* inhibe estequiométricamente la actividad de NifA en concentraciones altas de nitrógeno combinado y oxígeno por la formación de un complejo NifL-NifA inactivo. Acaba de presentarse la hipótesis de que la presencia de amonio altera la conformación de NifL capacitándolo para ligar ATP e hidrolizarlo, incrementando así la eficiente formación de dicho complejo inactivo NifL-NifA (Figura 4) (Kaminski *et al.*, 1998; Brencic y Winans, 2005).

En contraste, la fijación de nitrógeno es dirigida por 2 grupos de genes:

los genes *nif* y los genes *fix*, la enzima Nitrogenasa (*nifHDK*) esta relacionada en la biosíntesis de los cofactores de la nitrogenasa Fe-Mo (*nifENB*), la regulación de la proteína NifA y proteínas de funciones desconocidas que son requeridas para la actividad completa de la Nitrogenasa. Los genes *fixABCX* codifican para una cadena de transporte de electrones para la Nitrogenasa (Gilles-Gonzalez y González, 2004; Brencic y Winans, 2005).

El funcionamiento de *fixGHIS* es desconocida, mientras que *fixNOQP* codifica una citocromo oxidasa membranal, que es requerida para la respiración de los rhizobia en ambientes con bajo oxígeno (Delany *et al.*, 2000; Brencic y Winans, 2005). Los genes *fixL*, *fixJ* y *fixK* codifican proteínas reguladoras.

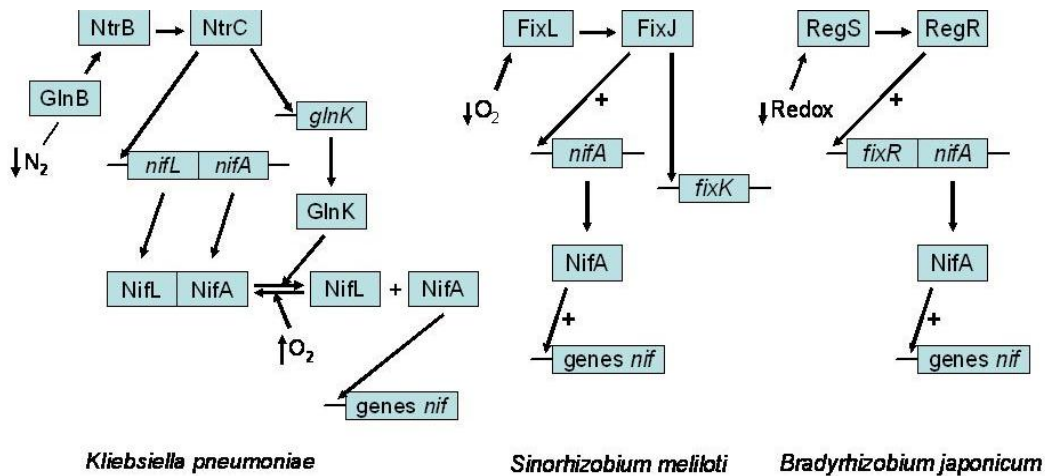


Figura 4. Cascadas regulatoras de los genes *nif* en tres fijadores de N_2 Tomada de Brencic y Winans, 2005).

Los genes *nif* y *fix* son regulados por la concentración de oxígeno, que controla señales importantes en la expresión de estos genes (Gilles-Gonzalez y González. 2004; Brencic y Winans, 2005).

La bacteria es sensible a la tensión de oxígeno debido a la presencia de dos proteínas FixL y NifA. A menor concentración de oxígeno estas proteínas son activas y son responsables de la inducción de genes relacionados en la fijación de nitrógeno.

El sistema compuesto por FixL y FixJ es el regulador de todos los genes *nif* y *fix*.

FixL es una histidina quinasa membranal, la cual responde mediante autofosforilación a bajos niveles de nitrógeno y entonces transfiere al grupo fosforil a FixJ (Loh *et al.*, 2002; Brencic y Winans, 2005).

FixJ fosforilado alternadamente activa la regulación de los genes *FixK* y *NifA*, cuyos productos regulan la transcripción del resto de los genes de fijación de nitrógeno (Lohrke *et al.*, 2001; Brencic y Winans, 2005). FixL es directamente responsable de detectar la tensión de oxígeno intracelular (Heeb *et al.*, 2002). FixK es una proteína reguladora cuya expresión es activada por FixJ en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno. Este es homólogo para la regulación de detección de oxígeno Fnr, quien detecta oxígeno a través del grupo Fe-S por residuos de cisteína cisteína esencial en su N-terminal. Estos residuos de cisteína están ausentes de FixK y de hecho se ha mostrado que la actividad de FixK no esta sujeta a un control directo de oxígeno.

NifA, los genes de fijación de nitrógeno son también controlados por NifA en el nivel de oxígeno. NifA es un regulador transcripcional cuya expresión y actividad son inhibidas por altas concentraciones de oxígeno. En ausencia de oxígeno, NifA activa la expresión de sus genes, así como el de los operones *nifHDKE* y *fixABCX* (Heeb *et al.*, 2002; Brencic y Winans, 2005; Gilles-Gonzalez y González, 2004).

2.3.3 Microorganismos fijadores de nitrógeno

Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr *et al.*, 2003).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentan una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y de asociación con las plantas. La fijación biológica de nitrógeno es llevada a cabo por distintos grupos de bacterias:

Un primer grupo es el *Frankia*, género heterótrofo, perteneciente a la familia *Frankiaceae*, las cuales fijan nitrógeno en simbiosis con plantas denominadas actinorrízicas (plantas que pertenecen a 24 géneros y 8 familias de angiospermas). La capacidad colonizadora de las plantas actinorrízicas, sobre todo en suelos pobres en nitrógeno o en condiciones de estrés ambiental (deforestaciones, incendios, volcanes), las hacen idóneas para la reforestación de los suelos. En esta simbiosis, los nódulos están formados por modificaciones de las raíces laterales que conforman una estructura multilobular, con elementos vasculares centrales rodeados de células corticales infectadas de bacterias, que pasan el nitrógeno fijado a la planta en forma de amonio. Las *Frankia* protegen a la nitrogenasa del oxígeno en el interior de unas estructuras esféricas llamadas vesículas, rodeadas de una cápsula lipídica, con lo que consiguen resistir hasta una concentración de oxígeno del 80% (Pérez y Torralba, 1997).

Un segundo grupo son las cianobacterias, organismos fotótrofos, que pueden fijar nitrógeno en vida libre o formar simbiosis con diversos tipos de plantas. Se sabe que es incorporado 1.5 kg de nitrógeno /Ha al año por líquenes del género *Lobaria*. Entre las simbiosis con Pteridofitas, la más importante es la que se da entre el helecho acuático *Azolla* y *Anabaena*; que llega a fijar más de 600 kg de nitrógeno/Ha al año, siendo muy

aprovechada en la agricultura. También hay simbiosis de *Nostoc* con algunas Cicadales y *Macrozamia* (Pérez y Torralba, 1997; Kneip, 2006; Cerna *et al.*, 2009).

Un tercer grupo son los fijadores de vida libre, que generan amonio para su propio uso (Rueda-Puente *et al.*, 2009). Estas bacterias se encuentran en muchos ecosistemas: suelo, mar, fuentes de agua dulce, sedimentos, etc.

Los principales géneros diazótrofos de vida libre son: *Azotobacter*, *Enterobacter*, *Azotococcus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Chromatium*, *Chlorobium*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, entre otros géneros los cuales realizan la fijación biológica de nitrógeno de manera libre (Sprent, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003; Rueda-Puente *et al.*, 2009).

Un cuarto grupo importante son los rizobia el cual establece una interacción simbiótica con plantas leguminosas. El grupo *Rhizobia* incluye bacterias que fijan nitrógeno asociadas a la planta hospedera y proveen a la planta nitrógeno a cambio de carbono y de un hábitat de protección (Daniel, 2004). Los rizobia los cuales inducen la formación de nódulos en plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae*, con la excepción de una no leguminosa, el género *Parasponia* de la familia *Ulmaceae* (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Daniel, 2004; Martínez-Romero, 2009), son un amplio conjunto de microorganismos en los cuales se incluyen, actualmente, trece géneros que comprenden más de 70 especies, *Rhizobium* (Jordán, 1982), *Allorhizobium* (De Lajudie *et al.*, 1998), *Ensifer* (antes *Sinorhizobium* Chen *et al.*, 1988, Casida, 1982; Young, 2003), *Mesorhizobium* (Jarvis *et al.*, 1997), *Azorhizobium* (Dreyfus *et al.*, 1988), *Bradyrhizobium* (Jordán, 1982), *Methylobacterium* (Sy *et al.*, 2001; Jourand *et al.*, 2004), *Devosia* (Rivas *et al.*, 2002; 2004), *Phylobacterium* (Valverde *et al.*, 2005), *Ochrobactrum* (Trujillo *et al.*, 2005), *Shinella* (Lin *et al.*, 2008), entre las α -proteobacterias y dos géneros de la subclase β -Proteobacteria, *Burkholderia* (Moulin *et al.*, 2001) y *Cupriavidus* (Chen *et al.*, 2001; Vandamme y Coenye, 2004).

Este grupo ha despertado gran interés y suscitado numerosas investigaciones debido a las ventajas tanto ecológicas como económicas que puede proporcionar su adecuada aplicación (Aguirre, 2004; Daniel, 2004; Villegas y Munive, 2005; Urzúa 2005; Bhattacharjee *et al.*, 2009; Cong *et al.*, 2009; Weir, 2011).

2.4 Simbiosis rhizobia-leguminosa

La simbiosis mutualista es una de las más importantes interacciones biológicas, donde los organismos que participan en ella se benefician simultáneamente en situaciones en las que ninguno de ellos podría realizar una función vital o sobrevivir aisladamente. Para que una simbiosis tenga lugar, dos o más organismos diferentes deben vivir en inmediata proximidad. Algunas simbiosis microbianas involucran sólo a microorganismos, mientras que en otras existen asociaciones de microorganismos con insectos, plantas o animales.

Las leguminosas, desde la antigua Roma, ya eran conocidas por su capacidad de enriquecer los suelos. Desde la década de los '70s, el estudio de esta interacción es una línea de investigación de gran impulso en diferentes países incluido México (Aguirre-Medina, 2006). Este sistema aumentó la productividad en la Europa del siglo XVIII y es practicado aún en nuestros días, con el objetivo de entender los factores que permiten una mejor interacción entre diferentes especies de plantas y microorganismos (Giles *et al.*, 2008, Villegas *et al.*, 2006; Walley *et al.*, 2004; Weir *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2010).

La historia de las simbiosis fijadoras de nitrógeno comenzó en el año 1542, en Europa, con el botánico alemán Fuchsius, quien publicó dibujos de plantas noduladas. En 1675, Malpighi observó nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris* y de *Vicia faba*, y en 1866 el botánico ruso Woronin remarcó la presencia de pequeños organismos parecidos a bacterias en el interior de nódulos de plantas de *Alnus glutinosa* y de *Lupinus mutabilis*. Frank (1879) encontró nódulos en plantas jóvenes de leguminosas, y demostró que la esterilización del suelo prevenía la aparición de estos órganos. Hellriegel y Wilfarth (1888) demostraron que la aparición de nódulos era el resultado de una infección externa, aunque fue Beijerinck quien aportó las primeras pruebas del origen bacteriano de los nódulos al aislar dichos organismos a partir de *Vicia faba* y los utilizó para infectar plántulas de *Vicia* desarrolladas sobre suelo estéril (Young *et al.*, 2001; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008).

Esta familia representa un muy importante recurso económico, comestible, maderable, combustible, agrícola y, algo no menos importante, su capacidad de fijar nitrógeno en asociación con bacterias de suelo, con un grupo en particular llamado rhizobia, los

cuales forman estructuras llamadas nódulos encontrados en raíz y en algunos casos en tallo (Doyle y Luckow, 2003; Gu *et al.*, 2008).

La simbiosis rhizobia-leguminosa es el resultado de una interacción muy específica entre la bacteria y la planta. La organogénesis del nódulo es un proceso inducido por un intercambio de señales entre los dos participantes de la interacción, el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta).

Al establecerse la simbiosis se genera un nuevo órgano, el nódulo, localizado en la raíz de las leguminosas o de las plantas actinorizas, al interior del cual la bacteria fija nitrógeno; éste es aprovechado por la planta e incrementa su capacidad para desarrollarse en suelos pobres, especialmente aquellos carentes de nitrógeno (Trinchant *et al.*, 2001; Moulin *et al.*, 2001; Weir, 2011).

En el interior de estas estructuras se localizan los microorganismos, desarrollando una verdadera simbiosis con las plantas; esta simbiosis representa un modelo biológico experimental importante desde el punto de vista económico (Baca *et al.*, 2000) (Figura 5).

En los nódulos que contienen bacterias de rhizobia se reduce el N_2 en NH_3 que la planta utiliza, a cambio ésta le proporciona fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo, los nódulos se desarrollan y son colonizados por la bacteria fijadora de nitrógeno como un resultado del intercambio de señales químicas que se establecen entre los dos simbioses (Rueda-Puente *et al.*, 2009).

La asociación de estas plantas con los rhizobia ayuda al establecimiento de las plantas y al incremento de la fertilidad y de la calidad de los suelos. La simbiosis produce un incremento del contenido de nitrógeno del suelo, de la materia orgánica, de la estabilidad de los agregados del suelo y del transporte del nitrógeno de los organismos fijadores a los no fijadores (Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010).

Es esencial la unión de microorganismos a los pelos radiculares de la planta. Sustancias con efecto mitógeno (factores de nodulación) son sintetizadas por productos de los llamados genes de nodulación del microsimbionte (genes *nod*), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide.



Figura 5. Nódulos de raíz de planta de frijol

La bacteria infecta la raíz en la extremidad de los pelos radicales provocando la curvatura de éstos. Se promueve la penetración de la bacteria, formando el llamado hilo de infección en el interior del cual se desarrollan los microorganismos, estos continúan hasta llegar al cortex radical. La infección conduce a la formación del meristemo nodular. La producción de los factores de nodulación induce, a distancia, la división celular a nivel del cortex (Baca *et al.*, 2000).

Durante el desarrollo de la simbiosis tanto la planta como la bacteria intercambian señales de naturaleza química (Lee y Hirsch, 2006), el microorganismo responde a la presencia de moléculas de bajo peso molecular, secretadas por la planta a través de la raíz, estos compuestos fueron identificados como derivados del 2-fenil 1,4-benzopirona, llamados colectivamente como flavonoides cuya estructura está definida por dos anillos aromáticos, A y B (Figura 7) unidos a un anillo piranosido. Las diferentes modificaciones en la estructura básica producen diferentes clases de flavonoides, incluyendo chalconas, flavononas, flavonas, flavonolonas, isoflavonoides y antocianinas, aunque no todos ellos pueden funcionar como inductores de los genes de nodulación (Figura 6) (Broughton *et al.*, 2000; Brenic y Winans, 2005).

Cada planta produce una mezcla de estas moléculas y la cantidad y variedad depende de la edad y del estado fisiológico de la planta, se ha propuesto que la síntesis de los

flavonoides es usada como un mecanismo para la eliminación de esqueletos carbonados así como un mecanismo de defensa de la planta o como reguladores intrínsecos del crecimiento (Brencic y Winans, 2005; Bais *et al.*, 2006).

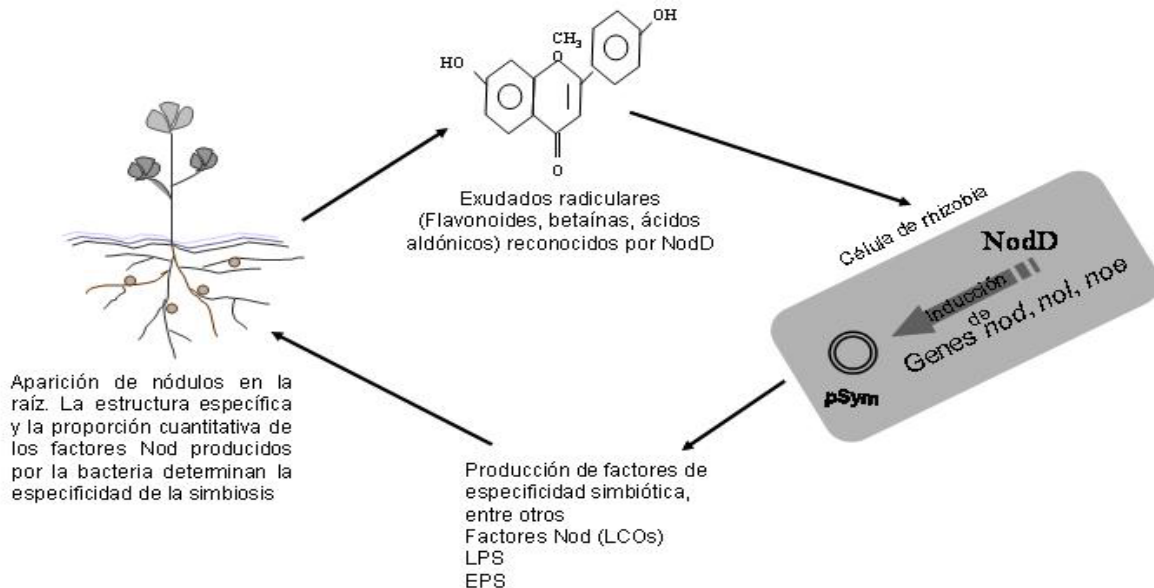


Figura 6. El establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno rizobia-leguminosas requiere de un diálogo molecular entre ambos simbioses. Tanto la planta como la bacteria sufren cambios morfológicos y fisiológicos tras el reconocimiento de los simbioses (Tomado de Villegas y Munive, 2005).

Adjuntamente a la presencia de flavonoides se han identificado otros inductores no flavonoides como la estacridina (N-metilprolina), trigonelina (N-metilprolina metilbetaina), estos son compuestos cuaternarios de amonio conocidos comúnmente como betaínas, los cuales se han encontrado en los exudados de varias leguminosas, además, se han identificado ácidos aldónicos (ácido tetrónico y ácido eritrónico) así como compuestos fenólicos simples (vanillina, alcohol coniferílico, ácido clorogénico, ácido ferúlico) como inductores naturales de los genes *nod* (Brencic y Winans, 2005; Cooper, 2007) (Figura 7).

Los rizobia producen una serie de factores que les permiten una correcta interacción con su hospedero entre los que se encuentran: factores Nod, polisacáridos de superficie, proteínas secretadas por los mecanismos de secreción tipo III y IV, N-acil homoserin lactonas, hopanoides, ácido indolacético, polisacáridos de superficie, factores de *quorum sensing*, (González y Marketon, 2003; Schmeisser *et al.*, 2009), factores de crecimiento y sistemas reguladores dirigidos hacia la planta hospedera los

cuales contribuyen al diálogo molecular y al establecimiento de la simbiosis (Cooper, 2007).

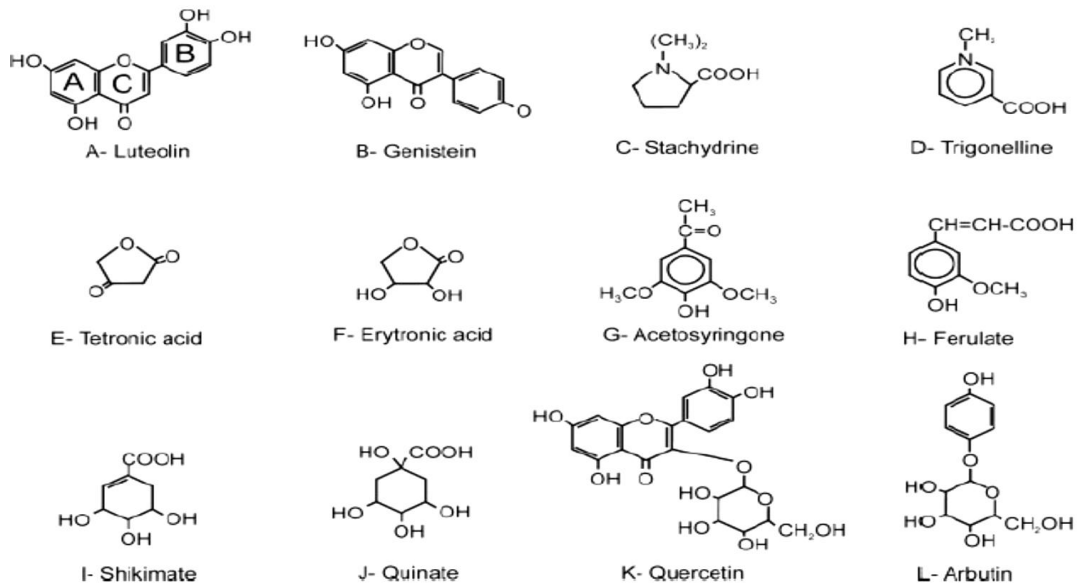


Figura 7. Moléculas reconocidas como señales para la inducción de varios microorganismos asociados a plantas. Luteonina y genisteina son flavonoides que inducen la transcripción de los genes de nodulación en varias especies de rizobia. Estacridina y trigonelina son no flavonoides que inducen los genes *nod* en *S. meliloti*. Los ácidos tetronico y eritronico activan la expresión de los genes *nod* en *S. meliloti*, *M. loti* y en *R. lupini*. Acetosiringona y Ferulato son compuestos fenolicos que inducen los genes de virulencia en *A. tumefaciens*. Shikimato y Quinato inducen los genes de biosíntesis de corinatina en *P. syringae* pv tomato DC 3000. Quercetina y Arbutina son glicosidos fenólicos que activan la producción de siringomicina en *P. syringae* pv. *Syringae* (Tomado de Brencic y Winans, 2005).

2.4.1 Proceso de nodulación

El establecimiento de la simbiosis comprende varias etapas, entre ellas, la secreción de flavonoides por las plantas, la inducción y expresión de genes bacterianos de nodulación y la producción de oligosacáridos, lipopolisacáridos y exopolisacáridos bacterianos (Hungria y Stacy, 2001; Villegas y Munive, 2005).

La colonización ocurre cuando la raíz secreta una señal química que sirve de estímulo para la multiplicación de la bacteria, a continuación la bacteria responde a la presencia de los factores Nod e inicia a curvar el pelo radical, ocurriendo la colonización, sólo en células tetraploides (Fisher y Long, 1992; Lee y Hirsch, 2006).

La infectividad de estas células es transitoria y se pierde en pocas horas. La respuesta de la planta hospedera que conduce a la infección y nodulación, se inicia en menos de dos horas después de la inoculación (Schmeisser *et al.*, 2009).

La asociación Rhizobia-leguminosa se establece como resultado de la expresión de características propias de la asociación de ambas (Schmeisser *et al.*, 2009), entre ellas:

1. Disponibilidad de los nutrientes esenciales para las leguminosas, especialmente molibdeno, calcio y fósforo, cobalto requerido para la síntesis de la vitamina B₁₂, indispensable para la síntesis de la leghemoglobina, que a su vez es coadyuvante de la fijación de nitrógeno atmosférico por los rhizobia. De hecho, se ha observado un efecto sinérgico entre micorrizas y *Rhizobium* (Redente, 1981), ya que las micorrizas ayudan a la leguminosa a absorber fósforo, con ello mejora su eficiencia fotosintética y la fijación biológica de nitrógeno se ve favorecida (Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*, 2010). Muchas de las bacterias que se desarrollan en la rizósfera de la leguminosa pueden tener un efecto inhibitorio de la actividad de *Rhizobium*; sin embargo, la misma planta leguminosa tiene una gran influencia sobre los rhizobia en la rizósfera y puede neutralizar el efecto de las bacterias inhibitorias de la actividad (Smith y Miller, 1974; Schmeisser *et al.*, 2009).

2. Baja concentración de amonio o nitratos disponibles en el suelo, de otra manera la bacteria en lugar de fijar nitrógeno de la atmósfera lo toma ya fijado del suelo.

3. Buena producción de carbohidratos por la planta. Bajo condiciones inadecuadas para una eficiente actividad fotosintética, la planta puede resultar en desventaja, actuando entonces *Rhizobium* como un parásito al consumir los carbohidratos de la fotosíntesis (Félix *et al.*, 1996).

Existen 5 principales etapas en el proceso de nodulación:

a) En las células de los pelos radiculares en la planta, se da el primer reconocimiento y adherencia; etapa donde se lleva a cabo la secreción de compuestos quimiotácticos específicos, como los flavonoides que son compuestos fenólicos que permiten se efectuó el establecimiento de la primera interacción planta-bacteria. Los flavonoides desempeñan diferentes funciones fisiológicas así como la inducción o la inhibición de los genes de nodulación en diferentes poblaciones de rhizobia (Phillips *et al.*, 1988; Brenic y Winans, 2005; Cooper, 2007).

Por otro lado, las variables como tiempos de inducción, la preinducción y las condiciones ambientales como temperatura, humedad y pH, actúan en la actividad de

los genes de nodulación (*nod*) (Begum *et al.*, 2001a y 2001b; Brencic y Winans, 2005; Cooper, 2007).

Los principales inductores de la actividad de los genes *nod* en *Medicago sativa* son luteolina y crysoeriol (3'-metoxiluteolina), mientras que la naringenina es un antagonista de la actividad inductora de estas flavonas (Hartwig *et al.*, 1990; Peters y Long, 1988). Los flavonoides también influyen en el control de la nodulación (Abd-Alla, 2001).

b) Durante la etapa de reconocimiento entre rhizobia y leguminosa, los flavonoides inducen la activación de los genes *nod* y la síntesis de lipo-quitoo-oligosacáridos (LCOs) o Factores Nod. Los cuales son un polímero de N-acetilglucosamina (GlcNac), con diferentes sustituyentes químicos que se le adicionan y determinan la capacidad de nodular diferentes plantas hospederas, los cuales son responsables de los cambios fisiológicos y físicos de la planta hospedera. Posteriormente, la bacteria secreta los factores Nod, debido a esto los pelos radiculares comienzan a curvarse hasta 360° formando una estructura llamada "cayado de pastor" (Wang y Martínez-Romero, 2000; Villegas y Munive, 2005; Brencic y Winans, 2005; Cooper, 2007).

c) Esta etapa, consiste en la hidrólisis de la pared celular por parte de la bacteria y la penetración de esta a la raíz por invaginación de la membrana celular (Ardourel *et al.*, 1994; Villegas y Munive, 2005), induciendo la formación de un hilo o canal de infección compuesto de pared celular, permitiendo la entrada de las bacterias a la planta.

d) En esta etapa, comienza la formación del nódulo como respuesta de la estimulación de la división de las células vegetales por los factores Nod, donde las bacterias en el interior comienzan a dividirse en los espacios intercelulares hasta alcanzar las células del cortex y las células del meristemo. Continúa una división sincronizada de los rhizobia, los cuales se encuentran rodeados por una membrana, producida por la planta, llamada membrana peribacteroidal (MPB) (Brewin *et al.*, 1992; Brencic y Winans, 2005; Cooper, 2007). Al detenerse la división bacteriana, los rhizobia sufren una transformación en células bifurcadas y deformes llamadas bacteroides, los cuales siguen rodeados por la MPB, a este agregado se le llama simbiosoma.

e) Finalizando esta etapa, donde ocurre la formación de un nódulo radical maduro (Figura 8). Esto es llevado con la iniciación de la fijación biológica del nitrógeno, actividad que no se lleva a cabo hasta que esté totalmente formado el bacteroide y se

forme un ambiente de microaerofilia dentro del nódulo. Las células vegetales sintetizan moléculas llamadas nodulinas, las cuales participan en las diferentes etapas de las simbiosis. Una de estas moléculas es una proteína llamada leghemoglobina, que realiza la función de transportador de oxígeno a través de los tejidos vegetales, manteniendo las condiciones de microaerofilia dentro del nódulo (Brewin *et al.*, 1992; Brencic y Winans, 2005; Cooper, 2007).

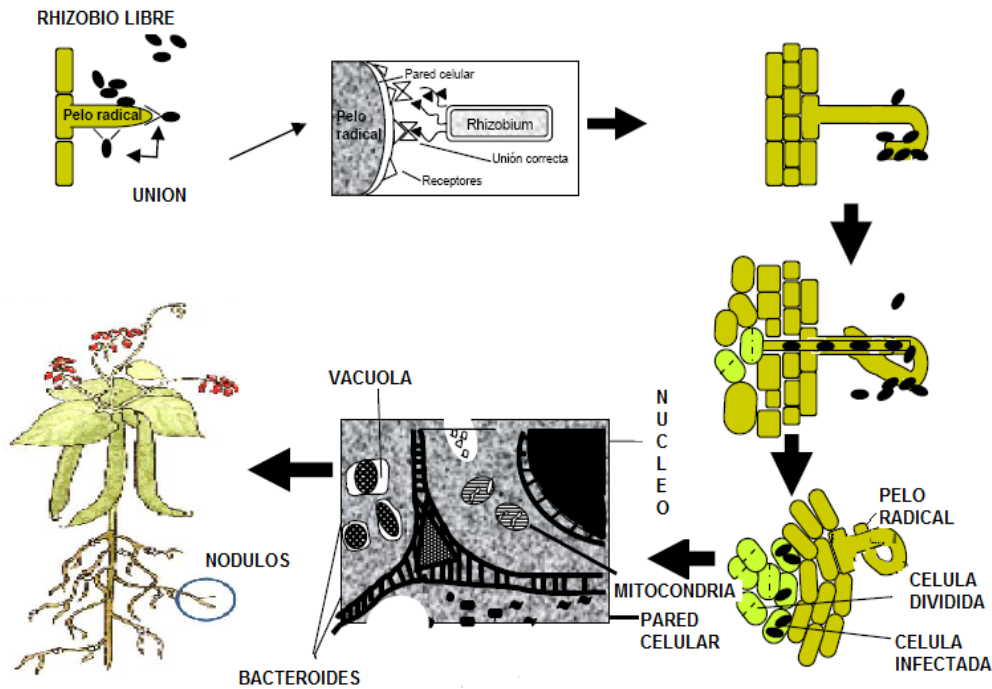


Figura 8. Esquema general del proceso de nodulación. Reconocimiento y adherencia, Curvamiento del pelo radicular, hidrólisis de la pared y penetración. Desarrollo del hilo de infección. Invasión del tejido meristematico y diferenciación. Nódulo maduro fijador de nitrógeno (Tomado de Espinosa y Malpica, 2007).

El sistema vascular se extiende no sólo dentro de la planta sino dentro del nódulo, transportando nutrientes hacia y desde el nódulo (Villegas y Munive, 2005).

Si las condiciones son favorables para la fijación de nitrógeno, el primer nitrógeno fijado se localiza en la membrana celular infectada, luego en su protoplasma, y finalmente, en el bacteroide. Los nódulos activos para la fijación muestran un color rosado debido a la presencia de leghemoglobina, proteína responsable de conservar un microambiente microaerofílico favorable para la fijación del nitrógeno atmosférico (Félix *et al.*, 1996; Villegas y Munive, 2005).

2.4.2 Genes involucrados en la nodulación en rhizobia

Cuando ocurre la fase de reconocimiento entre rhizobia y su planta hospedera, los flavonoides inducen la activación de los genes *nod* y la síntesis de lipo-quitooligosacáridos (LCOs) que además causan la activación de otros genes vegetales (Villegas y Munive, 2005).

Estos lipo-quitooligosacáridos han sido llamados Factores Nod y se les considera responsables de los cambios físicos y fisiológicos que se presentan en la planta hospedera, como son la deformación de las raíces, la división celular y la organización del *primordium* nodular (López-Lara, 2006; Daniel, 2004; Cooper, 2007).

Los genes *nod* (por nodulación), que incluyen a los genes *nol* y *noe*, son determinantes de la especificidad de hospedero y sus productos son responsables de diversos procesos como son la biosíntesis del esqueleto oligosacárido, estructura de base de los LCOs, la biosíntesis o la transferencia de ácidos grasos, la modificación de la estructura de base de la quitina. La estructura de base de esos compuestos es siempre un polímero de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y los diferentes sustituyentes químicos que se le adicionan determinan la capacidad de nodular diferentes plantas hospedero (Figura 9).

Estos genes se localizan en cromosoma. Los flavonoides actúan sobre la proteína NodD que es la responsable de la regulación de los genes *nod* (Dakora, 1994).

Se han descrito hasta el momento dos funciones reguladoras del producto del gen *nodD*: la autorregulación de su transcripción y la activación de la expresión de los genes *nod* (Spaink, 2000; Oldroyd y Downie, 2008).

La nomenclatura de los genes *nod*, se ha extendido a *nol* y *noe* a medida que se ha incrementado el número de genes de nodulación identificados, están clasificados en tres categorías:

Genes *nod* reguladores, genes *nod* comunes y genes *nod* de especificidad (van Rhijn y Vanderleyden 1995; Oldroyd y Downie, 2008).

Gen *nodD* regulador. Los flavonoides producidos por las plantas a nivel de las raíces actúan sobre la proteína NodD (proteína común, principal reguladora en los rhizobia) que es la responsable de la activación de los genes *nod* (Spaink, 2000).

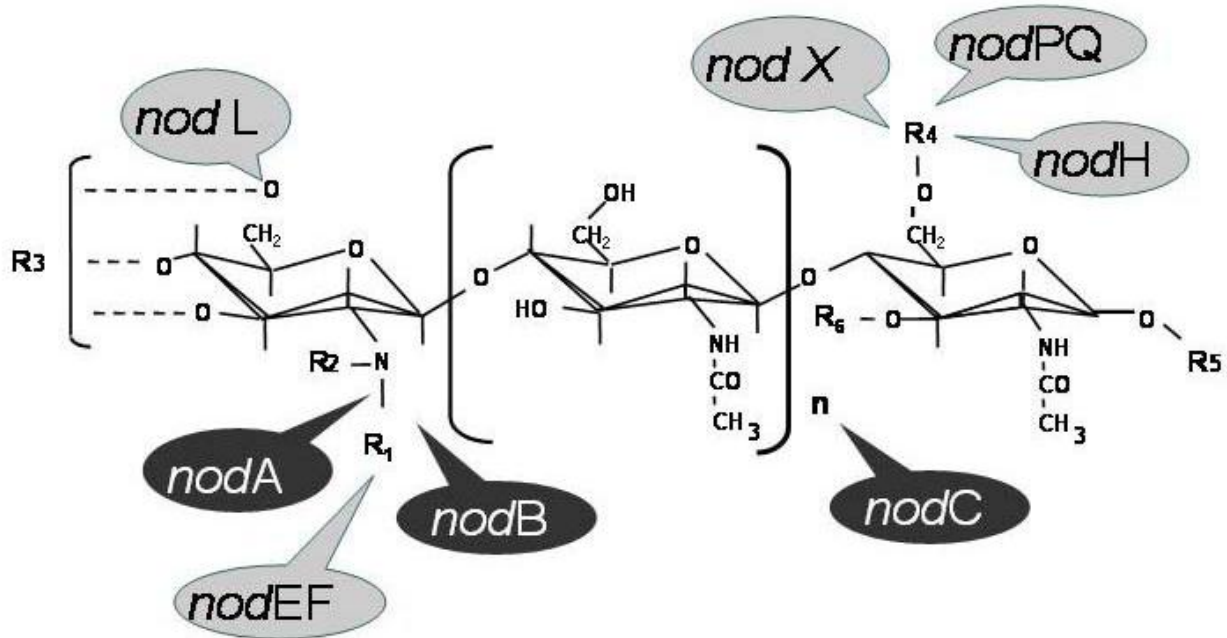


Figura 9. Estructura química de los factores Nod (LCOs). La estructura de base corresponde a un polímero de n residuos de N-acetilglucosamina. Las burbujas indican los sitios de sustitución de radicales por algunos de los productos de los genes de nodulación. Los genes *nodABC* son considerados como genes comunes, el resto se han clasificado como genes de especificidad (Tomado de Villegas y Munive, 2005).

Se han descrito dos funciones reguladoras del producto del gen *nodD*:

La autorregulación de su transcripción y

La activación de la expresión de los genes *nod*.

La proteína NodD interacciona con regiones de DNA de aproximadamente 47 pb, llamadas “cajas *nod*”. Estas regiones se localizan arriba de los operones *nod* y funcionan como activadores de transcripción de los genes *nod* inducibles (Spaink, 2000; Villegas y Munive, 2005; Yeh *et al.*, 2002).

Genes *nod* comunes. Los genes *nodABC* son aquellos conocidos como *nod* comunes ya que se encuentran presentes en todos los rhizobia. La inactivación de uno de estos genes o del gen regulador *nodD* evita la aparición de los fenotipos característicos de las primeras etapas de establecimiento de la simbiosis. Además, la expresión de estos genes es suficiente para producir la estructura básica de los LCOs (Spaink, 2000).

NodA es una aciltransferasa responsable de la N-acetilación de la cadena oligosacárida. NodB es una desacetilasa que actúa sobre el extremo no reductor del

esqueleto del oligosacárido de quitina. La proteína NodC es un homólogo de ciertas quitina-sintetizas, posee actividad N-acetilglucosaminil transferasa y se localiza en la membrana celular interna (Villegas y Munive, 2005; Brencic y Winans, 2005) (Figura 10).

Genes *nodABC* de especificidad. Inicialmente, los genes *nodABC* fueron descritos como genes intercambiables entre las especies de rhizobia, pero en la actualidad, se ha reconocido que el producto de estos genes puede presentar una actividad diferente de una especie bacteriana a otra (Brencic y Winans, 2005). Se considera que esto se debe a modificaciones cualitativas de los factores Nod, ya sea a nivel de la longitud de la cadena polisacárido o de los radicales químicos de los LCOs. Incluso se ha demostrado que las proteínas NodA y NodC participan en la determinación del espectro hospedero (Villegas y Munive, 2005).

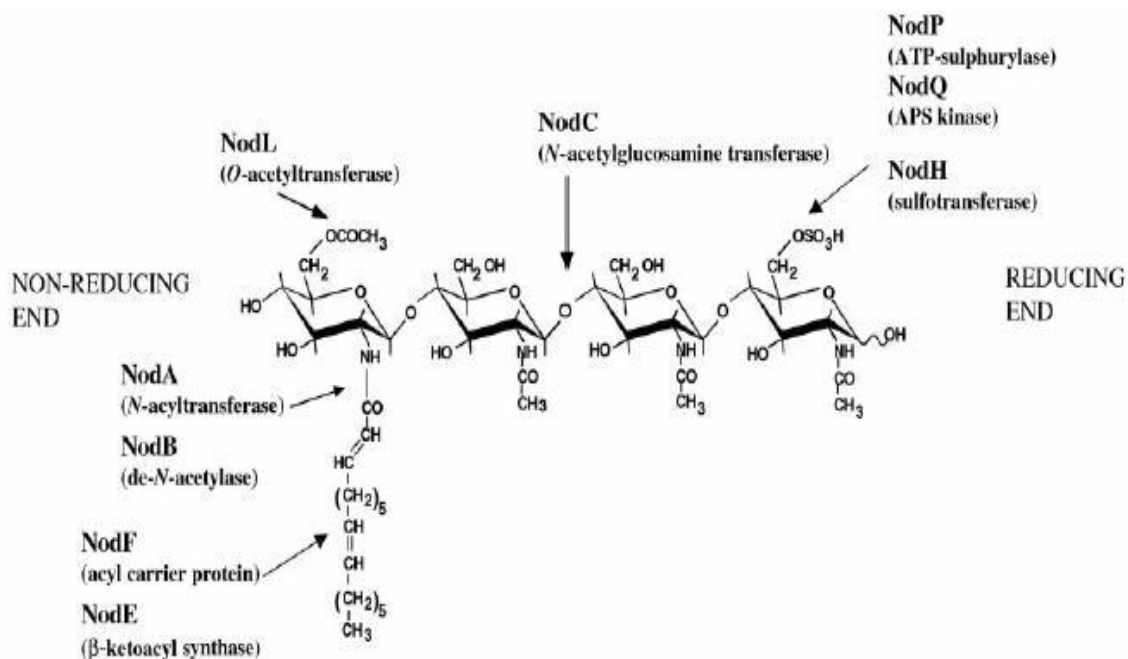


Figura 10. Estructura de los lipo-quitina-oligosacáridos (LCOs) o Factores Nod y la actividad de cada proteína Nod (Tomado de Oldroyd y Downie, 2008).

Genes *nod* de especificidad. Los productos de los genes de especificidad (*nod*, *nodI*, *noe*) son responsables de la modificación de los grupos químicos presentes en los extremos de la estructura de los LCOs (Villegas y Munive, 2005; Spaink, 2000).

2.5 Rhizobia

El grupo más estudiado de los fijadores simbióticos de nitrógeno, es el grupo de los llamados rhizobia. El término rhizobia (*del griego rizo, raíz y bios, vida*) fue acuñado para describir y agrupar aquellas bacterias quimioorganotróficas que son capaces de inducir la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos, ya sea en raíz o tallo, en una o más especies de plantas leguminosas y que pueden llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno durante esta asociación. El grupo rhizobia son bacterias bacilares quimioorganotróficas, aerobias, que no forman esporas, presentan flagelos para su movilidad, además su pH de crecimiento es de 6.8, en términos generales. Sus dimensiones son de entre 0.5 a 0.9 micras de ancho y entre 1 a 3 micras de largo. Se estima que aproximadamente el 60%- 80% de la fijación biológica del nitrógeno es llevado a cabo por este grupo (Figura 11).

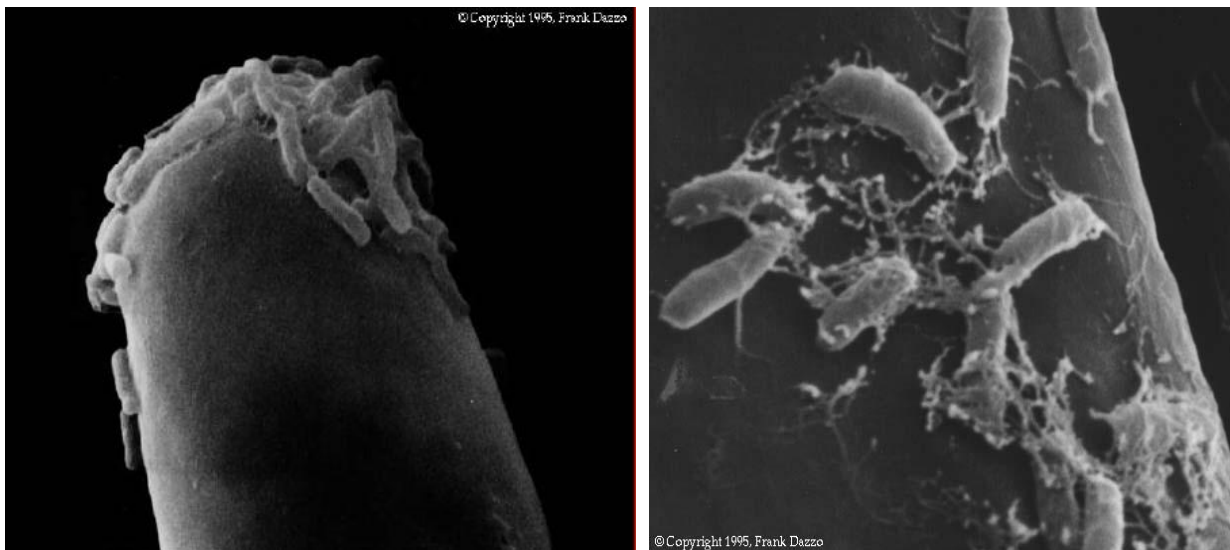


Figura 11. Imagen de microscopía electrónica de *Rhizobium trifolii*. © 1995, Frank Dazzo

Como ya se mencionó, en nuestros días se considera el grupo de los rhizobia agrupa a aquellas bacterias capaces de nodular una o más especies de la familia Leguminosae y que pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno durante esta asociación simbiótica (Moulin *et al.*, 2001) e incluye miembros de las subclases α y β de las proteobacterias, al día de hoy, distribuidos en doce géneros que comprenden 92 especies. Este grupo bacteriano constituido por bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Bradyrhizobium*,

Methylobacterium, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Ochrobactrum*, *Shinella* y *Phyllobacterium*.

La clasificación de los rhizobia ha evolucionado debido a la utilización de datos polifásicos y filogenéticos. Con la introducción de la taxonomía numérica y de técnicas moleculares como: hibridación DNA/DNA, la electroforesis de proteínas totales, el análisis de los perfiles de restricción de los genes ribosomales (ARDRA) y el acceso generalizado a otros métodos genéticos, lo que ha permitido la identificación y descripción de nuevos géneros y nuevas especies (Villegas y Munive, 2005; Contreras-Moreira *et al.*, 2009). Además, el análisis de los marcadores simbióticos muestra evidencia de transferencia lateral de plásmidos dentro de cada grupo pero no entre ellos (Silva y Vinuesa, 2007; Vinuesa *et al.*, 2008).

Estas bacterias están asociadas a las raíces de leguminosas, forman una estructura altamente especializada, el nódulo, donde ocurre la fijación biológica de N₂. En el interior de este, la bacteria encuentra las condiciones fisiológicas adecuadas para poder fijar nitrógeno, esto beneficia a la planta, aumentando su capacidad para desarrollarse en suelos pobres desde el punto de vista nutricional (Trinchant *et al.*, 2001).

2.5.1 Taxonomía de rhizobia

En 1888, Beijerinck obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo nombro *Bacillus radicícola*. Consecutivamente, Frank propuso el nombre de *Rhizobium* para estos aislados. En 1929 se tenían reconocidas seis especies: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. El grupo rhizobia es un grupo diverso de bacterias del suelo que son capaces de formar nódulos en la raíz y fijar nitrógeno, existen en simbiosis con plantas leguminosas (Broughton, 2003; Sawada *et al.*, 2003). En años recientes, esta clasificación ha estado bajo cambios y revisiones y varias especies nuevas han sido descritas. Actualmente la taxonomía del grupo rhizobia se basa en un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. El uso del enfoque polifásico permite una clasificación más natural y confiable. Se han descrito hasta el momento, 12 géneros pertenecientes a 92 especies (Weir, 2008; 2011).

Estas bacterias simbióticas se encuentran agrupadas entre 5 ramas de la subclase α -proteobacterias y 2 ramas de las β -proteobacterias junto con otras bacterias no simbióticas. Esta clasificación no es definitiva ya que se estima que solamente el 20% de las leguminosas han sido examinadas por su capacidad de ser noduladas (Weir, 2008).

La actual clasificación de rhizobia, como para otros grupos bacterianos es fuertemente influenciada por clasificaciones polifásicas, tomando en cuenta características fenotípicas así como caracterización genética, de marcadores como el gen 16 S rRNA (Martens *et al.*, 2007; Weir, 2011) y actualmente otros genes de mantenimiento (revisado en publicaciones de Vinuesa *et al.* en [http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Publications by Pablo Vinuesa and Colleagues.html](http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Publications%20by%20Pablo%20Vinuesa%20and%20Colleagues.html)). La base de datos más importante para el desarrollo actual de la clasificación de los rhizobia y de las bacterias en su conjunto, está constituido por las secuencias del gen 16S rDNA. Los datos de secuenciación del 16S rDNA corroboran la división de los rhizobia en varios géneros (Villegas y Munive, 2005).

Los rhizobia que pertenecen a las Alphaproteobacterias incluyen los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* y *Ensifer* (Antes *Sinorhizobium*), en base a la filogenética de 16S rRNA *Agrobacterium* y *Allorhizobium* son dispersos filogenéticamente entre *Rhizobium* (van Berkum *et al.*, 2003). Esta observación y la ausencia de una diferenciación fenotípica clara, ha dado lugar a una propuesta de una combinación de tres géneros en uno solo (Young *et al.*, 2001). Sin embargo, este esquema ha sido cambiado y no es generalmente aceptado (Farrand *et al.*, 2003). Así mismo, Konstantinidis y Tiedje (2005) señalan que hay gran valor comparativo en líneas taxonómicas que son comparables entre linajes, aunque este puede no ser viable en la diversidad en procariotas, podemos establecer comparaciones en grupos en partes del árbol de las alphaproteobacteria. Young *et al.* (2001) mencionan que *Agrobacterium rhizogenes* es mejor considerado como miembro de *Rhizobium*, debido a que se ha encontrado estar cercanamente relacionado con la especie tipo *Rhizobium leguminosarum*. Se espera que la taxonomía de estos organismos en un futuro se resuelva, en base a un análisis exhaustivo con marcadores adicionales (secuencias y no secuencias).

La filogenia del gen 16S rRNA fue considerado originalmente ser un buen modelo para la llamada filogenia organísmica (Olsen y Woese, 1993). Algunos estudios han mostrado que los genes rRNA del grupo rhizobia pueden ocasionalmente presentar transferencia lateral y recombinación genética, resultando en misticismo en la secuencia (Eardly *et al.*, 2005; van Berkum *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005b).

Considerando las incongruencias filogenéticas reportadas entre los genes que constituyen parte del genoma básico (*rrs*, *atpD*, *recA*, *glnA* y *glnII*) y los genes simbióticos que forman parte del paquete genético flexible (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodD* y *nifH*), así como la existencia de fondos genéticos no simbióticos, la reconstrucción de la filogenia de los rhizobia se debe de considerar tres criterios que incluyan: Genes cromosomales comunes del genoma básico, genes involucrados con la fijación de nitrógeno; para establecer relaciones con otras bacterias fijadoras de nitrógeno y genes de la nodulación; que son buenos marcadores de la coevolución de los rhizobia con su hospedero, así como de su origen biogeográfico (Sarita *et al.*, 2005).

2.5.2 Nomenclatura moderna de rhizobia

La base de datos más importante y disponible para el desarrollo actual de la clasificación de los rhizobia y de las bacterias en su conjunto, está constituido por las secuencias del gen 16S rDNA. Los datos de secuenciación del gen 16S rDNA corroboran la división de los rhizobia en varios géneros. Sin embargo, numerosos estudios se abocan a la búsqueda de nuevos marcadores que brinden información suficiente para identificar y caracterizar a estas bacterias, sin tener que recurrir a la hibridación DNA/DNA (Contreras-Moreira *et al.*, 2008).

A la fecha, las bacterias que pertenecen al grupo de rhizobia son los siguientes géneros:

Rhizobium. El género *Rhizobium*, agrupaba a los rhizobia de crecimiento rápido. Pero sobre la base de esta clasificación, el género *Rhizobium* constituía un grupo diverso con algunas especies más cercanas al género *Agrobacterium* que a otras especies de *Rhizobium*. Esta diversidad genética, puesta de manifiesto por los estudios basados en un estudio polifásico, condujo a la revisión del género *Rhizobium* y a la reclasificación de ciertas especies en nuevos géneros (Jarvis *et al.*, 1997). Farrand *et*

al., (2003) presentan evidencias clásicas como moleculares, de las diferencias entre los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium*, lo que soporta la separación de ambos géneros, también consideran que no existe soporte científico suficiente para proponer la inclusión del género *Agrobacterium* dentro del género *Rhizobium*. Este género está formado por 22 especies (García-Fraile *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2008; Ramírez-Bahena *et al.*, 2008; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009).

Mesorhizobium. Formada por 19 especies (Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Nandasena *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009).

El análisis de secuencias, del gen 16S rDNA de diferentes especies de *Rhizobium*, confirmó la existencia de varias ramas filogenéticas divergentes. El análisis comparativo de las secuencias del gen 16S rDNA indica que el género *Mesorhizobium* es más cercano al género *Phyllobacterium* que a los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y sus características fenotípicas justifican la separación de este género, de la familia Rhizobiaceae y de su inclusión en la familia Phyllobacteriaceae (Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Nandasena *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2009).

Ensifer. (Previamente *Sinorhizobium*): formada por 15 especies (Young, 2003; Lloret *et al.*, 2007). El género *Sinorhizobium* fue propuesto por Chen *et al.*, (1988), para las cepas de crecimiento rápido que nodulan la soya, con dos especies *S. fredii* y *S. xinjiangensis*. Sobre la base de las secuencias del gen 16S rDNA y de hibridaciones DNA/DNA, esta rama filogenética fue individualizada por la creación de un nuevo género (Martens *et al.*, 2007). Con el análisis del gen 16S rRNA es evidente que el género *Ensifer* está altamente relacionado con *Sinorhizobium* (Balkwill, 2005). Este organismo comprende bacterias predadoras del suelo que fueron originalmente descritas en un género separado como *Ensifer adhaerens*, basado principalmente en características morfológicas y fenotípicas, los análisis filogenéticos de los genes 16S rRNA y *recA* (Balkwill, 2005; Willems *et al.*, 2003) indican que *Ensifer* forma un grupo bien establecido junto con *Sinorhizobium*, concluyendo que el género *Ensifer* y *Sinorhizobium* pueden ser considerados como un solo taxón (Willems *et al.*, 2003). De acuerdo al artículo 38 del Código de Bacteriología el nombre más antiguo, *Ensifer*, tiene prioridad sobre *Sinorhizobium* (Young, 2003; Lloret *et al.*, 2007).

Bradyrhizobium. Formado por 8 especies, el género *Bradyrhizobium* fue inicialmente propuesto por Jordán (1982) para las bacterias de crecimiento lento, fijadoras de nitrógeno que pueden nodular plantas leguminosas. Los *Bradyrhizobium* de otras leguminosas son referidas como *Bradyrhizobium sp* seguido por el nombre de la leguminosa hospedero entre paréntesis. Un gran número de especies ha sido descrito para aislados de leguminosas en el Sur de Australia y para aislados de varias plantas herbáceas y árboles del Este de África (Islam *et al.*, 2008; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009).

Azorhizobium. Formado por 2 especies. Propuesto para clasificar a las bacterias fijadoras de nitrógeno que inducen la formación de nódulos a la vez en tallo y en raíz de *Sesbania rostrata*, una leguminosa tropical. El género es capaz de fijar el nitrógeno en cultivo puro y de asimilarlo a baja tensión de oxígeno (3%). Este género es fisiológicamente diferente de *Rhizobium* y de *Bradyrhizobium*, por análisis del gen 16S *rDNA* se encuentra asociado taxonómicamente al género *Xanthobacter*, pero sus características fenotípicas y genotípicas son lo suficientemente diferentes para considerarlo como un género aparte.

Methylobacterium. Formado por una especie, Patt *et al.* (1976) establecieron el género *Methylobacterium*, constituido por todos los metilotrófos facultativos, de los cuales, algunos podían asimilar el metano. La especie *Methylobacterium nodulans* fue descrita por Sy *et al.* (2001) para definir a las bacterias aisladas de *Crotalaria sp.* capaces de fijar el nitrógeno en simbiosis con estas plantas. Estas bacterias pueden desarrollarse sobre metanol facultativamente, lo que las hace *a priori* la única especie entre los rhizobia capaz de desarrollarse en metanol.

Burkholderia. Formado por 7 especies (Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Los rhizobia generalmente representan a los principales linajes dentro de las α Proteobacterias. La fijación de nitrógeno ya había sido documentada en otros 13 linajes diferentes, incluyendo a las β Proteobacterias, pero la capacidad de nodular no fue descrita hasta 2001, año en el que Moulin *et al.*, reportaron a dos cepas capaces de nodular plantas leguminosas, *B. tuberum* y *B. phymatum* (Vandamme *et al.*, 2002).

Cupriavidus. Formado por una especie. El género *Ralstonia* fue establecido por Yabuuchi *et al.* (1995) para agrupar, originalmente, a las especies *Alcaligenes*

eutrophus, *Pseudomonas solanacearum* y *Pseudomonas pickettii*. La especie *R. taiwanensis*, aislada de nódulos de *Mimosa*, constituía la única especie del género *Ralstonia* capaz de nodular plantas leguminosas (Chen *et al.*, 2001). Actualmente todos los miembros del género *Wautersia* (*Ralstonia*) han sido reclasificados dentro del género *Cupriavidus*.

Devosia. Formado por una especie. El género *Devosia* fue descrito por Rivas *et al.* (2002) como capaz de formar una asociación simbiótica con plantas pertenecientes al género *Neptunia*, mediante un proceso de infección único. La especie *N. natans* es una leguminosa acuática de regiones tropicales y subtropicales, que desarrolla tallos flotantes que crecen abundantemente, desarrollando nódulos fijadores de nitrógeno asociados a estas ramas. Hasta ese momento, la única especie descrita como capaz de nodular estas plantas pertenecía al género *Allorhizobium*, de la familia *Rhizobiaceae*. La especie propuesta es *D. neptuniae*, incluida en la familia *Hyphomicrobiaceae*. Estas cepas difieren de la única especie de *Devosia* descrita hasta la fecha, *D. riboflavina*, por análisis del gen 16S rDNA y por la presencia de genes de nodulación (*nod*) y de fijación de nitrógeno (*nif*).

Ochrobactrum. Formado por dos especies (Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007). Este género pertenece a la familia *Brucellaceae* y fue descrito por primera vez en 1988. La especie más reciente es *Ochrobactrum cytisi*, aislada de nódulos de *Cytisus scoparius* que crece en los suelos de España (Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007).

Phyllobacterium. El primer aislamiento de cepas de *Phyllobacterium* fue reportado en 1902 por Zimmermann, pero el nombre del género fue originalmente propuesto por Knösel (1984), para describir bacterias que desarrollan nódulos en las hojas de plantas tropicales de ornato. La descripción de este género estaba basada en características fenotípicas. Después sobre las bases de las características moleculares (hibridaciones DNA-DNA y la composición de los aminoácidos), se reclasificó a *Phyllobacterium rubiacearum*. El género *Phyllobacterium* incluye a *P. myrsinacearum* y dos especies descritas *Phyllobacterium trifolii* y *Phyllobacterium catacumbae*. Basado en análisis filogenético, se proponen nuevas especies *P. leguminon*, *P. ifriqiense*, *P. brassicacearum* y *P. bourgognense* (Mantelin *et al.*, 2006).

Shinella. Formada por una sola especie (Lin *et al.*, 2008). *Shinella* es el género más recientemente descrito con una especie que pertenece al grupo de bacterias nodulantes, *Shinella kummerowiae*, aislada de leguminosas herbales *Kummerowia stipulacea* provenientes de la provincia Shandong en China (Lin *et al.*, 2008).

Con relación a las técnicas moleculares que han sido empleadas para el estudio de las bacterias pertenecientes al grupo de los rhizobia, sería muy extenso el describir el gran número implicado en estos estudios (Weir, 2011).

2.6 Biofertilizantes

El uso de microorganismos en la agricultura ha sido también denominado inoculación (Sylvester-Bradley *et al.*, 1985) y últimamente biofertilización. Los biofertilizantes son recomendados por la Agenda 21 como resultado de la llamada Cumbre de la Tierra, firmada en Río de Janeiro en 1992. Son considerados como biotecnologías que contribuyen al desarrollo sostenible por ser técnicamente factibles, dentro del nivel científico-técnico de un país, y que proveen beneficios tangibles a los cultivos agrícolas y al productor, además, son ambientalmente seguros y socioeconómica y culturalmente aceptables (Aguirre, 2004).

La utilización de microorganismos como biofertilizantes, por su capacidad de estimular el crecimiento vegetal, fijar nitrógeno atmosférico e incrementar la absorción de nutrientes, es un proceso establecido en diferentes partes del mundo (Aguirre-Medina, 2006).

Entre las plantas y los microorganismos se establece una estrecha relación a nivel de la rizósfera, que es un reservorio de nutrientes para la microbiota y la planta. Los biofertilizantes, o inoculantes, constituyen un componente vital de los sistemas sostenibles, al establecer un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable, al reducir las aplicaciones de algunos agroquímicos y de mejorar, y hacer más eficientes, los nutrientes disponibles en cada hábitat (Aguirre, 2004), debido a que los sistemas agrícolas enfrentan el problema de lograr una producción sostenida y, para tal fin, es necesario fomentar el uso y el manejo efectivo de los recursos bióticos y abióticos de los agroecosistemas, con la implementación de una agricultura sustentable (Aguirre, 2001b; Urzúa, 2005; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009; Zahir *et al.*,

2010). Por lo que, después de la crisis energética mundial de los años setenta, el estudio de las bacterias asociadas a las plantas avanzó rápidamente. La aplicación del biofertilizante se efectúa al momento de la siembra, recubriendo la semilla, con el fin de que pueda establecerse una buena colonización en las raíces durante las primeras etapas de desarrollo (INIFAP, 2000; Aguirre-Medina, 2006; Cong *et al.*, 2009).

Se han detectado géneros como: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Herbaspirillum*, *Beijerinckia*, y *Clostridium* entre otras (Bastian *et al.*, 1998; Rueda-Puente *et al.*, 2009) que se han utilizado como biofertilizantes en la agricultura orgánica.

La inoculación con cultivos bacterianos ha dado como respuesta incremento en el rendimiento del 10 a 30%, cuando se coloniza en las primeras etapas de desarrollo con una cantidad óptima de inóculo (Okón y Labandera, 1994).

2.6.1 Experiencias obtenidas con la inoculación de rizobia

En los últimos años se han obtenido resultados satisfactorios en México, con la aplicación de diversos microorganismos en campos de cultivos de gramíneas y leguminosas y en algunos perennes tropicales en vivero (Aguirre, 2001b; Mendoza y Aguirre, 2002; Aguirre-Medina, 2006; Rueda-Puente *et al.*, 2009).

La inoculación de leguminosas con *Rhizobium* y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal han tenido una interacción positiva en el desarrollo radical y del vástago de frijol, favoreciendo la nodulación y fijación de nitrógeno de las leguminosas (Aguirre *et al.*, 2005).

La respuesta a *Rhizobium* ha sido variada en los resultados de investigación; sin embargo, en Querétaro la respuesta a la cepa *R. etli* fue superior en 31% al testigo sin biofertilizar. El incremento en la biomasa, el contenido de fósforo y el rendimiento del frijol ha sido consignado por Aguirre y Kohashi (2002) y Aguirre *et al.* (2005) en condiciones de invernadero. En el Noreste de México y en el Pacífico Sur, donde se validó la biofertilización, los rendimientos más altos se lograron con los microorganismos *Rhizobium-Glomus*. El efecto benéfico de la simbiosis doble en frijol también ha sido señalado por otros investigadores en México (Camas, 2000; Uribe, 2000) o en otras plantas como *Leucaena* (Aguirre y Velazco, 1994). El rendimiento de

diferentes variedades de frijol fue superior cuando se biofertilizó con un microorganismo o la combinación de dos de ellos, *Rhizobium etli* y *Glomus intraradices*, en comparación con el testigo sin biofertilizante. Las diferencias encontradas en porcentaje van del 16 al 70% con algún microsimbionte solo (Aguirre, 2004). Resultados importantes sin la aplicación de fertilizante han sido obtenidos en diversas regiones de México, como en Chiapas (Camas, 2000), en Guerrero (Cruzaley, 2000), Veracruz (Durán *et al.*, 2001) y Coahuila (Aguirre, 2004).

Los cultivos desarrollados en parcelas donde se aplicó una dosis de fertilizante de 40-40-00 (N-P₂O₅-K₂O), además de inocular *Rhizobium-Glomus*, los rendimientos producidos fueron mayores, en comparación con la aplicación solamente de fertilizante (Aguirre *et al.*, 2005).

En Morelos, en la localidad de Yecapixtla, la diferencia en rendimiento entre el tratamiento con *Rhizobium* solo y *Rhizobium* mas fertilizante, fue de 3-13% en comparación al tratamiento sólo con *Rhizobium*; en Tlayacapán y Zacatepec las diferencias más altas fueron con la combinación *Rhizobium*+fertilizante químico (Aguirre, 2004).

En Puebla, la reducción en el rendimiento fue de 14-22% cuando se fertilizó el frijol además de incluir a *Rhizobium* y *Glomus*, en comparación a la sola aplicación de biofertilización. Por lo que Aguirre *et al.* (2005) concluyen que con alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo, las bacterias fijadoras de nitrógeno no cumplen con su función de fijar el nitrógeno atmosférico sino que, toman el disponible en el suelo y el proceso simbiótico es menos probable que se establezca (Wani *et al.*, 1997; Aguirre, 2004).

Olivares *et al.* (1983) muestran resultados significativos en el rendimiento de haba cuando se aplica fertilizante nitrogenado y azufre, conjuntamente con la inoculación de la semilla con *Rhizobium leguminosarum* en campo. El peso de nódulos se reduce drásticamente a concentraciones de 5.0 mM de NO₃⁻. Con suplementos de 2.5 mM de NO₃⁻ o menos, se incrementa el peso de los nódulos (Sandoval, 1997).

Gou *et al.* (1992) evaluaron cuatro componentes de nitrógeno (N-nitrato, N-Urea, N-nitrato de amonio y N-cloruro de amonio) sobre la nodulación y fijación de nitrógeno, encontrando que los cuatro tienen efectos depresivos sobre la formación y crecimiento de nódulos y sobre la actividad de la nitrogenasa.

Cuando hay una buena disponibilidad de nutrientes en el suelo, principalmente nitrógeno, la asociación rhizobia-leguminosa, es menor, debido a que la planta tiene el nitrógeno necesario para su desarrollo y no envía señalamiento para que se dé el proceso de infección, de manera general hay una inhibición en este proceso (Sandoval, 1997). En pruebas experimentales y de campo el efecto de los biofertilizantes ha sido conocido como una forma de manejo sostenible de los agroecosistemas (Dobbelaere *et al.*, 2003; Lucy *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2008) sin embargo, el éxito en el manejo de biofertilizantes reside en el estudio de cepas compatibles y muchas veces específicas a un cultivo y las condiciones ecológicas del suelo (Reyes *et al.*, 2008).

2.7 Marcadores moleculares

El análisis e identificación de microorganismos ha experimentado un notable avance en los últimos años, ligado al desarrollo de las técnicas de biología molecular. La sencillez y reproducibilidad de estas técnicas, ha permitido sustituir o complementar las técnicas tradicionales de microbiología clásica, basadas fundamentalmente en el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo y posterior identificación mediante pruebas bioquímicas, por otras que se basan fundamentalmente en el análisis de algunas de las macromoléculas (ADN, ARN, proteínas) de los microorganismos o de las comunidades microbianas (Escalante, 2007).

El interés en la búsqueda de medios para el estudio de la diversidad microbiana ha crecido enormemente desde 1975. La gran mayoría de ellos está enfocada a la caracterización de los microorganismos, estando la mitad de ellos basados en el análisis de DNA total, o de secuencias objetivo de DNA (Morris *et al.*, 2002).

Más de la mitad de los estudios realizados en los últimos 25 años han estado enfocados al estudio del efecto de factores ambientales específicos en la biodiversidad, con el fin de medir cambios sobre la biodiversidad en el tiempo y el espacio, o para comparar la similitud de una población en un sitio dado, con el de esa población en presencia de una fuente de contaminación. Estos objetivos son paralelos a otros, como lo es el estudio del efecto de los fertilizantes en los cultivos o en la actividad microbiana, o el estudio de la densidad de población en relación a la distancia a una refinería (Morris *et al.*, 2002).

Teóricamente, es posible definir como "marcador" biológico cualquier característica heredable que permita estudiar la diversidad genética. Hasta hace algunos años, la mayoría de los "marcadores" que se utilizaban eran caracteres morfológicos (fenotípicos); sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de estudio del material genético desarrolladas a partir del descubrimiento de la estructura del DNA en 1953, y el incremento de su uso en forma explosiva durante la última década, la tendencia actual es de definir un grupo de marcadores genéticos (preferentemente cromosómicos) que permitan generalizar los estudios de diversidad y variabilidad del material genético y, en consecuencia, de las poblaciones bacterianas (Contreras-Moreira *et al.*, 2008).

Para el análisis de marcadores de DNA se usan diferentes métodos que se pueden agrupar de manera muy general en dos categorías. La primera categoría integra las técnicas fundamentadas en la hibridación DNA/DNA y la segunda categoría, la cual contiene el mayor número de técnicas, agrupa a las metodologías que se basan en la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR, por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction).

2.7.1 Análisis de secuencias del 16S rDNA

Los genes del RNA ribosomal (rDNA) han contribuido ampliamente al estudio y percepción de la ecología microbiana, la diversidad y la evolución. Los ortólogos de genes de rRNA se encuentran en cada organismo viviente, y participan como componentes de los ribosomas, responsables de la síntesis de polipéptidos. Se sabe que los dominios dentro de los genes ribosomales y/u operones evolucionan a diferentes velocidades, permitiendo los análisis filogenéticos en varios niveles de resolución taxonómica, de manera que las diferentes regiones de los operones ribosomales han sido blanco para análisis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de diversos grupos bacterianos. La estructura del operón rDNA (*rrn*) de los procariontes incluye los genes rRNA, *rrf*, *rrs* y *rrl*, que codifican para la molécula estructural de rRNA requerida para el ensamble y función (rRNA: 5S, 16S y 23S respectivamente) (Rademaker *et al.*, 2005).

El RNA ribosomal 16S es un polirribunucleótido codificado por el gen *rrs* también denominado 16S rDNA, y a partir de la secuencia genética se puede obtener

información filogenética y taxonómica. Como de cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, la cadena de DNA del gen 16S rDNA se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla, lo que confiere a los rRNAs estructuras secundarias altamente conservadas que permiten el alineamiento de secuencias de rRNA de taxa lejanamente relacionadas (Rodicio y Mendoza, 2004). Su transmisión es principalmente vertical y se considera que es muy limitada la transferencia génica horizontal entre microorganismos. La longitud de su secuencia tiene un tamaño adecuado para proporcionar suficiente información y permite realizar reconstrucciones filogenéticas de los microorganismos (Rodicio y Mendoza, 2004; Nogales, 2005).

El análisis de la secuencia de los genes 16S rDNA de distintos grupos filogenéticos reveló la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, las cuales se tratan de secuencias específicas cortas que aparecen, o no, en la mayor parte de un grupo filogenético determinado, por lo que los oligonucleótidos pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria en un grupo (Rodicio y Mendoza, 2004).

La comparación de las secuencias del gen 16S rDNA es una herramienta poderosa para inferir la filogenia (evolución y relación) entre bacterias.

La identificación basada en la secuencia del gen 16S rDNA en los laboratorios microbiológicos se ha expandido hacia el estudio de organismos cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible o muy difícil, como es el caso de bacterias no cultivables, hecho que en ocasiones ha conducido a la descripción de nuevos microorganismos (Rodicio y Mendoza, 2004).

Por otro lado, el análisis de restricción de amplificadores del DNA ribosomal 16S (ARDRA) es una alternativa para buscar información filogenética y taxonómica que encierra el gen 16S rDNA, con base en un análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos después de la digestión del amplificado con enzimas de restricción. La relación matemática entre el número de los sitios compartidos por la enzima de restricción y los amplificadores del DNA es lo que determina la divergencia genética.

El ARDRA ha sido reportado por muchos autores como una herramienta para estudios de ecología microbiana, para estudios de diversidad de poblaciones del suelo, e incluso

dirigidas a poblaciones de interés, como lo es el caso de los fijadores de nitrógeno (Aquilanti *et al.*, 2004; Ben-Dow *et al.*, 2006; Case *et al.*, 2007). Sin embargo, un punto crítico de este análisis es la correcta identificación de las enzimas para una caracterización adecuada.

2.8 Los fertilizantes en la agricultura mexicana

La agricultura sigue siendo la fuente primaria de alimentos e independientemente de los excedentes de los países desarrollados, la seguridad alimentaria en los países en desarrollo depende esencialmente de ellos mismos. Los economistas señalan que la transferencia neta de alimentos, de una región del planeta a otra, normalmente no rebasa el 10%. No obstante no hay más suelo que incorporar al cultivo; inclusive, en México, se está reduciendo la superficie cultivable por efecto de los fenómenos de erosión y del crecimiento de la mancha urbana. Así que el reto es incrementar la capacidad productiva con un impacto mínimo en el ambiente (Salazar-Sosa *et al.*, 2003).

La “revolución verde” que impulsó un incremento significativo en los rendimientos agrícolas, y que ha permitido también el desarrollo de nuevas variedades de vegetales, desafortunadamente trajo consigo también algunos efectos que han contribuido al deterioro ambiental. El uso masivo de agroquímicos como estrategia para luchar contra plagas y enfermedades, y así aumentar la producción, no siempre ha tenido el efecto deseado (Salazar-Sosa *et al.*, 2003; Fortis-Hernández *et al.*, 2009).

En cuanto a los fertilizantes, se estimó que el suministro mundial de nitrógeno, fosforo y potasio aumentaría en 34 millones de toneladas, con un crecimiento anual del 3 % entre 2007-2008 y 2011-2012, lo que permitiría cubrir la demanda del 1.9 % anual. El total de la producción de fertilizantes pasaría de 206.5 millones de toneladas en 2007-2008 a 241 millones de toneladas en 2011-2012. La demanda de fertilizantes subiría de 197 millones de toneladas a 216 millones (FAO, 2008; Fortis-Hernández *et al.*, 2009).

En México, la SAGARPA (2009) indicó que a partir del 2007 comenzó a aumentar el consumo de fertilizantes, después de registrarse una disminución en su uso entre 2004-2006, con un consumo que supera cinco millones de toneladas en el 2008. Sin embargo, México importa 60% de las 4.7 millones de toneladas de fertilizantes

utilizadas en la mitad de los 20 millones de hectáreas que se cultivan cada año en el país (SAGARPA, 2009).

En relación a los precios de los fertilizantes, el Banco Mundial reportó que el precio internacional de algunos fertilizantes como el fosfato de amonio se multiplicó por seis del 2006 al 2008 (2008).

En los mercados internacionales la urea ha elevado en 1.5 veces su precio final; México importa la urea producida en Rusia (48%), Ucrania (23%), EEUU (23%), Venezuela (5%) y otros (1%) (FAO, 2008).

Mientras que los costos de los fertilizantes en México, la tonelada de fosfato de amonio, se vendió a finales de 2007 en 432.5 dólares, 66 % más que en 2006 (Figura 12). Algo similar ocurrió con la urea, otro compuesto básico para fertilizar suelos agrícolas; la tonelada se vendió en 309.4 dólares en 2007, 86 dólares más que en 2006 (SNIIM, 2008; Fortis-Hernández *et al.*, 2009).

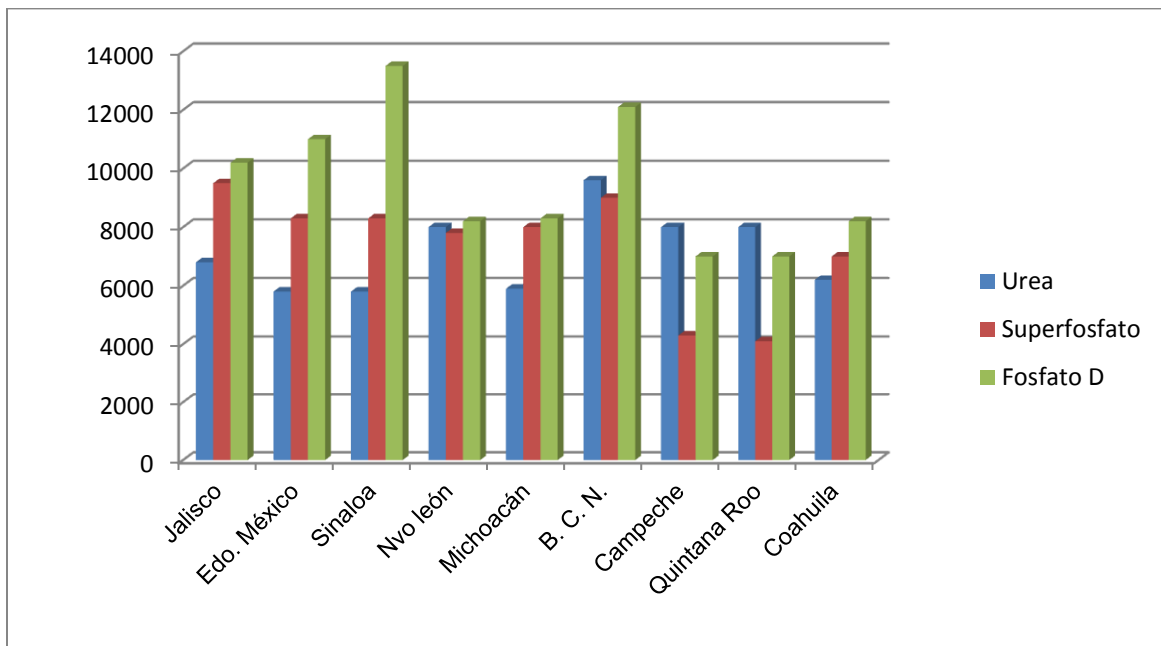


Figura 12. Precios de los fertilizantes en México (Tomado de Fortis-Hernández *et al.*, 2009).

Ante estos precios se requiere de un cambio en los paradigmas de la nutrición de los cultivos, se requiere emplear estrategias de producción enfocadas hacia una agricultura sostenible como el control biológico el uso de microorganismos benéficos provenientes

de los mismos cultivos y suelo, el control de la fertilización del suelo, y suministrar sólo el fertilizante químico necesario (King, 1990).

2.9 Comunidades de estudio en Chihuahua

2.9.1 La comunidad menonita en Chihuahua

La comunidad menonita del estado de Chihuahua, donde residen 40,000 integrantes de este ortodoxo grupo cristiano, es el motor de la agricultura y la ganadería en una desértica región azotada por la violencia del crimen organizado. Con una vida centrada en el campo, los menonitas han convertido los terrenos semidesérticos de Chihuahua en productivos cultivos de alfalfa, cacahuete, algodón, frutales, maíz, frijol, avena y trigo, y transformado esta norteña región en una de las cuencas lecheras más importantes de México.

La comunidad menonita de Chihuahua, no corresponde a refugiados pobres que dependían de la caridad del país anfitrión, sino a un grupo de agricultores seguros de sí mismos, con privilegios garantizados en su nueva patria. México a diferencia de Rusia y Canadá no les proporcionó terrenos laborables gratuitamente (Aboites, 1993).

Desde nuestra perspectiva, el fenómeno menonita no puede ni debe reducirse a una simple disyuntiva entre modernidad y tradición, ya que este tipo de interpretaciones a la luz de los hechos es insuficiente para explicar procesos de interculturalidad entre comunidades diversas, sobre todo cuando una de ellas tiene entre sus normas religiosas el alejamiento del mundo, sin embargo, es difícil explicar como este grupo cruza esa línea, conviven y se mezclan en esquemas socioculturales tradicionales y modernos. La comunidad menonita no puede explicarse sin el referente religioso, pero entendido este como el espacio de comunión social que garantiza la integración de ciertas comunidades.

Valores como trabajo, ganancia, organización etc., son conductas originadas por la propia convicción religiosa. En Chihuahua permite observar diversas características; una comunidad agrícola que ha logrado un importante desarrollo tanto en rendimientos como en tecnología, que ha sabido diversificar los cultivos de acuerdo a las condiciones propias del mercado, que ha sido un factor en el desarrollo económico, pero que además la organización que hoy en día está llevando la comunidad menonita para

formar sociedades de producción agrícola, teniendo acceso a mecanismos modernos de producción como es la agricultura por contrato, donde se reduce la incertidumbre en la comercialización y permite la integración de la cadena productiva (Geertz, 1997).

2.9.1.1 La comunidad menonitas y la agricultura mexicana

Si en lo cotidiano los menonitas siguen manteniendo el aislamiento a través de sus formas de organización y tradiciones, en lo público, esto es, en los espacios donde necesariamente tienen que confluir con otros grupos como son la producción y el mercado, los menonitas se reconocen como excelentes agricultores. El conocimiento que han acumulado por siglos sobre la agricultura, así como el trabajo dedicado han permitido la producción en zonas rústicas, a través de riego y la fertilización química que han hecho en los campos mexicanos productivos (Martínez y Reynoso, 1993).

La llegada a nuestro país implicó la modificación del esquema productivo tanto en técnica como en tipo de productos a los que estaban acostumbrados en Canadá, además de la necesidad de conocer el tipo de suelo al que se estaban enfrentando, a fin de poder ofrecer las mejores alternativas de cultivo.

Cuando compraron los terrenos en los diversos estados del norte del país, los menonitas los estudiaron determinando el tipo de suelo de cada colonia. Así, destinaron las de mayor humedad al cultivo de alfalfa, maíz, frijol, avena, cebada, trigo, algodón, y arboles frutales, en particular manzano, durazno, nogal. Los terrenos con suelos caracterizados por alta salinidad se reservaron a la cría del ganado vacuno, porcino y caballar (Martínez y Reynoso, 1993; Aboites, 1993).

En los primeros años el patrón de cultivo seguía siendo similar al que se tenía en Canadá, una producción basada en trigo, avena y forraje. Para los años posteriores este patrón se modificó, de tal modo que en los campos abundaron el cultivo de maíz, avena y sorgo, productos de singular importancia ya que representaban el alimento base para el ganado y con ello para la producción de leche.

Durante un tiempo, los menonitas no consideraron al frijol como un cultivo de importancia. No fue sino hasta el año de 1926, que se dieron cuenta de que esta leguminosa contaba con un mercado seguro en nuestro país, por lo que comenzaron a desarrollar su cultivo (Aboites, 1993).

En cuanto a utilización de maquinaria agrícola, la mecanización de las actividades del campo fue un elemento fundamental en el desarrollo agrícola de las colonias menonitas. A partir del año de 1930, se inicia en la región la sustitución de caballos por tractores, de tal modo que para la década de 1950 la agricultura estaba mecanizada prácticamente en su totalidad. Por varias décadas la comunidad utilizó sus tractores sin ruedas de hule, ya que de acuerdo a su religión sólo se permitían de fierro. Después de muchas discusiones con los representantes de colonias durante la década de los años de 1950 y 1960 se optó por el uso de ruedas de hule, aun sin la aprobación formal de los líderes religiosos (Martínez y Reynoso, 1993).

Pero la comunidad menonita, no sólo se ha conformado con la adquisición de maquinaria, en la actualidad, la región cuenta con un importante número de empresas pequeñas y medianas que están dedicadas a la fabricación de maquinaria agrícola, encontrando desde cultivadoras de frijol, maíz, molinos de pastura, remolques, tubos de arena utilizados en los pozos de agua, calentadores, hasta los propios ventiladores que se utilizan en las huertas de manzano (Aboites, 1993). Pese a no contar con una educación formal en el área de ciencia y tecnología, el conocimiento es transmitido de generación en generación y adquirido en la práctica, mientras que aquellos que se dedican a esta actividad lo hacen por tradición, esto es que sus padres y abuelos tenían la misma tarea.

Si en un principio la fabricación de maquinaria agrícola tenía un carácter artesanal, hoy en día estos talleres cuentan con maquinaria de alta tecnología, lo que les ha permitido ahorrar en costo, trabajo y tiempo, aspectos fundamentales para este tipo de empresas. La comunidad menonita dedicada a esta actividad viaja constantemente a las ferias y exposiciones agrícolas, a fin de estar actualizados en las novedades tecnológicas (Figura 13) (Geertz, 1997).

Son más tecnificados en cuanto a actividades agrícolas, ya que utilizan equipo especializado para la aplicación de agroquímicos (monitoreo por satélite, GPSs).

Son gente cuya religión no permite el uso de armas, son respetuosos, no dañan a los demás. Su visión del mundo incluye el cuidado del ambiente.



Figura 13. Menonitas de Chihuahua. Imagen tomada de la revista Claridades agropecuarias (2004).

En esta comunidad la mayoría no hace una carrera profesional, los miembros de esta comunidad se dedican al campo, a la industria, colaboran en diversos talleres, y crían ganado dentro de su misma comunidad.

En sus casas no hay TV, las casas siempre están muy limpias, sólo cuentan con cosas muy básicas, no hay radios, ni salas, sólo cuentan con lo más dispensable.

Esta comunidad en Chihuahua la encontramos en el municipio de Ojinaga.

En la colonia del Valle esta comunidad cuenta con casas mas lujosas, antenas de TV, internet, tienen mas comodidades y lujos. Dentro de esta comunidad tienen sus propias escuelas e imprentas, por lo que elaboran y controlan sus propios libros para enseñanza, además existen filósofos entre ellos. Cuentan con órganos internos de periódico. La mujer es más pasiva y más conservadora en relación a la imagen del modelo actual y generalizado en nuestro país.

Esta comunidad debe de capacitar más a su gente. Son más limitados, existen suicidios, y todo es cuestión de trabajo. Llegan a existir personas viciosas, pobres dentro de la comunidad, sin embargo, ellos mismos tratan de corregir a los demás y mantener el control de la comunidad.

En las tierras de esta comunidad tienen más problemas de fertilidad en el suelo agrícola, por lo que utilizan el doble de fertilizante y agroquímicos, encontrando suelos con alta salinidad, además de que el agua que utilizan para el riego es de mala calidad

por el exceso de sales que contiene. En Chihuahua los menonitas poseen una superficie de alrededor de 300,000 ha.

2.9.2 La comunidad mormona en Chihuahua

La colonización mormona del noroeste de Chihuahua y noreste de Sonora se presentó durante el Porfiriato, en ambas laderas de la Sierra Madre Occidental, y se materializó en una estrecha red de colonias bien planeadas (Lloyd, 2001).

La mayor parte de los residentes de este lugar sabe que “la Colonia” tiene un pasado en el que vivieron personas de costumbres muy distintas, del cual son mudos testigos los materiales y diseños de algunas construcciones que perduran desde hace un siglo, lo mismo que la campana de la escuela primaria. Esta comunidad fue fundada en 1900 por miembros de la Iglesia de Jesucristo de los Santos de los Últimos Días, cuando en ese lugar sólo había matorrales y fauna del desierto. Fueron ellos quienes cortaron las primeras ramas y removieron las primeras piedras para dar paso a unas rústicas viviendas de adobes y troncos que los cobijarían, mientras construían otras más duraderas con ladrillos, piedras y madera de pino. Procedentes de Estados Unidos, huyendo de las leyes contra la poligamia promulgadas en aquel país en 1882, después de participar en la fundación de otras colonias en el estado de Chihuahua. La coyuntura legal que les favoreció en aquel momento fue la política migratoria del gobierno de Porfirio Díaz, que daba la bienvenida y amplias facilidades a los extranjeros productivos que quisieran venir a México a invertir sus capitales (Lloyd, 2001).

La historia de los primeros años de las colonias mormonas que se fundaron en el noroeste de Chihuahua y el noreste de Sonora, compartían un proyecto común y fueron planeadas para ser interdependientes. Sus habitantes compartían las mismas creencias religiosas, los mismos problemas legales, y dependían de las mismas autoridades. El medio ambiente físico donde se fundó cada colonia tenía características muy similares, propias de suelo semiárido: terreno pedregoso, matorrales, cactáceas y fauna del desierto; clima de extrema sequía en primavera, y temperaturas cercanas a los cuarenta grados centígrados en verano y bajo cero en invierno (Barney *et al.*, 1973).

En el aspecto económico trataron de ser autosuficientes, a fin de evitar al máximo la dependencia de la vecindad mexicana. Cuentan con grandes hatos ganaderos,

cuantiosas cosechas, surtidos establecimientos comerciales, y otras pequeñas pero muy lucrativas empresas, como fabricación de ladrillo, molino harinero, servicio de transporte de carga con fuerza animal, productivos huertos familiares, conservas de frutas y verduras, y suministro de víveres a los centros mineros. Muchos de los servicios también se autosatisfacían, tanto con residentes de Morelos como de las colonias mormonas de Chihuahua, como los de educación y salud. Había carpinteros, herreros, zapateros y vaqueros que proporcionaban valiosos servicios a la comunidad. Los alumnos, una vez agotada la capacidad de la escuela local, pasaban a la Academia Juárez para proseguir su educación, ubicada en Colonia Juárez, sede del gobierno político, religioso y administrativo de la Estaca Juárez y todas sus instituciones (Informe de la Escuela Particular Mixta de Colonia Morelos al Gobierno del Estado, 2004).

2.9.2.1 La comunidad mormona y la agricultura mexicana

En tecnología agrícola están altamente tecnificados. En Chihuahua en el municipio de LeBarón la mayoría son polígamos, las mujeres aún quieren casarse con un polígamo, quienes llegan a tener de 3 a 5 mujeres.

Los integrantes de esta comunidad se capacitan, tienen una visión empresarial muy fuerte. La mujer tiene más participación, es más libre, es muy importante el papel de la mujer, tiene más libertad. El hombre trabaja más de 100 horas a la semana y mantiene muy bien a sus respectivas mujeres. Se preocupan por cuidar más el medio ambiente. Esta comunidad llega a utilizar mano de obra mexicana en la producción de cultivos y también utilizan maquinaria para su producción. Los mormones son más abiertos a casarse con mexicanos (as).

En Chihuahua los mormones tienen una superficie aproximada de 100,000 ha.

Sus suelos son mejores y de buena calidad, ya que siempre buscan alternativas para su mejoramiento.

CAPÍTULO III

3.1 Planteamiento del problema

Este estudio se inició con la participación y apoyo de la empresa Bioformuladora Agrícola Sayta y Asociados, del Estado de Chihuahua, quienes tienen contacto con productores y empresarios de las localidades de Delicias, Casas Grandes y Ojinaga (en las dos últimas comunidades menonitas y mormonas) que buscan atender demandas del sector agroindustrial y la producción de cultivos, manifestando especial interés por la utilización de alternativas naturales que beneficien sus cultivos, y ayuden a combatir el uso indiscriminado de agroquímicos y sus efectos devastadores sobre el ecosistema. Una de las grandes preocupaciones de estos productores está relacionada con la nutrición de sus cultivos, considerando que la fertilización es de gran relevancia puesto que es una de las prácticas más costosas en el mantenimiento y mejoramiento. Ante el incremento del precio de los agroquímicos y el efecto que se atribuye a su utilización excesiva sobre la contaminación del ambiente, su preocupación es de hacer un uso cada vez más racional de todos estos productos. Por lo anterior, se consideró que el estudio y la obtención de microorganismos presentes en estas regiones de condiciones extremas darían la oportunidad de obtener bacterias con mayor potencial biofertilizante, mismas que puedan ser aplicadas en una estrategia de desarrollo sostenible diseñado específicamente para atender las necesidades de estas localidades.

Con el propósito de profundizar en nuestro conocimiento sobre esta interacción planta-bacteria y de obtener un biofertilizante, se ha hecho indispensable la búsqueda y análisis de bacterias simbióticas con una elevada capacidad de colonización y de fijación de nitrógeno, que colonicen plantas, tanto endémicas como introducidas en esta región. El uso de bacterias como biofertilizantes, así como la modificación de las prácticas agrícolas son requisitos de una alternativa viable e integral para fortalecer un desarrollo agrícola sostenible.

En un inicio se cuestionó la factibilidad de obtener cepas fijadoras de nitrógeno en los suelos estudiados, considerando los antecedentes planteados acerca de la gran cantidad de agroquímicos utilizados en los cultivos, también se consideró necesario asegurar la estabilidad de los aislados, y su propagación y mantenimiento en condiciones de laboratorio. Ante todo se estableció la necesidad de conseguir bacterias

presentes en las localidades de estudio, ya adaptadas al medio, respondiendo al uso de agroquímicos, y a las condiciones edáficas y ambientales prevalecientes en los sitios de interés.

La generación de una estrategia de desarrollo sustentable particular para el estado de Chihuahua (y para cada sitio en que se desarrolle actividad agrícola) es importante ya que se requiere el diseño de inoculantes multicepa que permitan cubrir diferentes carencias nutricionales del suelo y la adaptación y supervivencia de las cepas bacterianas bajo diferentes esquemas de prácticas agrícolas, incluyendo suelos en los que se aplique fertilizante químico, vigilando que siempre se haga en forma dosificada y sólo para permitir el arranque del cultivo.

La meta última e indispensable es la generación de tecnologías que permitan incrementar los rendimientos en la producción de cultivos agrícolas, preservando al mismo tiempo los recursos naturales y el medio ambiente en su totalidad.

Simultáneamente, y como parte de una vigilancia integral, es importante dar continuidad a los programas de fomento agropecuario de los Gobiernos de los Estados, desarrollando investigación sobre las interacciones de microorganismos con los cultivos más importantes de México que sea útil para impulsar el desarrollo de biotecnologías específicas y realmente útiles para el esquema de nuestro país. Así como la generación y transferencia de nuevas biotecnologías como apoyo de Instituciones educativas, gubernamentales e incluso de particulares que realmente atiendan las demandas de los productores y brinden servicio real tangible.

3.2 Hipótesis

Las hipótesis de investigación son:

- En suelos agrícolas del estado de Chihuahua se encuentran cepas de rhizobia con capacidad de fijar nitrógeno y con potencial como biofertilizante para los cultivos de estos suelos por estar adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de los sitios en cuestión.
- Los biofertilizantes producidos de cepas aisladas de suelos agrícolas del estado de Chihuahua tienen mayor efectividad por su adaptación natural a las condiciones edafoclimáticas de estos suelos.
- Seleccionar adecuadamente microorganismos aplicables como biofertilizantes favorece el éxito de una estrategia de desarrollo agrícola diseñada para su utilización en esta región.

3.3 Objetivo general

- Generar una estrategia de desarrollo agrícola, para el estado de Chihuahua, basada en la aplicación de bacterias con potencial biofertilizante para propiciar la agricultura sostenible

3.4 Objetivos particulares

- Aislar e identificar cepas del grupo rhizobia, con potencial biofertilizante, a partir de suelo y nódulos de cultivos agrícolas de Chihuahua.
- Evaluar y caracterizar fisiológica y genéticamente los aislados del grupo rhizobia.
- Estimar la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas aisladas, mediante la técnica de ARA.
- Evaluar el potencial simbiótico de estas cepas en invernadero.
- Desarrollar un análisis FODA para definir las características de la estrategia de desarrollo agrícola para la producción de cultivos en las localidades de estudio.

CAPÍTULO IV

POBLACIONES BACTERIANAS

4.1 RESUMEN

La producción agrícola moderna requiere gran cantidad de agroquímicos derivados del petróleo, por lo que su producción y uso contaminan el ambiente, además de generar daños en la salud de los seres vivos. Como una alternativa para mantener un nivel rentable de producción, con un menor uso de agroquímicos, y enfocando la agricultura hacia un manejo sustentable, es el estudio y la aplicación de microorganismos fijadores de nitrógeno. De esta forma, se busca implementar alternativas que permitan reducir los costos (económicos y ambientales) sin afectar la productividad de los cultivos. Como parte del objetivo de este trabajo, se planteó la búsqueda de cepas nativas de rhizobia potencialmente útiles como biofertilizante, aplicable a cultivos agrícolas en localidades del estado de Chihuahua. A partir de 11 muestras compuestas de suelos con actividad agrícola se evaluó la densidad de poblaciones bacterianas en niveles de 1×10^2 a 6.6×10^3 UFC g^{-1} , valores muy bajos para suelos con actividad agrícola, sugiriendo el efecto negativo de la aplicación de fertilizante químico a nivel de las poblaciones microbianas del suelo. Por lo que los objetivos planteados en este capítulo fueron estimar la población bacteriana total, y aquella con características del grupo rhizobia, en las muestras obtenidas de tres localidades de Chihuahua, de las cuales se logró aislar e identificar un total de 31 cepas del grupo rhizobia con potencial biofertilizante. El uso de microorganismos en la agricultura se considera como una biotecnología que contribuye al desarrollo sostenible, ésta provee beneficios a los cultivos agrícolas y al productor, además de ser ambientalmente segura y, socioeconómica y culturalmente aceptable.

4.2 INTRODUCCIÓN

Actualmente es de gran interés restaurar la microbiota de los suelos mediante estrategias que permitan mejorarlo en relación a la productividad agrícola. Sin embargo, la forma más común de incorporar nutrientes al suelo ha sido, en forma de fertilizantes químicos. El uso indiscriminado de estos insumos ha alterado significativamente los constituyentes vivos del suelo y con ello su equilibrio ecológico, modificando principalmente las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas. Se plantea que el uso constante de agroquímicos para la agricultura donde efectuamos el estudio (Chihuahua) ha afectado el equilibrio de las poblaciones microbianas del suelo, lo que motiva la búsqueda de respuestas y la mejor comprensión de las actividades cooperativas que se establecen en el suelo entre la microbiota y las plantas, sin olvidar que la microfauna también afecta la calidad y propiedades del suelo, así como las interacciones que se presentan en éste (Barea *et al.*, 2005; Reyes *et al.*, 2006; Caesar-TonThat *et al.*, 2007).

En la interacción rhizobia-leguminosa, la bacteria induce la formación de un nódulo, donde encuentra las condiciones fisiológicas adecuadas para poder fijar nitrógeno (Zahran, 2001), esta interacción es benéfica por que son una alternativa a los fertilizantes químicos, estas poblaciones bacterianas son capaces de ejercer efectos específicos sobre el crecimiento vegetal y la fijación simbiótica de nitrógeno.

Cultivos como alfalfa, cacahuate, algodón, nogal, papa, chile, durazno y manzano son recursos de gran importancia económica en las localidades de Ojinaga, Casas Grandes y Delicias, Chihuahua, debido al manejo inapropiado de estos suelos y con la continua degradación de los mismos por los efectos climáticos y edáficos, así como la baja disponibilidad de N y de P, principalmente y los problemas de contaminación del suelo, agua y alimentos por el uso excesivo de agroquímicos existe la gestión agrícola en términos de sostenibilidad, por lo tanto la evaluación de las poblaciones bacterianas pertenecientes al grupo de rhizobia, representa una opción para el manejo sostenible de estos agroecosistemas, de allí la necesidad de realizar el aislamiento en los suelos y cultivos de interés en Chihuahua, y seleccionarlos como biofertilizantes en relación a su efecto en la producción vegetal.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 Muestreo de suelo y nódulos

El estado de Chihuahua se localiza en el norte de México entre 25° 5' y 31° 47' N, y 103° 11' y 109° 07' O. Las condiciones climáticas predominantes son de tipo seco, clima seco árido en 28% de la superficie estatal, con una precipitación promedio anual menor a 300 mm y temperatura máxima de 40°C; 46% del territorio estatal es semiárido con una precipitación promedio anual de 300 a 500 mm (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).

En la región oeste del Estado hay una fracción de la Sierra Madre Occidental (23% de la superficie estatal) donde predomina el clima templado, con régimen de lluvias durante el verano y precipitación promedio anual de 850 mm. El clima es cálido en la zona de las barrancas, con 600 mm de precipitación y una temperatura promedio que supera 18°C durante el mes más frío (Figura 14) (CONAFOR, 2004; Núñez-López *et al.*, 2007).

Los muestreos se efectuaron con los productores contactados por la empresa Bioformulados Agrícolas Sayta y Asociados del Estado de Chihuahua, que expresaron su interés por el estudio de las poblaciones bacterianas como parte de alternativa para mejorar las condiciones de sus cultivos ante los problemas que presentan. Se contempló el muestreo en diferentes condiciones climatológicas que se presentan en el estado, así como de los cultivos económicamente más importantes en el estado.

Los sitios de muestreo se encuentran ubicados en las coordenadas estipuladas en el Cuadro 3. Los puntos de muestreo se seleccionaron al azar, tomando muestras de suelo a una profundidad de 15 centímetros en suelos con historial de cultivo de alfalfa, cacahuate, nogal, papa, chile, durazno o manzano. Las muestras de suelo fueron puestas a secar para su posterior conservación en refrigeración hasta su uso.

Cuadro 3. Ubicación de las localidades muestreadas en el estado de Chihuahua, México.

Localidad	Latitud Norte		Longitud Oeste		Altitud	Temperatura °C
	Grados	Minutos	Grados	Minutos	Metros	
Casas Grandes	30	23	107	57	1 480	41.5 y -17.5
Delicias	28	11	105	28	1 170	38 y -8
Ojinaga	29	34	104	24	800	44.9 y -14

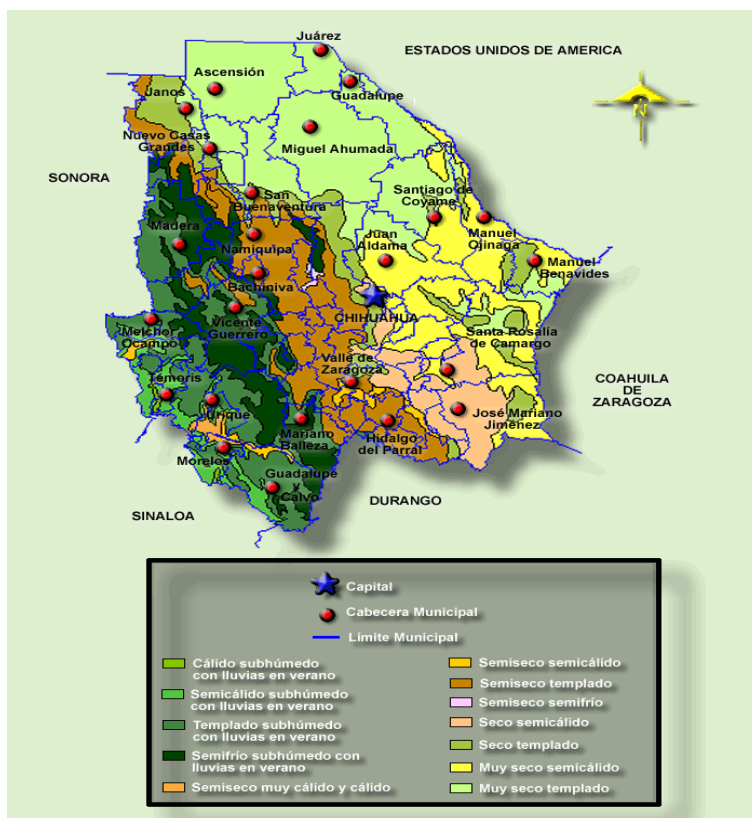


Figura 14. Climas del Estado de Chihuahua. © 2009 INEGI

De los puntos muestreados se integraron 11 muestras compuestas de suelo, con historial de 8 diferentes cultivos y características físicas y químicas particulares (Cuadro 4 y 5).

Cuadro 4. Cultivos referidos por los productores de los sitios de muestreo en tres localidades del estado de Chihuahua

Municipio	Cultivo
Ojinaga	Alfalfa
	Algodón
	Cacahuate
Delicias	Cacahuate
	Alfalfa
	Papa
Casas Grandes	Chile
	Durazno
	Manzano
	Nogal
	Chile

Cuadro 5. Características físicas y químicas de los suelos muestreados

LOCALIDAD	CULTIVO	pH	TEXTURA	MO (%)	P (ppm)	NO ₃ ⁻ (ppm)	NH ₄ ⁺ (ppm)
Ojinaga	CACAHUATE	7.63	Franco arcillo-arenoso	0.59	21.52	62.47	10.30
Delicias	ALFALFA	7.6	Franco arcilloso	0.89	25.82	30.91	18.03
Delicias	CACAHUATE	7.7	Franco arcilloso	0.59	13.99	7.73	6.44
Delicias	CHILE	7.55	Franco arcillo-arenoso	0.59	27.98	73.42	11.59
Casas Grandes	MANZANO	4.9	Arcilloso	3.35	45.86	199.64	41.21
Casas Grandes	DURAZNO	6.7	Franco arcillo-arenoso	0.59	29.08	45.08	36.06

4.3.2 Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo

El número de unidades formadoras de colonias (UFC), se estimó en cada una de las muestras compuestas de suelo mediante la técnica de dilución decimal seriada y siembra por el método de difusión en cajas Petri (por triplicado). Los medios de cultivo utilizados fueron agar nutritivo y TY (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004; Zuberer, 1994), las cajas se incubaron a 28 °C, durante 5 días. Posteriormente, se efectuó el conteo de las colonias presentes en cada dilución.

A partir de las placas en que se estimó el número de poblaciones totales, las colonias se seleccionaron y aislaron con base en el criterio de morfología colonial característica de los rhizobia, particularmente aquellas de consistencia mucoide, aspecto húmedo, luz reflejada brillante, bordes enteros y colonias circulares.

4.3.3 Aislamiento de cepas de rhizobia a partir de nódulo radicular

El aislamiento a partir de los nódulos se efectuó rehidratando los nódulos seleccionados con 1 ml de agua destilada estéril durante 30 min. Enseguida se desinfectaron superficialmente con peróxido de hidrógeno al 70% durante cinco min, después se practicaron varios lavados con agua destilada estéril.

Los nódulos se maceraron con ayuda de una varilla de vidrio y la suspensión obtenida fue utilizada para inocular Cajas de Petri con medio TY. Las cajas se incubaron a 28°C, por un periodo de 1 a 5 días. Se recuperaron las colonias con morfología colonial que tuvieran características específicas de bacterias del grupo rhizobia y se purificaron por resiembras consecutivas mediante cultivos sucesivos por estría cruzada en medio TY, verificando la pureza del cultivo mediante tinción de Gram, y mediante pases sucesivos se logró la obtención de cultivos puros para su conservación a -20°C.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Estimación de la población bacteriana en muestras de suelo

El número de UFC bacterianas se cuantificó por triplicado en cada una de las muestras compuestas de suelo (Cuadro 4), se contaron las colonias bacterianas en general y las colonias con características morfológicas de rhizobia presentes en cada dilución.

Se observó diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en el número de UFC de las tres localidades. La mayor población bacteriana se estimó en suelos con cultivo de alfalfa de Ojinaga (4.0×10^5 UFC/gr) y en suelo con nogal de la localidad de Casas Grandes (3.8×10^5 UFC/gr); mientras que la menor población en suelo se detectó en suelo con cultivo de papa, en la localidad de Delicias (4×10^3 UFC/gr) (Cuadro 6), aunque las características del tipo de suelo en la localidad de Ojinaga son similares (Cuadro 5) en los diferentes cultivos, en el caso del suelo con cultivo de alfalfa; como leguminosa esta familia representa un muy importante recurso económico, comestible, maderable, combustible, agrícola (Doyle y Luckow, 2003), también representan un excelente recurso natural para conservar e incluso mejorar la fertilidad del suelo; sin embargo, se refleja una notable diferencia en cada localidad de estudio en cuanto a la población bacteriana total, está siendo influenciada por la aplicación intensiva de agroquímicos y el tipo de laboreo y labranza aplicados en cada comunidad, es importante mencionar que en la localidad de Ojinaga son comunidades menonitas, y es aquí donde el uso de agroquímicos y el tipo de labranza es más intensivo, de alguna manera las poblaciones bacterianas están perturbadas y a pesar de estas condiciones prevalecen, en el caso de la población bacteriana estimada en el suelo con cultivo de papa, la baja población bacteriana estimada se explica por la aplicación de agroquímicos para en su producción, según fue referido por el productor.

La inclinación de los productores a aplicar grandes cantidades de fertilizantes químicos, para asegurar altos rendimientos en la producción agrícola, es una iniciativa que puede ser sana desde el punto de vista económico pero no deseable desde el punto de vista ambiental, debido a que cantidades de fertilizantes permanecen en el suelo después de la cosecha, pudiendo afectar la calidad del agua mediante la percolación y escorrentía de nitratos y fosfatos y la calidad del aire por emisión de óxido nitroso, además de la degradación de los suelos por las prácticas de labranza intensiva que se aplican

provocando erosión además de la pérdida de nutrientes, materia orgánica y sobre todo reducción de las poblaciones bacterianas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010)

Cuadro 6. Estimación de la población bacteriana presente en muestras de suelo del estado de Chihuahua.

Localidad	Cultivo	Población bacteriana (UFC)	Población rhizobia (UFC)
Ojinaga	Alfalfa	4.0 x 10 ⁵ a	6 x 10 ³ a
	Algodón	1.1 x 10 ⁵ bc	5.3 x 10 ³ a
	Cacahuate	2.4 x 10 ⁵ ab	6.3 x 10 ³ a
Delicias	Cacahuate	2.9 x 10 ⁴ c	6.6 x 10 ³ a
	Alfalfa	1.4 x 10 ⁵ bc	5.6 x 10 ³ a
	Papa	4 x 10 ³ c	0.1 x 10 ³ c
	Chile	2.2 x 10 ⁴ c	0.9 x 10 ³ bc
Casas Grandes	Durazno	3.4 x 10 ⁴ c	0.7 x 10 ³ bc
	Manzano	2.7 x 10 ⁴ c	0.3 x 10 ³ bc
	Nogal	3.8 x 10 ⁵ a	6.3 x 10 ³ a
	Chile	2.6 x 10 ⁵ ab	1.6 x 10 ³ b

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencia estadísticas (Tukey, P ≤ 0.05).

En cuanto a la población del grupo rhizobia, el número de UFC fue mayor en el suelo con el cultivo de cacahuate de la localidad de Delicias (6.6 x10³) y menor en el suelo con el cultivo de papa de esta misma localidad (0.1x 10³) (Cuadro 6). Resultado lógico si consideramos que la papa ocupa el segundo lugar en el volumen de la producción hortícola, después del jitomate, y aunque el cultivo de papa representa menos de 0.5% de la superficie agrícola del país, consume casi 20% del total de fungicidas agrícolas empleados, por lo que ocupa el primer lugar en el uso de insumos y agroquímicos que ocasionan problemas ambientales (Romero-Lima *et al.*, 2000) y por ello se explica la reducción de la población bacteriana total y del grupo rhizobia.

La diferencia en la población estimada de rhizobia podría deberse a que donde se presentó mayor población es donde se cultivan leguminosas, es de notar que a diferencia de la localidad de Ojinaga; donde se estimó mayor población bacteriana, en el resto de las localidades la población de rhizobia varió.

Al efectuar el aislamiento de las colonias con características morfológicas relacionadas con el grupo rhizobia, algunas presentaron una muy baja tasa de supervivencia *in vitro*, obteniéndose una colección de 24 aislados bacterianos provenientes de suelo con cultivos de alfalfa, cacahuate, algodón, papa, chile, durazno y manzano; y siete aislados obtenidos directamente de nódulos radiculares de alfalfa.

A pesar del uso de diferentes técnicas de cultivo el número en la población de rhizobia estimada fue menor, esto puede ser el reflejo de la disminución de las poblaciones de rhizobia como consecuencia de las prácticas de cultivo que se acostumbran en esa región del país. Las bacterias fijadoras de nitrógeno tienen ventaja sobre otras bacterias en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente; sin embargo, también se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados y las prácticas de cultivo tienen efectos negativos sobre estas poblaciones (Reis *et al.*, 2004).

La evaluación de la degradación del suelo radica en que algunos aspectos de ésta, son reversibles a largo plazo, como la declinación de materia orgánica, la erosión, así como la reducción y efectividad de la población del grupo rhizobia. Por lo que es de importancia que en los sectores agropecuarios y hasta el ambiental demanden un balance en la fertilidad, la conservación de la calidad ambiental y la protección de la salud humana, debido a la falta de diagnóstico en los suelos de cultivo en estudio, conlleva a errores en la selección y uso indebido de agroquímicos, lo que se traduce en problemas de contaminación química de suelos, de los mantos acuíferos, así como de las poblaciones bacterianas benéficas.

Es importante promover como una posibilidad de rehabilitación de los suelos, el uso de plantas leguminosas en las localidades de estudio, debido a los problemas que se presentan en cuanto al deterioro del suelo y al daño que han sufrido las poblaciones bacterianas benéficas como son las del grupo de rhizobia, ya que la utilidad de las leguminosas comprende también la actividad de fitorremediación en suelos degradados en todo el mundo, estos suelos se vuelven económicamente inservibles y no viables, se ha reportado que algunas leguminosas tienen la capacidad de controlar la erosión, en el área de suelos degradados por minería y actividades industriales, se ha reportado el uso de especies leguminosas como: *Acacia spirorbis*, *Acacia mangium*, *Cajanus cajan*,

Leucaena leucocephala, *Caesalpinia peltophoroides*, *Albizia lebbeck*, *Mimosa himalayana*, etc. (Griffith *et al.*, 2001).

4.4.2 Aislamiento y purificación de cepas de rhizobia

Las colonias, se seleccionaron en cuanto a su color debido a que algunas bacterias del grupo rhizobia tienden a absorber el colorante Rojo Congo adicionado al medio de cultivo, encontrándose colonias rojas, rosas y blanquecinas, las cuales fueron de aspecto húmedo, superficie convexa, de forma circular, con bordes regulares y enteros, reflejan la luz brillante y son opacas a la luz transmitida, con una consistencia mucoide (Figura 15). La mayoría de las cepas presentaron un crecimiento rápido, 24-48 horas en agar levadura manitol (Figura 16) y la morfología microscópica corresponde a bacilos Gram negativos.



Figura 15. Aislados con morfología típica de rhizobia, provenientes de suelo de alfalfa en medio TY

Los 31 aislados se identificaron en base a sus características morfológicas, colonias rojas, rosas e incluso blanquecinas (en medio con Rojo Congo), ya que algunas cepas bacterianas, entre las α -rhizobia, cuando son incubadas en la oscuridad se muestran pequeñas o no absorben del colorante Rojo Congo, formando colonias que son blancas y en ocasiones rosas, mientras que otras cepas absorben fuertemente el color rojo, y sus colonias son rojo oscuro, entre las excepciones hay algunas cepas de *Sinorhizobium meliloti* que pueden absorber el colorante fuertemente y α -rhizobia

absorben el color si la caja Petra es expuesta a la luz por una o más horas (Antón y Prevista, 2005).



Figura 16. Aislados provenientes de suelo de manzano en medio YMA agar levadura manitol.

Se verificó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram, y mediante pases sucesivos se logró la obtención de cultivos puros para su conservación a -20°C .

El número de ejemplares obtenidos en primer aislamiento fue mayor, aunque al efectuar la resiembra para purificación varias colonias fueron inestables y no se logró su adecuado aislamiento para continuar el estudio. Esto puede ser reflejo de la adaptación de las poblaciones de rizobia a condiciones muy particulares de su ambiente, incluidas las prácticas de cultivo que se acostumbran en estas regiones de Chihuahua. Estudios reportados por Doran (1980), muestran que la diferencia en la población microbiana del suelo está relacionada con los cambios en el contenido del agua, niveles de carbono orgánico, nitrógeno y pH del suelo, esenciales para la población microbiana, sin embargo, es difícil determinar que cantidad de microorganismos están presentes en un suelo en un momento determinado, y cuál es la población microbiológica necesaria para que un suelo agrícola funcione de manera óptima (Tate III, 1995).

En este estudio la estimación de las poblaciones bacterianas reflejan el efecto de la presencia de los agroquímicos utilizados en los cultivos de cada una de las localidades estudiadas, ya que los números totales se ven disminuidos y también se detecta que su sobrevivencia está siendo afectada. Reis *et al.* (2004), destacaron como condicionante de la mayor o menor abundancia de microorganismos benéficos en el suelo, el manejo del cultivo y la época del muestreo combinado con el tipo de planta hospedera, debido a la composición de los exudados radiculares y la relación C/N de la rizósfera. Otro factor en la detección de microorganismos es el medio de cultivo utilizado para evaluar estas poblaciones, ya que cualquier modificación de la humedad, materia orgánica o el pH del suelo, puede influir.

En el caso del grupo rhizobia, como bacterias fijadoras de nitrógeno tienen ventaja sobre otras bacterias en condiciones donde el nitrógeno disponible es limitante o completamente deficiente; sin embargo, también se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados añadidos a los cultivos tienen efectos negativos sobre estas poblaciones. Además, la distribución de microorganismos fijadores de nitrógeno no está completamente dictada por la disponibilidad de nitrógeno en el ambiente, sino que es aleatoria, y puede predecirse con base en las características del hábitat (Zehr *et al.*, 2003).

4.5 CONCLUSIONES

El análisis de las poblaciones bacterianas de muestras de suelo en tres localidades del estado de Chihuahua, mostró el efecto de la aplicación de fertilizante y otros agroquímicos en las poblaciones microbianas. Se observó una mayor población bacteriana en suelos con cultivo de alfalfa de Ojinaga y de nogal de la localidad de Casas Grandes, mientras que la menor población en suelo se detectó en suelo con cultivo de papa, en Delicias, suelo sometido a una aplicación intensiva de agroquímicos y con historial de monocultivo de al menos veinte años.

En la localidad de Ojinaga se ubican comunidades menonitas, donde el uso de agroquímicos y el tipo de labranza es más intensivo, se determinó que las poblaciones bacterianas han sido afectadas y a pesar de estas condiciones algunas prevalecen.

En cuanto a la población de rizobia, el número de UFC fue mayor en el suelo con el cultivo de cacahuate de Delicias (6.6×10^3) y menor en el suelo con el cultivo de papa de esta misma localidad (0.1×10^3), debido a que el manejo tradicional de papa implica una elevada adición de fungicidas y otros insumos agrícolas, lo que trae consigo la reducción de la población bacteriana total y rizobia.

Acorde a lo esperado, la mayor población de rizobia estimada en los sitios de muestreo se presentó en donde aún se cultivan leguminosas, es de notar que a diferencia de la localidad de Ojinaga; donde se estimó mayor población bacteriana, las poblaciones de rizobia en cada sitio muestreado no presentaron diferencia estadísticamente significativa, mientras que en el resto de las localidades la población de rizobia presentó diferencia estadísticamente significativa entre sitios de una misma localidad, independientemente de la presencia o ausencia de leguminosas en cultivo.

La baja estabilidad de algunos de los aislados para su mantenimiento en cultivo puro limitó la evaluación de la diversidad bacteriana disponible en los suelos de cultivo y restringe, la posibilidad de generar un inoculante que garantice el mayor potencial biofertilizante. Sin embargo, con el fin de enfocar la agricultura hacia un manejo sustentable, la aplicación de microorganismos como las bacterias del grupo rizobia es una opción para sustituir de manera parcial la fertilización nitrogenada, especialmente en regiones como el estado de Chihuahua, cuyas condiciones climáticas, y prácticas agrícolas, aplazan el desarrollo de una agricultura sustentable.

CAPÍTULO V

IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE RHIZOBIA

5.1 RESUMEN

El análisis e identificación de microorganismos ha experimentado un notable avance en los últimos años, ligado al desarrollo de las técnicas de biología molecular. La reproducibilidad de estas técnicas, y el uso de las técnicas tradicionales de microbiología clásica, basadas en el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo e identificación mediante pruebas bioquímicas, ha permitido complementar el estudio de microorganismos como es el caso de los aislados obtenidos en suelos procedentes de tres localidades de Chihuahua.

La identificación basada en la secuencia del gen 16S rDNA en los laboratorios microbiológicos se ha expandido hacia el estudio de organismos cuya identificación por métodos fenotípicos resulta imposible o muy difícil, como es el caso de bacterias no cultivables, hecho que en ocasiones ha conducido a la descripción de nuevos microorganismos. En nuestra investigación se estudiaron 31 aislados, los cuales se identificaron mediante la amplificación y análisis del gen ribosomal 16S-rDNA, detectando la presencia de distintos géneros y especies entre los que se encuentran: *Ensifer sp*, *Ensifer teranga*, *Ensifer meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium sp*, *Rhizobium etli*, presentes en nódulos de cacahuate y alfalfa, así como aislados a partir de suelo con historial de cultivo de alfalfa, algodón, cacahuate, papa, chile, durazno y manzano.

Hay congruencia entre las especies bacterianas detectadas y las especies vegetales presentes o que en algún momento fueron cultivadas en los sitios muestreados. Es notable la prevalencia de poblaciones bacterianas de rhizobia en suelos en los que durante varios años, incluso décadas, se ha cultivado otro tipo de especies vegetales no leguminosas, lo que se interpreta como resistencia y adaptación de las cepas bacterianas a las condiciones edafoclimáticas de los sitios en cuestión aún en ausencia de su macrosimbionte.

5.2 INTRODUCCIÓN

El campo de la ecología microbiana ha experimentado cambios revolucionarios en los últimos años, fundamentalmente, debido al impacto de las tecnologías en la biología molecular. Los microorganismos constituyen el principal componente de la biodiversidad, pero se requieren herramientas apropiadas para estimar la diversidad asociada a éstos. La evaluación de la diversidad, de la distribución y de la actividad metabólica de los microorganismos, han estado limitadas durante muchos años al estudio de la microbiota que puede ser cultivada en el laboratorio (Guerrero y Berlanga, 2005). Sin embargo, las técnicas de enriquecimiento y aislamiento de microorganismos establecen condiciones ambientales artificiales que sólo permiten el desarrollo de unos pocos microorganismos (Stahl y Tiedje, 2002; Schaechter *et al.*, 2004).

La integración de los estudios tradicionales de fisiología y genética con las técnicas modernas de la genómica, ofrece la oportunidad de avanzar en el estudio de la evolución microbiana, y entender cómo actúan los microorganismos y cómo controlan la biosfera. La mejor manera para tratar de acercarnos a una descripción y caracterización verosímiles de las poblaciones microbianas es mediante un estudio polifásico, es decir, observar su entorno, integrar la información genética de que se dispone y evaluar características que se expresan bajo diferentes condiciones de cultivo, lo que requiere de un esfuerzo por comprender el complejo entramado de interacciones bióticas y abióticas. El ambiente es el contexto en el que evoluciona y funciona un material genético y el que, en el fondo, determina la supervivencia y complejidad del genoma (Stahl y Tiedje, 2002). Por lo que el desarrollo de técnicas cada vez más avanzadas para explorar la diversidad microbiana nos ha permitido conocer con mayor profundidad la biología de los microorganismos. Estas herramientas han aportado un amplio conocimiento sobre la manera en que este grupo de organismos se constituye en la naturaleza, desde el nivel ecológico hasta el molecular. El desarrollo de técnicas que permiten conocer la diversidad de poblaciones bacterianas no cultivables y la observación *in situ* de sus comunidades, ha abierto nuevos horizontes a la ecología microbiana.

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 Análisis de secuencias del gen 16S rDNA

Se utilizó el análisis de la secuencia del gen 16S rDNA, para ello las bacterias se propagaron en medio TY líquido durante 24 horas a 28 °C.

Posteriormente, se efectuó la extracción de ADN puro de las células con el kit Wizard Genomic DNA purification (Promega) de acuerdo a instrucciones del proveedor.

El gen 16S rDNA se amplificó por PCR a partir del DNA extraído, utilizando los oligonucleótidos:

FGPS-6 (5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3') y

FGPS-1506 (5'-AAG GAG GGG ATC CAG CCG CA-3') (Normand *et al.*, 1992).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización Inicial	3 min.	94 °C	1
Desnaturalización	30 seg.	94 °C	25-30
Alineamiento	45 seg.	60 °C	25-30
Elongación Enzimática	1:30 min.	72 °C	25-30
Extensión Final	10 min.	72 °C	1

El producto de amplificación, de aproximadamente 1500 pb, se verificó en geles de agarosa al 1% a 100 mV, tiñéndose con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) para su observación.

El registro se obtuvo en un sistema de documentación de imágenes equipado con transiluminador de luz UV registrándose en el software Quantity One 4.2.1.

Las bandas obtenidas se cortaron y se purificaron con una columna QIAquick spin (Qiagen Inc.), el producto obtenido se envió para su secuenciación al Centro de Biotecnología Genómica del I. P. N. y al IBT-UNAM.

5.3.2 Identificación genética de cepas aisladas

Las secuencias obtenidas de la amplificación del gen 16S rDNA fueron comparadas con secuencias del mismo gen encontradas en la base de datos de NCBI, en Nucleotide BlastII (Zheng *et al.*, 2000), con el fin de identificar el género bacteriano al que pertenecen (Figura 17).

Posteriormente, se obtuvieron secuencias del gen 16S rDNA de las cepas de referencia de cada género del grupo rhizobia para la elaboración de un dendrograma.

El alineamiento se llevó a cabo con Clustal X; para la edición de éste, se utilizó el software Bioedit; versión. 7.09.0 (Hall, 1999), en el análisis se utilizó el método matemático Neighbor-joining o UPGMA con el software Paup4 v. Beta (Swofford, 2002), y para la edición de los árboles se manejo la herramienta de TreeView X (Win32) v. 1.6.6 (Page, 1996) y Mega. 4.1 Beta (Tamura *et al.*, 2007).

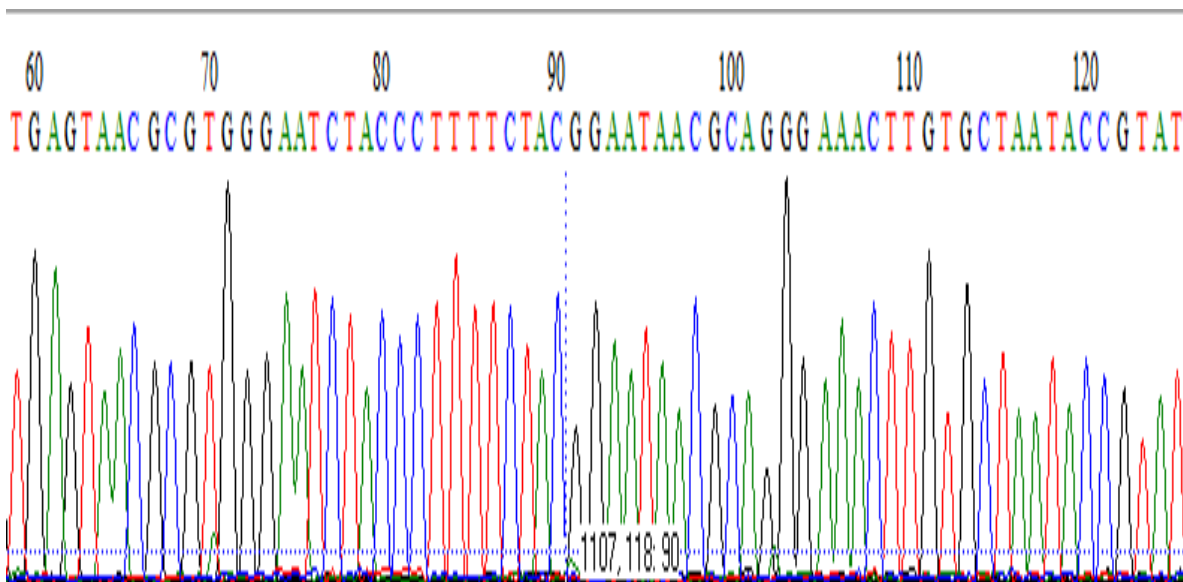


Figura 17. Fragmento representativo de la secuencia obtenida

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Análisis de secuencias del gen 16S rDNA

Se calcularon las concentraciones de DNA de los 31 aislados en correlación al marcador de Bioline de 10 kb en geles de agarosa al 1%. Los oligonucleótidos universales permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 1500 pb. De la mayoría de los aislados se obtuvo un fragmento único, algunos casos mostraron más de un fragmento (Figura 18), por lo que se procedió a purificar la banda de interés a partir del gel de agarosa.

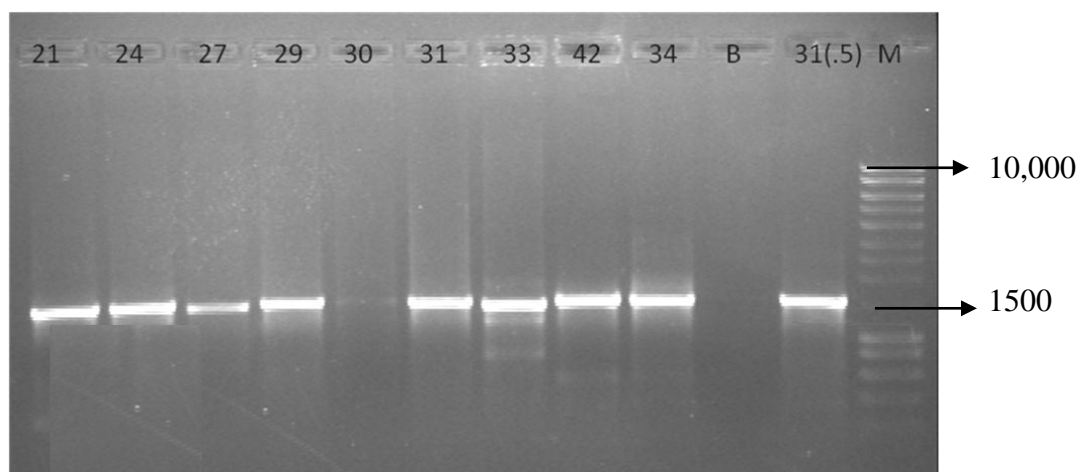


Figura 18. Carriles 1-9 y 11: Amplificado del gen 16S rDNA de aislados provenientes de nódulos de alfalfa y cacahuate, Carril 10- blanco y Carril 12 Marcador Bioline, 10,000 pb.

La identificación taxonómica (a nivel de género) de 31 cepas provenientes de los nódulos y de muestras de suelo, mediante la secuenciación parcial del gen *16S rDNA*, indica que el 100% de estos (31 cepas) pertenecen a géneros ya identificados como bacterias nodulantes de leguminosas. La mayoría de estos aislados se agruparon dentro del género *Ensifer* (18 cepas) y 13 aislados se agruparon con el género *Rhizobium*, presentando una distancia genética entre 0 a 0.08 como se observa en los dendrogramas de las figuras 19 y 20, así como en el cuadro 7.

El análisis de cada una de las secuencias obtenidas se llevó a cabo mediante la comparación de éstas con secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), así como de cepas de referencia.

El análisis fue efectuado con el método de Neighbor-joining. El análisis evolutivo molecular fue realizado usando MEGA, Versión 4 (Tamura *et al.*, 2007). Las ramas

relacionadas con los aislados fueron remarcadas en color. Como out-group se tomó a un representante de la subclase β -proteobacteria. La confiabilidad del árbol fue hecha mediante el análisis de bootstrap con 1000 repeticiones.

Nuestras cepas se insertaron junto a otras del grupo rhizobia, con especies previamente descritas como simbioses de las especies vegetales presentes en algún momento en los suelos de estudio. Sin embargo, en la figura 19 se observa la separación en dos grupos dentro del cluster de *Ensifer meliloti* (*S. meliloti*), este hecho podría ser un indicio de la adaptación o cierto grado de especificidad de las cepas con su simbiote. No podemos aventurar más en esta hipótesis ya que se carece de información de los genes de nodulación u otros involucrados en el establecimiento de una simbiosis efectiva. Sin embargo, debe recordarse que los rhizobia poseen elementos genómicos capaces de permitir la pérdida o adquisición de información simbiótica, eventos que se presentan con cierta frecuencia en la naturaleza. La demostración de que en condiciones naturales la información simbiótica se transfiere entre cepas y el hecho de que numerosas cepas nativas de rhizobia en el suelo carecen de información simbiótica ha marcado un parte-aguas en nuestro entendimiento de la ecología evolutiva de los rhizobia (Wernegreen y Riley, 1999; Vinuesa *et al.*, 2005).

En la figura 20 se puede observar que otras de las cepas obtenidas en este estudio se agrupan consistentemente en dos pequeños subgrupos, mismos que se insertan plenamente entre las especies del género *Rhizobium*. Si la finalidad de este estudio fuera de carácter filogenético, correspondería analizar otros marcadores moleculares que nos permitieran definir la ubicación de nuestras cepas y su relación con el resto de especies del género, incluyendo genes de mantenimiento y genes simbióticos, a fin de poder identificarlas plenamente en una especie o biovar, que pudiera ayudarnos a entender la situación de especificidad respecto a su o sus macrosimbioses.

Por otro lado, el dinamismo que se presenta para compartir, o intercambiar, información simbiótica del genoma de los rhizobia favorece y permite la adaptación a condiciones ambientales cambiantes o de estrés metabólico. Lo que explicaría también la prevalencia de cepas de rhizobia del género *Ensifer* en suelos con décadas de historial de cultivo de frutales y otros, del tipo de durazno, manzano, algodón, chile o papa.

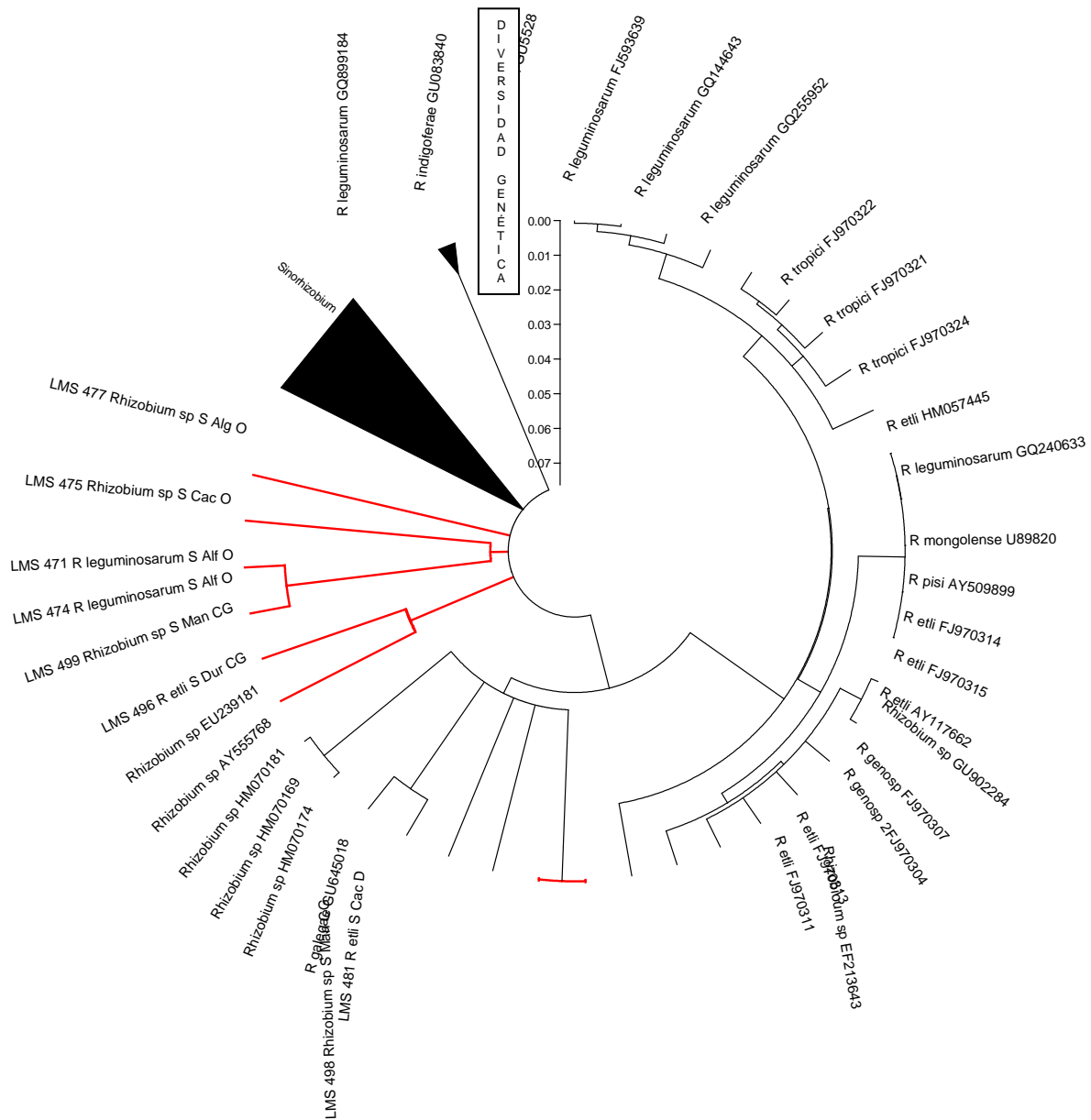


Figura 20. Dendrograma basado en el análisis de las de secuencias del gen 16S rDNA de cepas agrupadas dentro del género de *Rhizobium* de aislados de nódulos de alfalfa y cacahuate, así como de suelo de diferentes cultivos procedente de 3 localidades de Chihuahua (ver anexo).

La transferencia de genes permite la diversificación y especiación bacteriana, por lo que estos eventos tienen un gran impacto sobre la evolución de las poblaciones. Esta es una de las grandes diferencias y ventajas del intercambio genético en bacterias con respecto al de los eucariontes; las bacterias no tienen que “reinventar la rueda”: la transferencia de genes, operones e islas genómicas crea nuevos linajes con combinaciones únicas que pueden explorar nuevos nichos y generar nuevas especies o

ecotipos a través de uno o pocos eventos evolutivos (Lawrence y Hendrickson, 2003; Gogarten *et al.*, 2002).

Este tipo de eventos de recombinación y transferencia lateral son los que pudieron haber ocurrido durante la evolución de la simbiosis entre rhizobia y leguminosas, mismos que siguen ocurriendo continuamente en el campo.

Finalmente, puede establecerse que este tipo de análisis permite una selección preliminar de cepas de rhizobia, promoviendo la especificidad y, en consecuencia, la obtención de una buena nodulación, que a su vez incentive la fijación biológica de nitrógeno. No obstante, es necesario recordar que estos resultados deben ser validados en condiciones de campo para la obtención de un biofertilizante, mismo que resulte adecuado a cada zona estudiada, dentro del marco de una estrategia para alcanzar la agricultura sustentable.

5.4.2 Caracterización de cepas aisladas

Al llevar a cabo la identificación molecular de las cepas estudiadas, podemos observar que mediante la amplificación del gen ribosomal 16SrDNA se detectaron 2 géneros diferentes *Ensifer* y *Rhizobium*, entre las 31 cepas obtenidas, de las cuales una correspondió a *Ensifer teranga*, 10 se ubicaron como *E. meliloti*, 7 más se registraron como *Ensifer sp.*, 6 cepas en el género *Rhizobium sp.*, 2 cepas identificadas como *Rhizobium leguminosarum* y 5 cepas como *Rhizobium etli* (Cuadro 7).

Se analizaron las secuencias correspondientes al gen 16S rDNA de las cepas obtenidas, mostrando que la mayoría de las cepas identificadas pertenecían al grupo de *Ensifer meliloti* (Antes *Sinorhizobium meliloti*) y provenientes de suelos cultivados con alfalfa, cacahuate y manzano. Las bacterias pertenecientes al género *Ensifer sp.* se encontraron también en suelo cultivados con papa, chile y durazno. Como *Rhizobium sp.* se identificó a 6 cepas procedente de suelo con cultivo de cacahuate, algodón, durazno y manzano (Cuadro 7).

Las bacterias del género *Rhizobium* han sido consideradas, generalmente, como simbiosis benéficas y específicas de las leguminosas al realizar la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, muchas investigaciones han sugerido que varias especies del género *Rhizobium* tienen la capacidad para colonizar raíces de no leguminosas tan

eficientemente como a su hospedero natural (Heckmann, 2006), como es el caso de las cepas detectadas en nuestro estudio donde se detectó su presencia en suelos con cultivo de algodón y en suelos con árboles de durazno y manzano, cultivados en dos diferentes localidades (Delicias y Casas Grandes).

Cuadro 7. Identificación de las cepas por análisis del 16S rDNA y origen del aislamiento

Localidad	Clave	Origen	Genero
Ojinaga	LMS469	Suelo de Alfalfa	<i>Ensifer terangae</i>
	LMS470	Suelo de Alfalfa	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS471	Suelo de Alfalfa	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	LMS472	Suelo de Alfalfa	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS473	Suelo de Alfalfa	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS474	Suelo de Alfalfa	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
	LMS475	Suelo de Cacahuate	<i>Rhizobium sp</i>
	LMS476	Suelo de Algodón	<i>Ensifer sp</i>
	LMS477	Suelo de Algodón	<i>Rhizobium sp</i>
	LMS478	Suelo de Algodón	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS479	Nódulo de Cacahuate	<i>Ensifer meliloti</i>
Delicias	LMS480	Suelo de Cacahuate	<i>Ensifer sp.</i>
	LMS481	Suelo de Cacahuate	<i>Rhizobium etli</i>
	LMS482	Suelo de Cacahuate	<i>Rhizobium etli</i>
	LMS483	Suelo de Cacahuate	<i>Rhizobium sp</i>
	LMS484	Suelo de Papa	<i>Ensifer sp</i>
	LMS485	Suelo de Chile	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS486	Suelo de Chile	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS487	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS488	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS489	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer sp.</i>
	LMS490	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer sp.</i>
	LMS491	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer sp.</i>
	LMS492	Nódulo de Alfalfa	<i>Rhizobium etli</i>
Casas Grandes	LMS493	Suelo de Durazno	<i>Rhizobium sp.</i>
	LMS494	Suelo de Durazno	<i>Rhizobium etli</i>
	LMS495	Suelo de Durazno	<i>Ensifer sp</i>
	LMS496	Suelo de Durazno	<i>Rhizobium etli</i>
	LMS497	Suelo de Manzano	<i>Ensifer meliloti</i>
	LMS498	Suelo de Manzano	<i>Rhizobium sp</i>
	LMS499	Suelo de Manzano	<i>Rhizobium sp</i>

Se han realizado estudios de diferentes cepas de *Rhizobium* procedentes de plantas de haba e inoculadas en jitomate (Santillana *et al.*, 2005), así como cepas provenientes de

frijol e inoculadas en maíz y lechuga (Chabot *et al.*, 1996) y también algunos aislados de jitomate inoculados en arroz (Feng, 2005), donde, además, se verificó que promueven la germinación y crecimiento, teniendo como consecuencia una mayor producción en cosecha y reduciendo la dependencia al uso de fertilizantes químicos.

Feng (2005) al inocular arroz, con varias cepas de *Rhizobium* provenientes de leguminosas, observaron que la asociación es esencial para incrementar la producción de fitohormonas y, por lo tanto, el crecimiento de la planta. En nuestro estudio no se ha documentado la presencia de rhizobia, como bacterias asociadas, en los cultivos de algodón, papa, chile, durazno o manzano.

La diversidad genética de *Rhizobium* aislados de nódulos de frijol disminuye considerablemente en algunas variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), si se siembran éstas en presencia de fertilizantes nitrogenados (Caballero-Mellado y Martínez-Romero 1999).

En general, en cada nódulo hay un solo tipo de cepa, pero los nódulos de una sola raíz los forman una gran diversidad de *R. etli*. Esta diversidad designada "por planta" es muy grande. La estructura genética de la población en suelo se describe como reticulada, que significa que se intercambia información genética en poblaciones locales (Silva *et al.*, 1999). En la semilla del frijol se ha reportado la presencia de *rhizobia* viables. La diversidad "por semilla" es muy baja comparada con la población de nódulos (Pérez-Ramírez *et al.*, 1998).

Con respecto a los estudios efectuados, enfocados a la diversidad microbiana, se tienen los trabajos de Mulas *et al.* (2008), en el que nódulos efectivos fueron colectados, para evaluar la diversidad de cepas de rhizobia de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulando en campos de Castilla y León, donde creció por décadas. Varias cepas fueron aisladas, y su identificación taxonómica evaluada. La técnica molecular basada en PCR (TP-RAPD) y la secuencia de dos genes housekeeping (*recA* y *atpD*), fueron usados para identificar las cepas de rhizobia. A pesar de encontrar dos diferentes especies de rhizobia en estos suelos, estas cepas fueron incluidas en el grupo filogenético de *Rhizobium leguminosarum*, mientras que sólo dos fueron identificados como *R. giardinii*.

5.5 CONCLUSIONES

La identificación taxonómica (a nivel de género) de 31 cepas, provenientes de nódulos radiculares y de muestras de suelo, se efectuó con la secuenciación parcial del gen *16S rDNA*, identificando a 18 cepas en el género *Ensifer* y 13 cepas se agruparon con el género de *Rhizobium*.

Se identificaron 7 cepas de *Ensifer sp.*, una cepa de *Ensifer teranga*, 10 se ubicaron como *E. meliloti*, 6 cepas del género *Rhizobium sp.*, 2 cepas identificadas como *Rhizobium leguminosarum* y 5 cepas como *Rhizobium etli*.

Si bien el análisis de secuencias del 16S rDNA no es concluyente en términos filogenéticos, la identificación a nivel de género y en algunos casos a nivel de especie, ayuda a establecer parejas simbióticas de prueba para la evaluación del potencial biofertilizante de las cepas obtenidas en los sitios de estudio.

Cabe resaltar que las 31 cepas obtenidas se ubicaron en sólo dos géneros del grupo rhizobia, lo que restringe la prevalencia de estas cepas a la presencia (actual o histórica) de sus macrosimbiontes, como son en éstos caso frijol, cacahuate y alfalfa, principalmente. Las cepas obtenidas se agruparon consistentemente en subgrupos divergentes de las cepas de referencia que se usaron en el análisis, sin embargo dado que sólo se hizo el análisis de la secuencia parcial del 16S rDNA, no podemos aventurar conclusión alguna en relación al estatus filogenético taxonómico de dichas cepas, pero sí se refleja un grado de conservación que apunta a la coevolución de los simbiontes y, posiblemente, un factor altamente influyente en la prevalencia de cepas de rhizobia en el suelo que actúan como bacteria promotoras del crecimiento vegetal cuando no es posible que se establezca una asociación simbiótica fijadora de nitrógeno con especies de la familia Leguminosae.

CAPÍTULO VI

DIVERSIDAD FENOTÍPICA DE RHIZOBIA

6.1 RESUMEN

En la simbiosis rhizobia-leguminosa, la fijación de nitrógeno está relacionada con el estadio fisiológico de la planta huésped, así como con las condiciones edafoclimáticas, de manera que aunque una cepa de rhizobia sea altamente efectiva, competitiva y persistente, su capacidad de fijación de nitrógeno estará limitada por diversos factores. Los involucrados en la nodulación (rhizobia y leguminosa), su asociación y funcionalidad, son afectados positiva o negativamente por las condiciones ambientales durante su ciclo de vida, considerando su capacidad de adaptación a condiciones adversas, su permanencia en el sitio de interés, y su facilidad de manejo. Por lo que, en este capítulo, se planteó como objetivo evaluar la diversidad de las cepas aisladas mediante pruebas fisiológicas. Se evaluó el crecimiento de las 31 cepas de rhizobia, obtenidas a partir de 11 muestras compuestas suelo y nódulos radiculares, en medio de cultivo con diferentes condiciones (pH de 4.0, 5.5, 6.8 y 8.0; temperatura de incubación a 32 y 42°C, concentración de NaCl de 0.01, 0.51 y 0.85 moles L⁻¹). Algunas cepas presentaron una baja capacidad de supervivencia al incubar a diferentes temperaturas, o cambios en el medio de cultivo, sin embargo, algunas cepas resaltaron por su capacidad de adaptación a estos cambios. La diferencia en efectividad por parte de las diferentes cepas ensayadas sugiere que una inoculación multicepa permitiría aprovechar las características de adaptación más sobresalientes de cada cepa en las diferentes condiciones prevalentes en los terrenos de cultivo para alcanzar una agricultura sustentable.

6.2 INTRODUCCIÓN

Las características del suelo como temperatura, humedad, composición química y física, varían dentro de pequeñas aéreas y estas variaciones afectan a las poblaciones bacterianas del suelo (Willems *et al.*, 2006). Así, las diferentes respuestas relacionadas con la salinidad, acidez/alcalinidad y temperatura pueden ser características distintivas de las bacterias del suelo e influir en la persistencia y capacidad de nodulación en las plantas leguminosas.

Sin embargo, cuando las cepas sobreviven a altas temperaturas no significa que haya una mayor eficiencia en las cepas en cuanto a la fijación de nitrógeno ya que se ha observado que cepas aisladas de climas cálidos y secos pierden su efectividad, además las altas temperaturas pueden retrasar la nodulación o facilitar el desarrollo de nódulos inefectivos (Philippus *et al.*, 2008; Naya *et al.*, 2007).

En este estudio nos muestran que las cepas presentan una diversidad en cuanto a la capacidad de crecimiento, presentando capacidad de adaptación a elevadas temperaturas, crecimiento en un amplio intervalo de valores de pH y tolerancia a diversas concentraciones de NaCl. Un factor importante en la detección de microorganismos es el medio de cultivo utilizado para evaluar estas poblaciones, ya que cualquier modificación de la humedad, materia orgánica o el pH puede influir en la posibilidad de aislar ciertas poblaciones bacterianas (Zehr *et al.*, 2003). Por lo anterior, es necesario evaluar el efecto de esta respuesta en ensayos de campo, bajo las condiciones edafoclimáticas y ecológicas que prevalecen en los sitios de estudio.

6.3 METODOLOGÍA

6.3.1 Pruebas fisiológicas

La caracterización de las 31 cepas se efectuó con base en sus características morfológicas y bioquímicas.

Características de crecimiento. La capacidad de crecimiento a diferentes valores de pH, Temperatura de incubación y tolerancia a cloruro de sodio se determinó de la siguiente manera:

Se inocularon tubos con 7 mL de medio de cultivo YA líquido con cepas precultivadas a 28°C durante 24-48 hrs. Las células fueron lavadas con una solución isotónica al 0.8% y se resuspendieron en 10 ml de solución salina al 0.8%. Con esta suspensión se inocularon tubos conteniendo 5 mL de medio de cultivo YA líquido, siendo inoculadas a una densidad óptica (D. O.) a 600 nm entre 0.08-0.1 de población bacteriana para efectuar una cinética de crecimiento, los tubos se incubaron de acuerdo a las características de cada ensayo en las siguientes condiciones:

La capacidad de crecimiento se determinó a temperaturas de incubación de 32 y 42°C. El pH del medio de cultivo se ajustó a 4.0, 5.5, 6.8 y 8.0, con HCl o NaOH.

Las concentraciones de NaCl ensayadas fueron de 0.017, 0.51 y 0.85 moles/L en el medio de cultivo.

Los tubos inoculados fueron incubados por una semana, durante la cual, cada 24 horas se efectuó la medición del valor de D.O.

La incubación de todos los ensayos se llevó a cabo en agitación constante y las muestras se analizaron por triplicado.

6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Pruebas fisiológicas

6.4.1.1 Crecimiento a 32 °C y 42 °C

Las 31 cepas de este estudio presentaron un crecimiento mayor a temperatura de incubación de 32°C (se muestran los valores de densidad óptica de crecimiento a las 96 hrs), sobresaliendo las cepas LMS473 y LMS479, procedentes de Ojinaga e identificadas por análisis de 16S rDNA como *Ensifer meliloti*.

De las 31 cepas obtenidas en este estudio se observó que sólo algunas presentaron un máximo de crecimiento a los 42°C, encontrando cepas provenientes de las tres localidades en estudio (Figura 21 y Cuadro 8), siendo las cepas: LMS472 identificada como *E. meliloti* proveniente de Ojinaga, LMS476 correspondiente *Ensifer* sp de Ojinaga, LMS479 identificada como *E. meliloti* de Ojinaga, LMS486 que corresponde a *E. meliloti* de Delicias y LMS492 que se identificó como *Rhizobium etli* de Delicias, estas cepas presentaron mayor crecimiento a 42°C, el resto de los aislados su crecimiento obtenido fue menor de 1.5 de densidad óptica_{600nm}.

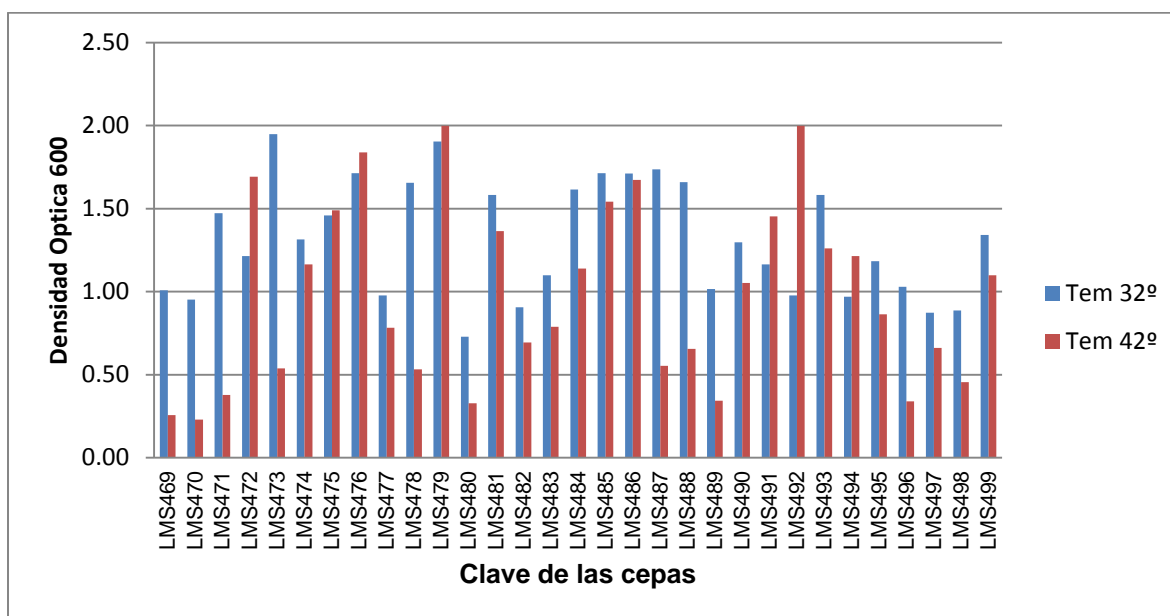


Figura 21. Crecimiento de las cepas en estudio en 2 diferentes valores de temperatura (Ver cuadro 8).

Los rhizobia que presentan crecimiento rápido, como los que nodulan alfalfa, tienen un intervalo óptimo de temperatura (28-47°C) mayor que los de crecimiento lento, como los

específicos de soya (32-44°C) (Philippus *et al.*, 2008; Hassan 2004; Vriezen *et al.*, 2007; Figareido *et al.*, 2008), en este estudio se observó que 5 cepas presentaron un crecimiento mayor a 42°C las cuales fueron identificadas como LMS472 *Ensifer meliloti* aislada de suelo de alfalfa, LMS476 *Ensifer sp* aislada de suelo de algodón, LMS479 *Ensifer meliloti* aislada de nódulo de cacahuate, LMS486 *Ensifer meliloti* aislada de suelo de chile y LMS492 *Rhizobium etli* aislada de nódulo de alfalfa.

6.4.1.2 Crecimiento a diferentes valores de pH del medio

Para observar el crecimiento de las cepas en estudio en diferentes condiciones en las cuales pudieran encontrarse en su ambiente natural, se efectuaron pruebas de resistencia a diferentes valores de pH, los resultados obtenidos nos muestran diversidad en cuanto a la capacidad de crecimiento a diferentes valores de pH (se muestran los valores de densidad óptica de crecimiento a las 96 hrs), ya que podemos observar que algunas cepas crecen en un amplio intervalo de valores de pH, desde ácido hasta alcalino (Figura 22 y Cuadro 8), aunque también se observa que sólo unas pocas de las cepas estudiadas presentan crecimiento en valores restringidos de pH, creciendo, ya sea en valores de pH ácido o alcalino únicamente.

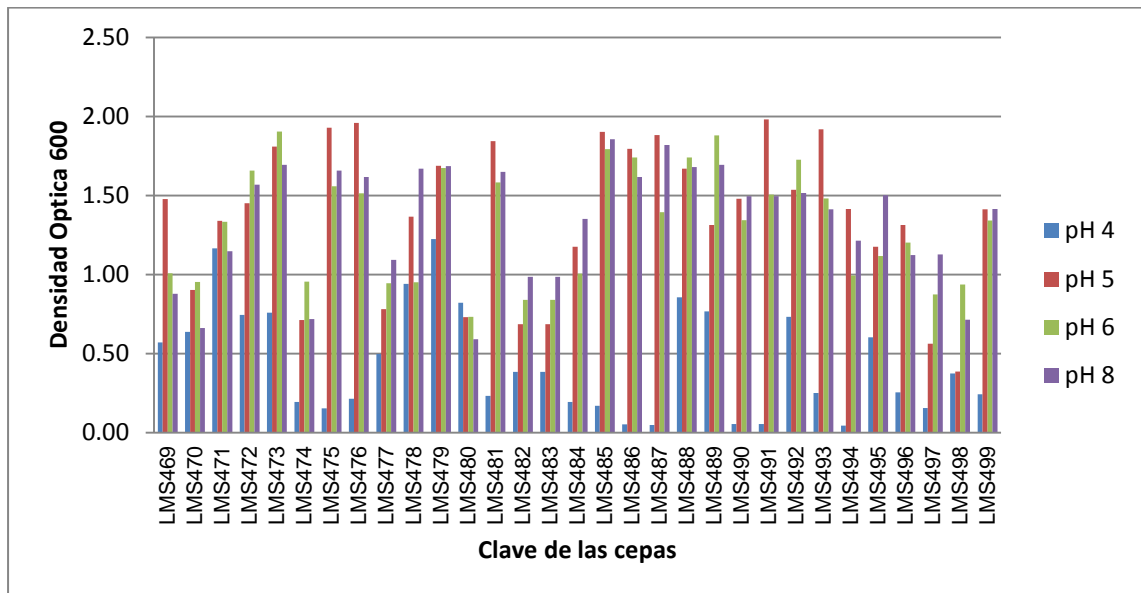


Figura 22. Crecimiento de cepas en estudio en 4 diferentes valores de pH (Ver cuadro 8).

Las cepas que resistieron en medio de cultivo a pH 4 mostraron un crecimiento bajo, pero ninguna alcanzó niveles sobresalientes de DO. En el caso de crecimiento a pH 5 sobresalieron 12 cepas. Para la evaluación de crecimiento a pH 6.8, condición estándar de crecimiento en condiciones de cultivo *in vitro*, sobresalieron 11 cepas del estudio. Durante los ensayos a pH 8, sobresalieron 16 cepas, las cuales presentaron mayor crecimiento, siendo identificadas la mayoría dentro del género *Ensifer*.

Las bacterias de crecimiento rápido del grupo rhizobia son, generalmente, más sensibles que las de crecimiento lento a bajos valores de pH. Por ejemplo, *S. meliloti*, microsimbionte de alfalfa, casi desaparece en suelos de pH menor a 6.0, mientras que *B. japonicum*, microsimbionte de soya tolera valores de pH menores. El efecto del pH tiene gran influencia sobre la biodisponibilidad de los nutrientes del suelo. El pH bajo generará deficiencias de fósforo disponible, lo que a su vez puede afectar la fijación de N₂ (Philippus *et al.*, 2008; Hassan 2004; Vriezen *et al.*, 2007).

6.4.1.3 Crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl del medio

De los resultados obtenidos en esta prueba podemos observar que 17 cepas presentan mayor crecimiento a valores elevados de NaCl (1%), sólo 3 cepas presentaron mayor crecimiento en NaCl 3% y sólo una cepa presentó mayor crecimiento en NaCl 5%, cabe resaltar que la mayoría de las cepas de las tres localidades en estudio presentaron crecimiento en concentraciones estándar de NaCl en el medio de cultivo (se muestran los valores de densidad óptica de crecimiento a las 96 hrs) (Figura 23 y Cuadro 8).

El estrés generado por la sequía y por las altas temperaturas, depende de la región y en muchos casos es reversible, el estrés salino es permanente, por lo que los organismos deben vivir y crecer en esas condiciones. Las cepas de diferentes especies de rhizobia muestran una marcada variabilidad en cuanto a la tolerancia a los suelos salinos (Philippus *et al.*, 2008; Hassan, 2004; Vriezen *et al.*, 2007).

Finalmente, de los resultados obtenidos y mostrados anteriormente se obtuvieron siete cepas que presentaron mayor capacidad de adaptación, crecimiento a elevadas temperaturas, crecimiento en un amplio intervalo de valores de pH y tolerancia a diversas concentraciones de NaCl del medio (Cuadro 8). Estas cepas pueden ser

consideradas para su evaluación en ensayos de campo, que nos permitan confirmar las respuestas obtenidas en laboratorio; el resto de las cepas no debe ser descartado, ya que con el seguimiento adecuado pueden llegar a ser útiles en el diseño de inoculantes que posean potencial para su aplicación en diferentes condiciones y sistemas de cultivo.

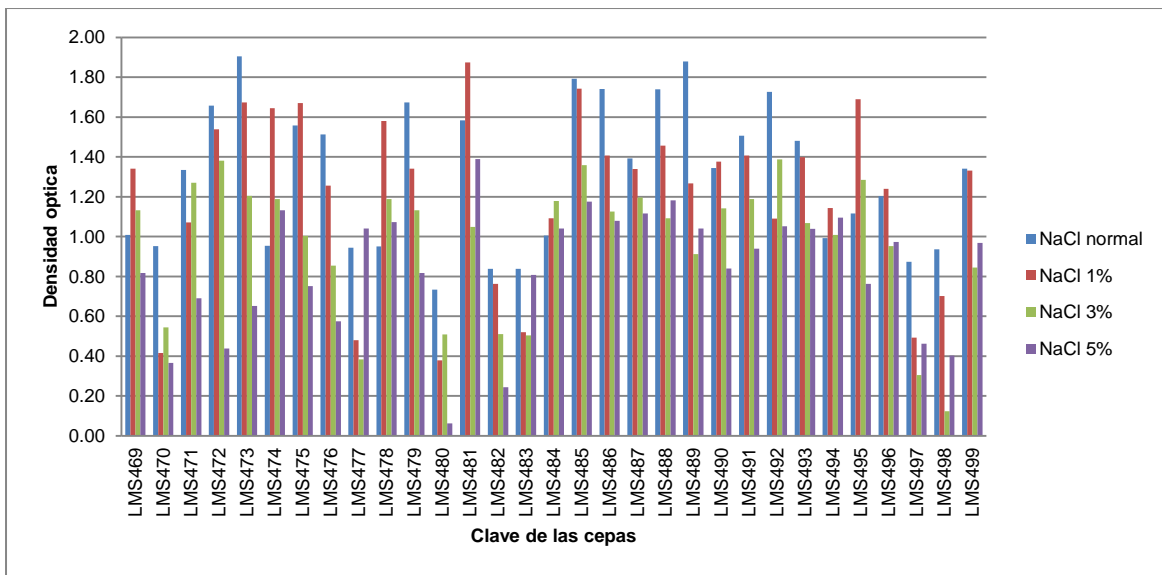


Figura 23. Crecimiento de las cepas en estudio en 4 diferentes concentraciones de NaCl (Ver cuadro 8).

Este es uno de los principales factores que limitan los beneficios de las biotecnologías basadas en el uso de microorganismos, como los fijadores de N_2 , debido a que su metabolismo se ve alterado por las condiciones edáficas y ambientales. Dado que la fertilidad del suelo es dependiente de la acción de los organismos del suelo que reciclan los nutrientes, es necesario favorecer las condiciones óptimas para el funcionamiento de estos organismos.

El número de rhizobia del suelo se reduce a medida que el suelo se seca. La fijación biológica de N_2 es un proceso aún más sensible al déficit de agua que la transpiración, la fotosíntesis, la tasa de crecimiento de las hojas o la asimilación de nitratos (Figueiredo *et al.*, 2008). Ante un déficit hídrico, la planta, como primera medida, inactiva la nitrogenasa, y por lo tanto la fijación N_2 .

Cuadro 8. Cepas con mayor crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo

LOCALIDAD	CLAVE	ORIGEN	GENERO	T32°	T42°	pH4	pH5	pH6.8	pH8	NaCl1%	NaCl3%	NaCl5%
Ojinaga	LMS469	Suelo Alfalfa	<i>Ensifer terangae</i>				1.47			1.34		
	LMS470		<i>Ensifer meliloti</i>									
	LMS471		<i>Rhizobium leguminosarum</i>				1.34	1.33				
	LMS472		<i>Ensifer meliloti</i>	1.62	1.70		1.45	1.65	1.56	1.54	1.38	
	LMS473		<i>Ensifer meliloti</i>				1.80	1.90	1.69	1.67		
	LMS474		<i>Rhizobium leguminosarum</i>							1.64		
	LMS475	Suelo Cacahuete	<i>Rhizobium sp</i>	1.45	1.490		1.92	1.55	1.65	1.67		
	LMS476	Suelo Algodón	<i>Ensifer sp</i>	1.71	1.838		1.95	1.51	1.61			
	LMS477		<i>Rhizobium sp</i>									
	LMS478		<i>Ensifer meliloti</i>				1.36		1.66	1.58		
LMS479	Nódulo Cacahuete	<i>Ensifer meliloti</i>	1.90	1.99		1.68	1.67	1.68	1.34			
Delicias	LMS480	Suelo Cacahuete	<i>Ensifer sp.</i>									
	LMS481		<i>Rhizobium etli</i>				1.84	1.58	1.64	1.87		1.39
	LMS482		<i>Rhizobium etli</i>									
	LMS483		<i>Rhizobium sp</i>									
	LMS484	Suelo Papa	<i>Ensifer sp</i>						1.35			
	LMS485	Suelo Chile	<i>Ensifer meliloti</i>	1.71	1.54		1.90	1.79	1.85	1.74	1.36	
	LMS486		<i>Ensifer meliloti</i>	1.71	1.67		1.79	1.74	1.61	1.41		
	LMS487	Nódulo de Alfalfa	<i>Ensifer etli</i>				1.88	1.39	1.81	1.34		
	LMS488		<i>Ensifer meliloti</i>				1.66	1.73	1.67	1.46		
	LMS489		<i>Ensifer sp.</i>				1.31	1.87	1.69			
	LMS490		<i>Ensifer sp.</i>				1.47	1.34	1.49	1.38		
	LMS491		<i>Ensifer sp.</i>	1.16	1.45		1.98	1.50	1.49	1.41		
LMS492	<i>Rhizobium etli</i>		0.97	1.99		1.53	1.72	1.51		1.39		
Casas Grandes	LMS493	Suelo Durazno	<i>Rhizobium sp.</i>				1.91	1.48	1.41	1.40		
	LMS494		<i>Rhizobium etli</i>	0.96	1.21		1.41					
	LMS495		<i>Ensifer sp</i>						1.50	1.69		
	LMS496		<i>Rhizobium etli</i>				1.31					
	LMS497	Suelo Manzano	<i>Ensifer meliloti</i>									
	LMS498		<i>Rhizobium sp</i>									
	LMS499		<i>Rhizobium sp</i>				1.41	1.34	1.41	1.33		

Dentro de ciertos límites de tiempo, si se recupera la humedad edáfica, se reactiva la enzima. La primera respuesta a la sequía es reversible, mientras que la respuesta a sequías prolongadas es irreversible (Philippus *et al.*, 2008; Hassan, 2004; Vriezen *et al.*, 2007; Naya *et al.*, 2007). El efecto de la inundación es más severo en las plantas que crecen a expensas del N₂ proveniente de la fijación biológica que en las que usan el N edáfico, indicando que la fijación de N₂ es más sensible que la planta misma (Philippus *et al.*, 2008; Hassan, 2004; Vriezen *et al.*, 2007).

El exceso de agua (anegamiento) también afecta la simbiosis, rhizobia-leguminosa, al generar anaerobiosis (falta de O₂) en el suelo. El oxígeno es indispensable para la vida de rhizobia libre en el suelo y para la raíz de la planta. El encharcamiento llevará a la muerte de las bacterias del suelo, y a un detrimento de las condiciones de crecimiento para la planta, que impedirá la nodulación y la fijación biológica, hasta la eliminación de los nódulos ya establecidos (Philippus *et al.*, 2008; Vriezen *et al.*, 2007).

6.5 CONCLUSIONES

Las 31 cepas presentaron crecimiento mayor a temperatura de incubación de 32°C, sobresaliendo las cepas LMS473, LMS479 e identificadas como *Ensifer meliloti*.

Del total, 5 cepas presentaron un crecimiento mayor cuando fueron incubadas a 42°C estas fueron identificadas como *E. meliloti* aisladas de suelo de alfalfa, LMS476 *Ensifer sp* aislada de suelo de algodón, LMS479 *Ensifer meliloti* aislada de nódulo de cacahuate, LMS486 *Ensifer meliloti* aislada de suelo de chile y LMS492 *Rhizobium etli* aislada de nódulo de alfalfa.

Los resultados obtenidos nos muestran una diversidad en cuanto a la capacidad de crecimiento en diferentes valores de pH del medio de cultivo.

Las cepas que presentan crecimiento a pH 4 mostraron, en general, un pobre crecimiento.

Cuando se evaluó el crecimiento a pH 5, 12 de las 31 cepas mostraron un buen crecimiento, sobresaliendo por ello.

Para la evaluación de crecimiento a pH 6.8 (valor estándar del medio de cultivo) 11 cepas mostraron los más altos valores de DO_{600 nm}. Mientras que en medio de cultivo con pH 8 el crecimiento de 16 cepas resaltó por presentar los valores más altos de DO_{600 nm}.

De las 31 cepas estudiadas, 17 cepas presentaron buen crecimiento en medio de cultivo con concentración de NaCl 1%, 3 cepas presentaron mayor crecimiento en medio con NaCl 3% y sólo una cepa presentó mayor crecimiento en NaCl 5%.

Se obtuvieron siete cepas que presentaron capacidad de adaptación a elevadas temperaturas, crecimiento en un amplio intervalo de valores de pH y tolerancia a diversas concentraciones de NaCl.

La inestabilidad de los aislados para su estudio, así como su tolerancia a diferentes temperaturas, pH, concentraciones de sales, estas características, sumadas a las información proporcionada por los agricultores, sugiere que el comportamiento de las poblaciones microbianas presentes en los suelos estudiados están siendo afectadas por el uso de agroquímicos, e influenciadas por los factores bióticos y abióticos donde se encuentran estas bacterias. Este es uno de los principales factores que limitan los beneficios de las biotecnologías basadas en el uso de microorganismos.

Si bien, las cepas de rhizobia en general presentan baja tolerancia a cambios de temperatura o pH del medio, altas concentraciones de sales del mismo, y una restringida utilización de diferentes compuestos como fuente de energía, durante este estudio se aislaron cepas con capacidad de crecimiento en condiciones que se consideran adversas y que sugieren una mayor flexibilidad fisiológica y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales. Lo anterior las hace buenas candidatas para el diseño y elaboración de biofertilizantes que respondan a las características ambientales y de cultivo de las localidades en estudio.

La cepa *Ensifer* sp. LMS485, aislada de suelo con cultivo de chile en Delicias, destacó por su capacidad de crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl del medio de cultivo, y a diferentes temperaturas de incubación. Mientras que la cepa *E. meliloti* LMS479, aislada de nódulos de cacahuate de Ojinaga, mostró capacidad de crecimiento en medio de cultivo con diferentes niveles de pH, uno de los principales factores limitantes del aprovechamiento de los inoculantes.

CAPITULO VII

EVALUACIÓN DE CEPAS DE TIPO RHIZOBIA CON FINES DE INOCULACIÓN

7.1 RESUMEN

Una alternativa para mantener un nivel rentable de producción, es la aplicación de biotecnologías; como la utilización de microorganismos que permite sustituir de manera parcial la fertilización nitrogenada y proporcionan otros beneficios a los cultivos, por lo que, en este estudio se investigó la mejor relación entre tres especies de leguminosas y bacterias del grupo rhizobia, debido a que ciertas cepas tienen mayor capacidad de establecer una simbiosis efectiva, y con ello incrementar la disponibilidad de nutrientes del suelo, contribuyendo al mejoramiento e incremento del rendimiento vegetal.

En la relación rhizobia-leguminosa, la fijación de nitrógeno está relacionada con el estadio fisiológico de la planta huésped, así como con las condiciones edafoclimáticas, de manera que aunque una población de rhizobia sea altamente efectiva, competitiva y persistente, su capacidad de fijación de nitrógeno estará limitada por diversos factores, como las temperaturas extremas, la humedad, la presencia de O₂ y CO₂, y los problemas derivados del uso indiscriminado de fertilizantes químicos.

Como objetivo de este capítulo se evaluó el potencial simbiótico de las cepas aisladas y purificadas de muestras obtenidas a partir de tres localidades de Chihuahua. Para estimar el potencial simbiótico se midió indirectamente la capacidad fijadora de nitrógeno, mediante la técnica de ARA, y se evaluó la capacidad de nodulación en diferentes variedades vegetales bajo condiciones de invernadero. Las respuestas a la inoculación fueron muy diferentes, notablemente, una sola cepa no fue capaz de responder positivamente según los parámetros evaluados.

Durante un ensayo de trampeo se desarrolló una mayor cantidad de nódulos en plantas de frijol inoculadas con suelo de cultivo de alfalfa. El aislamiento mediante trampeo en el caso del frijol, a pesar de ser una planta de amplio espectro de hospedero, también presentó cierto grado de especificidad con determinadas cepas de rhizobia.

Durante estos ensayos resaltó el hecho de que la sobrevivencia bacteriana a altas temperaturas no significa que se posea una mayor eficiencia en la fijación de nitrógeno, ya que las cepas aisladas en climas cálidos y secos pierden su efectividad, además las altas temperaturas pueden retrasar la nodulación o desarrollar nódulos inefectivos.

7.2 INTRODUCCIÓN

La fijación biológica de nitrógeno en leguminosas es un proceso clave en la agricultura, con la producción de leguminosas se suministra cerca de 20 millones de toneladas de N anualmente. La influencia del medio ambiente, el manejo y prácticas agrícolas que elige cada productor, resulta en una amplia variación en la FBN derivada de la inoculación, comúnmente entre cero y aproximadamente 400 kg de N por hectárea (Herridge, 2006). El grupo más estudiado de los fijadores simbióticos de nitrógeno, son los llamados rhizobia, este término es utilizado para agrupar a aquellas bacterias capaces de nodular una o más especies de la familia Fabácea y que pueden llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno durante esta asociación simbiótica (Moulin *et al.*, 2001; Weir *et al.*, 2004), esto beneficia a la planta, aumentando su capacidad para desarrollarse en suelos pobres desde el punto de vista nutricional (Trinchant *et al.*, 2001; Espinosa y Malpica, 2007; Giles *et al.*, 2008). La selección de bacterias de rhizobia requiere la integración de parámetros físicos, químicos y biológicos que favorezcan la supervivencia de las poblaciones en condiciones por debajo de lo óptimo a través del tiempo (Kyei-Boahen *et al.*, 2002).

Existen diferentes metodologías para estimar la cantidad de nitrógeno fijado en diversos grupos de fijadores de nitrógeno, la técnica de reducción de acetileno ha sido usada ampliamente. En consecuencia, hay muchos estudios enfocados en los efectos de los factores fisiológicos y metodológicos en las mediciones de la reducción de acetileno (Valles de la Mora *et al.*, 2003; Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004).

De las técnicas disponibles para cuantificar la FBN, la de dilución isotópica de N¹⁵ es considerada la más confiable que nos permite estimar la proporción de nitrógeno derivado de la FBN (Valles de la Mora *et al.*, 2003; Campillo *et al.*, 2003).

Hoy en día la FBN cobra más valor, dentro del contexto de la agricultura sostenible, ya que se puede disminuir el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en el consumo de energía y la disminución de la degradación del medio, desde el punto de vista ecológico.

7.3 METODOLOGÍA

7.3.1 Trampeo de cepas de rhizobia

Se utilizaron semillas de alfalfa, cacahuete y frijol, mismas especies de los cultivos registrados en los sitios donde se realizó el muestreo en Chihuahua. Las semillas se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio durante 10 minutos y se lavaron durante 30 min en agua desionizada y estéril, posteriormente se pusieron a germinar en un soporte estéril de suelo y vermiculita (50 y 50%) en invernadero. Posteriormente, se inocularon con una suspensión de suelo (1 g de suelo disuelto en 10 mL de agua estéril). Las plantas se dejaron en crecimiento durante cuatro a cinco semanas, y dos a tres veces por semana se regaron con solución nutritiva de Hogland libre de nitrógeno, en invernadero permanecieron a una temperatura de crecimiento de 36-40°C, después de este periodo de tiempo se observó la presencia de nódulos en las raíces de cada plántula. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

7.3.2 Evaluación de cepas en invernadero

Las 31 cepas de rhizobia obtenidas en los muestreos en localidades de Ojinaga, Delicias y Casas Grandes, Chihuahua, se evaluaron a nivel de invernadero.

La capacidad de los 31 aislados para estimular el desarrollo de plantas leguminosas se valoró en plántulas de alfalfa y frijol, utilizando bolsas de plástico con suelo estéril procedente de la región muestreada, en el cual se depositaron semillas de alfalfa y frijol, previamente las semillas se escarificaron y desinfectaron, superficialmente con hipoclorito de sodio durante 10 minutos, se germinaron en placas de Petri conteniendo agar-agua al 1% durante 48 horas a 37°C. Las plántulas se transfirieron a bolsas de plástico con un soporte estéril de suelo y vermiculita (50 y 50%), cada plántula fue inoculada con un mililitro de cultivo de las cepas aisladas, evaluando el potencial simbiótico de las cepas aisladas.

Previo a la inoculación de las plantas, los aislados se propagaron en medio líquido TY, durante 48 horas a 30°C, en agitación orbital a 150 rpm. Una vez en fase exponencial, cada plántula se inoculó con 1 mL de la suspensión bacteriana equivalente a 8×10^8 UFC de cada una de las cepas (0.8 DO_{600}).

Las plantas se dejaron en crecimiento durante cuatro a cinco semanas, y dos a tres veces por semana las plántulas se regaron con solución nutritiva de Hogland libre de nitrógeno, en invernadero permanecieron a una temperatura de crecimiento de 36-40°C, después de este periodo de tiempo se observó la presencia de nódulos en las raíces de cada plántula. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

Los parámetros a evaluar fueron: materia seca, altura de la planta, diámetro del tallo, altura del tallo, largo de la raíz, número y tamaño de los nódulos.

7.3.3 Estimación de la actividad reductora de acetileno

La fijación biológica de nitrógeno se estimó indirectamente por el método de reducción de acetileno. Lo anterior, mediante la incubación, durante 24 h, de nódulos radiculares en viales de 10 mL de capacidad con tapón reversible, y con 10% del volumen sustituido por acetileno. La cantidad de acetileno reducido a etileno se analizó por cromatografía de gases en un instrumento Varían 3700 equipado con detector de ionización de flama (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004).

7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.4.1 Trampeo de cepas de rhizobia

En los ensayos de trampeo con suelo de diferentes cultivos, se obtuvo del desarrollo de nódulos en plantas de cacahuate, frijol y alfalfa, presentando muy diversas tasas de nodulación (Cuadro 9). En el caso de las plantas de cacahuate no hubo desarrollo de nódulos a partir de los suelos ensayados.

Al analizar el número de nódulos presentes en plantas de alfalfa y frijol, se detectó una mayor cantidad de nódulos en plantas de frijol inoculadas con suelo donde se cultivaba alfalfa, encontrando diferencia significativa en comparación con el resto de los suelos inoculados ($p \leq 0.05$), que además presentaron una diferencia mínima significativa de 18.55 en el número de nódulos. En plantas de cacahuate al inocularse con las diferentes muestras de suelo no se obtuvo desarrollo de nódulos. En cuanto al color de los nódulos estos fueron rosados y blancos en plantas de alfalfa, y en plantas de frijol los nódulos presentaron color café, pardo y café claro, el color interno de los nódulos fue semejante al color externo.

El aislamiento mediante trampeo empleando semillas de cacahuate, alfalfa y frijol puede provocar la selección de cepas específicas de esas variedades subestimando las poblaciones presentes en las muestras estudiadas, en el caso del frijol a pesar de ser una planta de amplio espectro de hospedero, también presenta cierto grado de especificidad por determinadas cepas de rhizobia. Mediante esta técnica se logró el aislamiento de 16 cepas procedentes de los nódulos obtenidos en las plantas trampa, presentando colonias rojas, rosas y blanquecinas, las cuales fueron de aspecto húmedo, elevación convexa, de forma circular, con bordes regulares y enteros, reflejando luz brillante, de consistencia mucosa, y al efectuar la purificación de estas cepas no se logró su aislamiento para continuar el estudio, esto puede ser consecuencia de una disminución en la capacidad de las bacterias de sobrevivir en hábitats diferentes a los presentados en las localidades de muestreo, como consecuencia de las prácticas de cultivo que se acostumbran en estas regiones.

Reis *et al.* (2004) destacaron como condicionante de la mayor o menor abundancia de microorganismos benéficos en el suelo, el manejo del cultivo y la época del muestreo combinado con el tipo de planta hospedera, debido a la composición de los exudados

radiculares y la relación C/N de la rizósfera. Sin embargo, también se ha encontrado que los fertilizantes nitrogenados y las prácticas de cultivo tienen efectos negativos sobre estas poblaciones.

Cuadro 9. Presencia de nódulos en plantas de frijol, cacahuate y alfalfa

Localidad	Cultivo	Suelo inoculado	No de Nódulos	Color Externo	Color Interno
Ojinaga	Alfalfa	Alfalfa	17 cf	Rosados	Rosados
		Algodón	13 efg	Rosados	Rosados
		Cacahuate	10 fg	Blancos	Crema
	Cacahuate	Alfalfa	SN	-	-
		Algodón	SN	-	-
		Cacahuate	SN	-	-
	Frijol	Alfalfa	85 a	Pardos-Café-Claro	Rosado-Crema
		Algodón	33 cd	Pardos-Café-Claro	Crema
		Cacahuate	67 ab	Pardos-Café-Claro	Rosado-Crema
Delicias	Alfalfa	Alfalfa	10 fg	-	-
		Cacahuate	SN	-	-
		Papa	SN	-	-
		Chile	SN	-	-
	Cacahuate	Alfalfa	SN	-	-
		Cacahuate	SN	-	-
		Papa	SN	-	-
		Chile	SN	-	-
	Frijol	Alfalfa	39 c	Rosados	Rosados
		Cacahuate	SN	-	-
		Papa	31 cde	Rosados	Rosados
		Chile	SN	-	-
Casas Grandes	Alfalfa	Durazno	8 g	Rosados	Rosados
		Nogal	5 g	Blancos	Café-Claro
		Manzano	10 fg	Rosados	Rosados
		Chile	6 g	Blancos	Café-Claro
	Cacahuate	Durazno	SN	-	-
		Nogal	SN	-	-
		Manzano	SN	-	-
		Chile	SN	-	-
	Frijol	Durazno	65 b	Pardos-Café-Claro	Rosados-crema
		Nogal	6 g	Café-Claro	Rosados
		Manzano	69 ab	Café-Claro	Rosados
		Chile	27 cdef	Crema	Crema

a = Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

SN= Sin nódulos

7.4.2 Evaluación de cepas en invernadero

Los 31 aislados seleccionados, se evaluaron en semillas de alfalfa, cacahuate y frijol, utilizando de tres a cuatro semillas por maceta. Previo a la inoculación de las plantas, los aislados se propagaron en medio líquido TY, durante 48 horas a 30°C, en agitación orbital a 150 r.p.m.

Una vez en fase exponencial, cada plántula de alfalfa, frijol y cacahuate se inoculó con 1 mL del medio de cultivo de la suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 células mL^{-1}), para evaluar el potencial simbiótico de las cepas aisladas.

Los parámetros evaluados en las plantas de frijol mostraron que las cepas inoculadas influyeron de manera independiente:

1) En relación a la altura de las plantas, se observó que la cepa LMS497 presentó diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con respecto al resto de las cepas inoculadas.

2) En cuanto al diámetro del tallo, la cepa LMS489 presentó mayor diferencia con respecto al resto de las cepas inoculadas.

3) En lo referente a la altura del tallo, la cepa LMS486 mostró ser la mejor ($P \leq 0.05$) respecto al resto de los aislados.

4) En cuanto al largo de la raíz, la cepa LMS470 causó el mayor aumento, respecto al resto de los aislados (Cuadro 10).

En frijol, la cepa LMS488 indujo un mayor número de nódulos, con diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) respecto al resto. Esta cepa fue aislada de nódulos de alfalfa de Delicias, e identificada como *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*. El tamaño y color de los nódulos desarrollado por cada una de las cepas fue variable, destacando la cepa LMS481, aislada de suelo con cultivo de cacahuate en Delicias.

La inoculación en leguminosas, con rhizobia y bacterias promotoras del crecimiento vegetal, ha tenido una interacción positiva en el desarrollo radical de frijol y, en general, se favorece la nodulación y fijación de nitrógeno de las leguminosas (Aguirre-Medina *et al.*, 2005).

En frijol, la experiencia de inoculación ha tenido resultados muy variables, en general las bacterias introducidas son responsables de una proporción pequeña de los nódulos formados, debido a que el resto lo forman las cepas nativas.

Cuadro 10. Evaluación de parámetros de desarrollo en plantas de frijol inoculadas con las cepas seleccionadas, bajo condiciones de invernadero.

Cepa	Altura	Diámetro Tallo	Altura Tallo	Largo Raíz	No Nódulos	Tamaño de Nódulos
LMS469	43.33 bcd	0.40 b	20.00 de	19.00 cdef	48.67 cdefg	0.25 abcde
LMS470	54.33 abcd	0.28 bcd	34.33 abcd	28.67 a	35.67 defgh	0.30 abc
LMS471	41.00 bcd	0.37 bc	16.00 e	16.67 ef	35.67 defgh	0.25 abcde
LMS472	53.00 abcd	0.29 bcd	34.33 abcd	26.00 abc	60.67 bcde	0.30 abc
LMS473	41.00 bcd	0.40 b	20.00 de	16.67 ef	60.33 bcde	0.25 abcde
LMS474	53.00 abcd	0.28 bcd	35.00 abc	26.00 abc	44.33 cdefgh	0.30 abc
LMS475	37.67 cd	0.33 bcd	31.00 abcd	18.33 def	52.00 cdef	0.35 a
LMS476	36.00 d	0.23 cd	22.67 cde	19.00 cdef	17.33 gh	0.30 abc
LMS477	41.00 bcd	0.37 bc	16.00 e	16.67 ef	59.00 bcde	0.25 abcde
LMS478	53.00 abcd	0.28 bcd	34.33 abcd	26.00 abc	56.67 bcde	0.30 abc
LMS479	47.67 abcd	0.28 bcd	29.67 abcde	24.67 abcd	63.33 bcde	0.30 abc
LMS480	36.67 d	0.37 bc	29.00 abcde	18.00 def	53.67 bcdef	0.35 a
LMS481	43.00 bcd	0.33 bcd	27.00 abcde	19.00 cdef	49.00 cdefg	0.35 a
LMS482	37.67 cd	0.33 bcd	31.00 abcd	18.33 def	52.00 cdef	0.35 a
LMS483	47.33 abcd	0.33 bcd	37.67 ab	21.67 abcdef	61.33 bcde	0.35 a
LMS484	39.00 bcd	0.37 bc	34.00 abcd	20.33 bcdef	52.00 cdef	0.35 a
LMS485	42.33 bcd	0.40 b	36.33 abc	22.33 abcde	67.33 bcd	0.33 ab
LMS486	54.00 abcd	0.27 bcd	41.00 a	17.33 def	58.67 bcde	0.35 a
LMS487	39.00 bcd	0.37 bc	24.00 bcde	17.00 ef	17.60 gh	0.65 abc
LMS488	62.00 ab	0.28 bcd	32.33 abcd	27.00 ab	137.67 a	0.22 bcde
LMS489	42.33 bcd	0.67 a	29.67 abcde	20.67 bcdef	44.00 cdefgh	0.25 abcde
LMS490	40.33 bcd	0.30 bcd	26.67 abcde	16.67 ef	36.00 defgh	0.30 abc
LMS491	48.00 abcd	0.37 bc	26.67 abcde	16.67 ef	69.33 bc	0.15 e
LMS492	49.00 abcd	0.28 bcd	23.33 bcde	22.67 abcde	35.00 defgh	0.17 de
LMS493	43.33 bcd	0.27 bcd	36.67 abc	19.33 cdef	13.33 h	0.23 abcde
LMS494	40.00 bcd	0.20 d	34.00 abcd	21.33 abcdef	13.00 h	0.28 abcd
LMS495	55.00 abcd	0.38 bc	32.67 abcd	14.33 ef	34.00 efgh	0.15 e
LMS496	37.33 cd	0.33 bcd	24.33 bcde	19.33 cdef	32.33 efgh	0.20 cde
LMS497	70.00 a	0.37 bc	33.67 abcd	23.33 abcde	86.00 b	0.30 abc
LMS498	48.00 abcd	0.37 bc	20.00 de	16.67 ef	36.00 defgh	0.15 e
LMS499	60.33 abc	0.33 bcd	33.00 abcd	16.33 ef	23.00 egh	0.32 abc

a = Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En alfalfa sólo se midieron los parámetros de las plantas que presentaron presencia de nódulos, en las cuales se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) al evaluar las medidas de altura (Cuadro 11). Las plantas inoculadas con las cepas LMS473 y LMS499 presentaron mayor altura respecto al resto de las cepas inoculadas. En cuanto al diámetro del tallo, no se encontró diferencia significativa. En el largo de la raíz, las plantas inoculadas con las cepas LMS496, LMS497 y LMS498

presentaron los valores más altos. Por otra parte, al estimar la capacidad de nodulación en alfalfa, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$) con la cepa LMS499, aislada de suelo rizosférico de manzano (Casas Grandes), que presentó mayor cantidad de nódulos respecto a todas las cepas inoculadas. En cuanto al tamaño de nódulo se encontró diferencia estadísticamente significativa en las cepas LMS488 y LMS491 con respecto a las demás cepas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Evaluación de parámetros de desarrollo en plantas de alfalfa inoculadas con las cepas seleccionadas, bajo condiciones de invernadero.

Cepa	Origen de las cepas	Altura	Diámetro Tallo	Largo Raíz	Número de Nódulos	Tamaño de Nódulos
LMS472	Suelo de Alfalfa	48.33 bc	0.30 a	15.67 abc	21.67 bcd	0.19 c
LMS473		52.33 a	0.30 a	16.33 ab	15.00 de	0.27 b
LMS478	Suelo de Algodón	41.00 cd	0.37 a	11.67 c	26.00 b	0.14 c
LMS479	Nódulo de Cacahuete	41.00 cd	0.37 a	11.67 c	24.00 b	0.30 ab
LMS485	Suelo de Chile	42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	24.33 b	0.33 ab
LMS488	Nódulo de Alfalfa	42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	14.67 e	0.33 a
LMS491		42.33 cd	0.30 a	12.33 bc	24.33 b	0.33 a
LMS496	Suelo de Durazno	39.00 d	0.33 a	18.33 a	25.00 b	0.18 c
LMS497	Suelo de Manzano	55.67 ab	0.33 a	16.67 a	23.00 bc	0.18 c
LMS498		53.33 ab	0.30 a	17.00 a	17.00 cde	0.18 c
LMS499		58.00 a	0.33 a	16.00 ab	58.00 a	0.18 c

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

En cuanto a materia seca total se encontró que en plantas de alfalfa y frijol la cepa LMS497 indujo mayor cantidad de materia seca, se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en esta cepa procedente de suelo de cultivo de manzano de la localidad de Casas Grandes (Cuadro 12) identificada como *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti* (Cuadro 7).

Al realizar la identificación molecular (Capítulo V) las principales especies identificadas que nodularon las variedades de frijol y alfalfa se identificaron como *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*, el cual no ha sido reportado como simbionte de frijol y alfalfa,

esto sugiere que el intercambio de material genético es una importante fuente de variación genética o que hay pérdida de especificidad bajo condiciones edafoclimáticas y de hospedero adversas.

Cuadro 12. Evaluación de peso seco de plantas de frijol y alfalfa inoculadas con las cepas, en invernadero.

Cepa	GENERO	Alfalfa	Frijol
LMS469	<i>Ensifer teranga</i>		4.21 bcde
LMS470	<i>Ensifer meliloti</i>		4.93 abcde
LMS471	<i>Rhizobium leguminosarum</i>		3.74 de
LMS472	<i>Ensifer meliloti</i>	4.71 abc	5.23 abcde
LMS473	<i>Ensifer meliloti</i>	5.14 ab	3.61 de
LMS474	<i>Rhizobium leguminosarum</i>		5.06 abcde
LMS475	<i>Rhizobium sp</i>		3.77 de
LMS476	<i>Ensifer sp</i>		3.39 e
LMS477	<i>Rhizobium sp</i>		3.91 de
LMS478	<i>Ensifer meliloti</i>	3.70 cd	5.11 abcde
LMS479	<i>Ensifer meliloti</i>	3.77 cd	4.67 bcde
LMS480	<i>Ensifer sp.</i>		3.84 de
LMS481	<i>Rhizobium etli</i>		4.33 bcde
LMS482	<i>Rhizobium etli</i>		3.91 de
LMS483	<i>Rhizobium sp</i>		4.57 bcde
LMS484	<i>Ensifer sp</i>		3.82 de
LMS485	<i>Ensifer meliloti</i>	4.09 bcd	4.32 bcde
LMS486	<i>Ensifer meliloti</i>		5.39 abcd
LMS487	<i>Ensifer etli</i>		3.95 de
LMS488	<i>Ensifer meliloti</i>	4.14 bcd	6.05 ab
LMS489	<i>Ensifer sp.</i>		4.11 cde
LMS490	<i>Ensifer sp.</i>		4.04 de
LMS491	<i>Ensifer sp.</i>	4.07 bcd	4.68 bcde
LMS492	<i>Rhizobium etli</i>		4.85 bcde
LMS493	<i>Rhizobium sp.</i>		4.50 bcde
LMS494	<i>Rhizobium etli</i>		3.90 de
LMS495	<i>Ensifer sp</i>		4.76 bcde
LMS496	<i>Rhizobium etli</i>	3.48 d	3.80 de
LMS497	<i>Ensifer meliloti</i>	5.43 a	6.80 a
LMS498	<i>Rhizobium sp</i>	5.05 ab	4.64 bcde
LMS499	<i>Rhizobium sp</i>	5.28 a	6.01 abc

Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Al realizar la identificación molecular (Capítulo V) las principales especies identificadas que nodularon las variedades de frijol y alfalfa se identificaron como *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*, el cual no ha sido reportado como simbionte de frijol y alfalfa, esto sugiere que el intercambio de material genético es una importante fuente de

variación genética o que hay pérdida de especificidad bajo condiciones edafoclimáticas y de hospedero adversas.

Los experimentos de divergencia de nódulos han revelado un mecanismo de control adicional, en el que los nódulos maduros suprimen el desarrollo de los estadios tempranos. En los nódulos se han detectado cuatro tipos de hormonas vegetales, auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico, en concentraciones superiores a las existentes en las raíces vecinas (Caba *et al.*, 2001).

Además de la actividad autorreguladora por parte de la planta para controlar el desarrollo de nódulos, hay factores que intervienen en el desarrollo de éstos, como es la concentración de metales en el medio, cuando falta molibdeno se forman más nódulos, pero son menos eficientes y su estructura se asemeja a la de los nódulos inactivos, la dificultad para la asimilación de molibdeno parece ser una de las principales limitaciones en la fijación del N₂, especialmente en los suelos ácidos (Burdman *et al.*, 2000; Aguirre-Medina y Kohashi-Shibata, 2002; Aguirre-Medina *et al.*, 2005).

En ensayos de campo han demostrado que la nodulación se reduce, aun cuando los suelos presenten buenos niveles de humedad, lo que indica que no sólo el agua es un factor determinante en la nodulación sino que también están involucrados otros factores bióticos y abióticos del suelo como el pH, arcillas, elementos químicos (nitrógeno, fósforo, azufre, etc.), materia orgánica, entre otros.

Durante este estudio se encontró que plantas inoculadas con las cepas procedentes de suelo de cultivo de manzano con pH 4.7 generaron el mayor número de nódulos radiculares, en comparación con el resto de las cepas. Sin embargo, debe resaltarse que el número de nódulos es resultado de cierta disponibilidad fisiológica-genética de la planta (Martínez-Scott *et al.*, 2002).

7.4.3 Estimación de la actividad reductora de acetileno

Los nódulos obtenidos en los ensayos de trampeo con plantas de frijol y alfalfa, y los nódulos encontrados tras la inoculación de los 31 aislados (Capítulo IV) e identificados en el capítulo V en plántulas de alfalfa y frijol se les estimó la actividad biológica de fijación de nitrógeno con la técnica de ARA (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004).

En los nódulos encontrados en los ensayos de trampeo se observó una actividad muy reducida, donde la mayor tasa de reducción de acetileno se estimó en nódulos obtenidos al inocular suelo del cultivo de manzano en semillas de frijol (Cuadro 13).

Cuadro 13. Actividad reductora de acetileno en nódulos obtenidos por trampeo

Localidad	Cultivo	Suelo Inoculado	ARA *
Ojinaga	Alfalfa	Alfalfa	0.25 c
		Algodón	0.36 c
		Cacahuate	0.22 c
	Cacahuate	Alfalfa	SN
		Algodón	SN
		Cacahuate	SN
	Frijol	Alfalfa	0.27 c
		Algodón	0.19 c
		Cacahuate	0.33 c
Delicias	Alfalfa	Alfalfa	SN
		Cacahuate	SN
		Papa	SN
		Chile	SN
	Cacahuate	Alfalfa	SN
		Cacahuate	0.08 c
		Papa	SN
		Chile	SN
	Frijol	Alfalfa	0.24 c
		Cacahuate	SN
		Papa	0.31 c
		Chile	SN
Casas Grandes	Alfalfa	Durazno	0.69 c
		Nogal	0.27 c
		Manzano	0.47 c
		Chile	0.17 c
	Cacahuate	Durazno	SN
		Nogal	SN
		Manzano	SN
		Chile	SN
	Frijol	Durazno	1.80 b
		Nogal	0.31 c
		Manzano	3.81 a
		Chile	0.28 c

* nmol C₂H₂/gr de nódulos x H SN=sin nódulos

a = Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, P≤ 0.05).

La actividad reductora de acetileno en nódulos de plantas de frijol y alfalfa fue reducida (Cuadro 14); sin embargo, se encontró una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la que sobresalió la actividad sobre plantas de frijol de las cepas LMS473 (procedente de suelo de alfalfa de Ojinaga) y LMS491 (procedente de nódulos de alfalfa de Delicias), mientras que en plantas de alfalfa la ARA fue mayor con la cepa LMS485 (procedente de suelo de chile de Delicias).

Cuadro 14. Actividad Reductora de Acetileno estimada en nódulos de frijol y alfalfa.

Localidad	Cepas	Genero	Frijol *	Alfalfa *
OJINAGA	LMS469	<i>Ensifer teranga</i>	0.70 g	SN
	LMS470	<i>Ensifer melloti</i>	0.37 g	SN
	LMS471	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	0.41 g	SN
	LMS472	<i>Ensifer melloti</i>	2.60 de	0.72 b
	LMS473	<i>Ensifer melloti</i>	5.16 a	0.78 b
	LMS474	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	3.12 bcd	SN
	LMS475	<i>Rhizobium sp</i>	0.86 fg	SN
	LMS476	<i>Ensifer sp</i>	0.80 fg	SN
	LMS477	<i>Rhizobium sp</i>	0.93 fg	SN
	LMS478	<i>Ensifer melloti</i>	3.46 bcd	0.49 b
	LMS479	<i>Ensifer melloti</i>	3.81 bc	1.18 b
DELICIAS	LMS480	<i>Ensifer sp.</i>	0.83 fg	SN
	LMS481	<i>Rhizobium etli</i>	4.10 ab	SN
	LMS482	<i>Rhizobium etli</i>	0.46 g	SN
	LMS483	<i>Rhizobium sp</i>	3.94 bc	0.73 b
	LMS484	<i>Ensifer sp</i>	0.12 g	SN
	LMS485	<i>Ensifer melloti</i>	0.16 g	3.35 a
	LMS486	<i>Ensifer melloti</i>	0.12 g	SN
	LMS487	<i>Ensifer etli</i>	0.51 g	SN
	LMS488	<i>Ensifer melloti</i>	3.44 bcd	0.63 b
	LMS489	<i>Ensifer sp.</i>	0.71 g	0.68 b
	LMS490	<i>Ensifer sp.</i>	0.38 g	SN
	LMS491	<i>Ensifer sp.</i>	5.14 a	1.06 b
	LMS492	<i>Rhizobium etli</i>	1.81 ef	0.93 b
CASAS GRANDES	LMS493	<i>Rhizobium sp.</i>	0.70 g	SN
	LMS494	<i>Rhizobium etli</i>	0.59 g	SN
	LMS495	<i>Ensifer sp</i>	0.56 g	SN
	LMS496	<i>Rhizobium etli</i>	0.22 g	0.94 b
	LMS497	<i>Ensifer melloti</i>	3.32 bcd	0.91 b
	LMS498	<i>Rhizobium sp</i>	3.03 cd	0.69 b
	LMS499	<i>Rhizobium sp</i>	0.20 g	0.49 b

* nmol C₂H₂/gr de nódulos x H SN=sin nódulos

a = Letras iguales dentro de la misma columna no tienen diferencias estadísticas (Tukey, $P \leq 0.05$).

La nodulación de las leguminosas se ve influida por factores tanto ambientales como genéticos de ambos simbioses, y la cantidad de nódulos, tamaño y momento de aparición, son caracteres que dependen de la planta o de la bacteria (Punos e Iglesias, 2005). La fijación biológica de nitrógeno en las leguminosas contribuye significativamente a la nutrición nitrogenada y productividad de los terrenos. Por ello, es esencial implementar metodologías apropiadas para su evaluación (Campillo, 2003).

La técnica de reducción del acetileno (Álvarez-Solís y Anzueto-Martínez, 2004), que ha probado ser útil para detectar sistemas de fijación de N₂, también tiene limitaciones debido a que mide la actividad de la enzima nitrogenasa de manera puntual y en un corto período de tiempo, por lo que los resultados obtenidos durante este trabajo nos dan una estimación parcial de la FBN que presenta nuestro sistema rizobia-leguminosa.

La limitación en la actividad fijadora de nitrógeno de nuestras cepas se relaciona con variaciones de la difusión de oxígeno en los nódulos; así como una menor disponibilidad de este elemento, tendría como consecuencia una limitación en la capacidad de generar ATP por parte de los bacteroides, que serían incapaces de mantener la actividad nitrogenasa. La capacidad, por parte de los nódulos, de regular el intercambio gaseoso, a través de la llamada barrera de difusión de oxígeno, ha contribuido al fortalecimiento de dicha hipótesis (Peng *et al.*, 2002). Debido a que la fijación de nitrógeno está relacionada al estadio fisiológico de la planta huésped, así como a las condiciones edafoclimáticas, de manera que aunque nuestras cepas en estudio sean altamente efectivas, competitivas y persistentes, su capacidad de fijación de nitrógeno esta limitada por diversos factores (Willems *et al.*, 2006).

El nitrógeno como fertilizante químico inhibe la formación de los nódulos y la fijación de nitrógeno cuando se aplica a plantas inoculadas. Esta diversidad brinda a las plantas múltiples oportunidades para ser noduladas por cepas de rizobia eficaces en su nodulación, y eficientes en la fijación de nitrógeno (Villegas y Munive, 2005).

La obtención de cepas bacterianas, con potencial para su utilización como fertilizantes biológicos, es una alternativa que forma parte de las estrategias de la agricultura sustentable, contribuyendo al incremento en la rentabilidad y productividad de los cultivos, sin el deterioro de los recursos naturales.

7.5 CONCLUSIONES

En el color de los nódulos en plantas de alfalfa y frijol era indicativo de que los nódulos no estaban activos, debido a que la coloración no corresponde a un nódulo activo, ya que la característica coloración rojiza es debido a la presencia de la proteína leghemoglobina.

Los 31 aislados se evaluaron en semillas de alfalfa y frijol presentando respuestas diferentes en cada uno de los parámetros evaluados, en plantas de frijol sobresaliendo las cepas LMS497, LMS489, LMS486, LMS470, LMS488, y en plantas de alfalfa sobresalieron las cepas LMS473 y LMS499, LMS496, LMS497 y LMS498.

Al estimar la capacidad de nodulación en alfalfa, se encontró diferencia significativa con la cepa LMS499, aislada de suelo rizosférico de manzano (Casas Grandes),

En cuanto al tamaño de nódulo se encontró diferencia estadísticamente significativa en las cepas LMS488 y LMS491 con respecto a las demás cepas.

En materia seca total se encontró que, en plantas de alfalfa y frijol, la cepa LMS497 indujo mayor cantidad de materia seca, cepa procedente de suelo de cultivo de manzano de la localidad de Casas Grandes identificada como *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*.

Estos resultados en plantas de frijol y alfalfa muestran que la respuesta a la inoculación fue diferente, observando que una sola cepa no sobresalió en todos los parámetros evaluados.

Los ensayos de nodulación en invernadero permitieron evaluar el potencial biotecnológico de cepas fijadoras de nitrógeno presentes en terrenos agrícolas del estado de Chihuahua. Al poner de manifiesto las diversas respuestas de la planta a la inoculación con las cepas ensayadas.

Se hace evidente la necesidad de considerar la inoculación mixta, con el fin de promover el desarrollo de los cultivos agrícolas bajo diferentes condiciones edáficas y ambientales.

El aislamiento de cepas identificadas como *Ensifer meliloti* a partir de nódulos de cacahuate, y con capacidad de nodular frijol, lleva a considerar la transferencia lateral de material genético, o la pérdida de especificidad simbiótica, como una herramienta de adaptación para la sobrevivencia de las poblaciones bacterianas en ausencia de su

hospedero original. Aunque el número de nódulos radiculares obtenidos fue bajo, resalta el hecho de que fueron los de mayor tamaño y dieron resultados positivos en la reacción de reducción de acetileno.

En los nódulos encontrados en los ensayos de trampeo se observó una actividad muy reducida, donde la mayor tasa de reducción de acetileno se estimó en nódulos obtenidos al inocular suelo del cultivo de manzano en semillas de frijol.

La actividad reductora de acetileno en nódulos de plantas de frijol y alfalfa fue reducida, las cepas que sobresalieron en plantas de frijol fueron LMS473 y en plantas de alfalfa la ARA fue mayor con la cepa LMS485.

La nodulación de las leguminosas se ve influida por factores tanto ambientales como genéticos propios de ambos simbioses, y la cantidad de nódulos, tamaño y momento de aparición, entre otros, son caracteres que dependen de la planta o de la bacteria.

Es importante evaluar la capacidad de competencia que presentan nuestros aislados en un medio natural en el que se encuentran otras cepas rizosféricas que afectan (positiva/negativamente) las interacciones entre microorganismos y plantas, debido a la actividad de fijación de Nitrógeno que presentaron nuestros aislados.

CAPITULO VIII

ESTRATEGIAS DE DESARROLLO AGRÍCOLA

8.1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El *concepto de estrategia*, es semánticamente rico y lleno de sentidos, no hay una definición universalmente aceptada; sin embargo, ha sido usado en diversos campos del quehacer humano. Su importancia, en relación con este trabajo, radica, de acuerdo con Mintzberg (1988) en todos los casos en que se aplica, es que el concepto refiere a una manera de *cómo* se resolverían los problemas o se alcanzaría un objetivo; en este sentido, las estrategias se diseñan para el futuro, tienen un profundo sentido metodológico y aplicado, están respaldadas por una filosofía y contienen un sentido político. En el terreno de las ciencias agrícolas, el concepto es utilizado como guía de acciones y decisiones, por vez primera, en el Plan Puebla (Aguirre-Medina, 2006); para el mismo autor (1992) el propósito de la estrategia es proveer un mapa de la realidad, lo suficientemente preciso a fin de que quien la instrumente pueda efectuar cambios en el sistema. El marco conceptual del desarrollo sustentable presenta varias aproximaciones en función del enfoque disciplinario que la aborda. De este modo, para algunos lo importante es el uso de los recursos naturales renovables, de tal suerte que no los agote o degrade y devenga una reducción real de su utilidad renovable para las generaciones futuras, manteniendo constante los inventarios de recursos naturales.

Una estrategia de desarrollo sustentable está constituida por diversas facetas/alternativas, una de las cuales es la sustitución de fertilizantes químicos, ello debido a que uno de los problemas fundamentales que enfrenta la humanidad es la producción de alimentos, la cual se basa en la aplicación de agroquímicos, mismo que se requiere cada vez en cantidades mayores. En el caso de los fertilizantes su uso masivo ha generado diversos problemas; por ejemplo, la contaminación de los suelos, de los mantos acuíferos y cuerpos de agua. Ante esta situación se realizan esfuerzos por conocer los sistemas biológicos y poder modificar las prácticas agrícolas lo suficiente para que sea la fijación biológica de nitrógeno la que reemplace al nitrógeno extraído del suelo por los cultivos, y reducir o evitar la aplicación de agroquímicos, específicamente la aplicación de fertilizantes, realizando actividades como la aplicación de productos seguros para mejorar la composición del suelo, barbechar para oxigenar

el suelo, rastrear para eliminar terrones, nivelar el terreno y formar camas o surcos para un buen sistema de riego, drenaje y evitar inundaciones; éstas son parte de las buenas prácticas agrícolas que permiten el uso sustentable del suelo, el agua y la vegetación. Para evitar la erosión del suelo, sirven como filtros restringiendo sedimentos, agentes patógenos y contaminantes, inducir la captación, almacenamiento y mejor aprovechamiento del agua de lluvia, y para mejorar la cobertura vegetal, controlar la erosión cuando las plantas de cultivos principales no proporcionan suficiente cobertura y añadir materia orgánica al suelo para prevenir la pérdida de nutrientes.

Además del nitrógeno, el desarrollo de las plantas está determinado en buena parte por los microorganismos con los que éstas se asocian.

Uno de los objetivos de la investigación en fijación de nitrógeno es sustituir fertilizantes químicos por inoculantes biológicos. Para esto es necesario obtener cepas bacterianas con esta capacidad, aisladas de las plantas de interés, de la rizósfera o de nódulos de plantas leguminosas. La búsqueda y el aislamiento de microorganismos benéficos se requieren como la base para la producción de inoculantes bacterianos que estimulen la producción de cultivos agrícolas.

El determinar por qué las inoculaciones funcionan en ciertas ocasiones y en otras fallan requiere más investigación, debido a que existen múltiples factores que influyen para que la inoculación de microorganismos tenga éxito, tales como la estructura física y química, y la actividad biológica del suelo que son fundamentales para sostener la productividad agrícola y de ellas depende, en su complejidad, la fertilidad del suelo. La pérdida de suelo, nutrientes y sustancias agroquímicas son en parte consecuencia de la erosión, así como de escurrimientos y la lixiviación en la superficie o en las aguas subterráneas. Esas pérdidas se deben a una gestión ineficiente e insostenible de estos recursos, además de que sus nocivos efectos pueden desbordarse. Se busca mejorar la actividad biológica del suelo y proteger la vegetación natural circundante, los beneficios biológicos del control de hierbas a través de diversos sistemas como la competencia, mecánicos, biológicos y la aplicación de herbicidas; para reducir al mínimo las enfermedades utilizará cultivos que no las padezcan y, donde sea conveniente, se incluirán legumbres para proporcionar una fuente biológica de nitrógeno; la aplicación en forma equilibrada de fertilizantes orgánicos e inorgánicos,

con métodos y equipo apropiados, y con los intervalos convenientes para sustituir los nutrientes recogidos con la cosecha o perdidos durante la producción, así como intensificar al máximo los beneficios para el suelo y la estabilidad de los nutrientes reciclando los cultivos y otros residuos orgánicos. El uso mínimo de sustancias agroquímicas para combatir la mala hierba, las plagas y las enfermedades de conformidad con los principios del manejo integrado de plagas. Toda medida de protección de los cultivos, pero en particular las que requieren utilizar sustancias nocivas para las personas y el medio ambiente, sólo se deben realizar con pleno conocimiento y el equipo correcto.

El impacto ecológico en la producción agrícola es cada vez más importante en los sistemas de producción a nivel mundial y el uso de productos amigables con el medio ambiente, resulta imprescindible para preservar y mantener los recursos naturales, pero además son un factor clave para elevar la rentabilidad en la producción agrícola.

En los estados del norte del país, en particular en Chihuahua, se ha observado que el exceso de agroquímicos en la producción de cultivos agrícolas, ha ocasionado una ecología no saludable, por lo que esta zona del país requiere atención (Hernández-Rodríguez, 2010).

La utilización de los recursos microbiológicos del suelo en los sistemas agrícolas es una realidad y alternativa eficiente para reducir el uso de fertilizantes químicos en los sistemas de producción, principalmente los fertilizantes químicos, de manera que se permita el mantenimiento de la estructura física y química del suelo así como de su balance biológico. Por ello, el uso de bacterias del grupo rhizobia en los sistemas productivos es una alternativa viable para consolidar un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible.

Actualmente la aplicación de nueva tecnología está orientada hacia reestructurar y mejorar lo deteriorado de los recursos naturales sin dejar de producir eficientemente alimentos básicos para el consumo humano y animal.

La utilización de fertilizantes biológicos permiten la reducción de costos de producción en los cultivos agrícolas de manera sustancial y un aumento del rendimiento por hectárea, factores indispensables para enfrentar la competitividad que impone la apertura comercial, se logra un ahorro del orden del 40 al 50% del costo por hectárea,

en relación a lo utilizado tradicionalmente con fertilizantes químicos. Por otra parte, esta práctica frena el deterioro de los suelos, así como la contaminación y destrucción de los recursos naturales.

Durante varios años, en diversos Campos Experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) se ha investigado sobre el uso de bacterias y hongos micorrizicos que se emplean como biofertilizante en diversos cultivos, proporcionando beneficios. Por lo que en los años de 1999 y 2000 se incorporó al Programa de Alianza para el Campo, utilizándose en una superficie mayor a los dos millones de hectáreas, prácticamente en todos los estados del país y en diversos cultivos, aunque de manera preponderante en granos básicos. Los resultados obtenidos, de acuerdo al INIFAP, fueron ampliamente satisfactorios en términos productivos y, sobre todo, en cuanto a la disminución de costos de producción (Aguirre-Medina, 2006).

Los incrementos en rendimiento se estimaron en el orden del 20 al 30% y la disminución de los costos por aplicación de fertilizante químico, se estima del orden del 20-50%, pero generando un ahorro adicional en conceptos de fletes, maniobras y aplicación, que se evitan en elevada proporción con la aplicación de los biofertilizantes. Numerosas investigaciones corroboran que el uso de bacterias y hongos micorrizicos en diferentes cultivos incrementa significativamente el rendimiento de grano y/o fruto por unidad de superficie, por lo que la producción de inoculo para la elaboración de biofertilizantes incrementaría la productividad agrícola en México.

Es importante conocer la situación que guardan los trabajos de investigación en torno a los biofertilizantes que desde hace más de una década vienen realizándose en instituciones como el INIFAP, UNAM y la BUAP, dado que la función de estas instituciones no es la difusión, producción, ni comercialización de biofertilizante en el ámbito nacional.

El estudio se efectuó en suelo de cultivo de comunidades menonitas y mormones de 3 localidades del estado de Chihuahua, encontrando que en ambas comunidades conservan sus tradiciones, aunque son comunidades que aceptan la aportación de tecnología para el mejoramiento de sus cosechas. Ello, ya que cuentan con una visión integrada de proyecto a corto, mediano y largo plazo.

8.2 Identificación del problema y oportunidades

La pérdida indirecta e inevitable de fertilizantes antes descrita se traduce en una sangría económica para el agricultor; sin embargo, el daño va más allá del aspecto financiero. El resultado final para el ambiente es su contaminación, tanto de la atmósfera, por el incremento potencial que el N₂O pueda tener sobre el efecto invernadero como en el adelgazamiento de la capa atmosférica de ozono (Bohlool *et al.*, 1992), y contaminación de los cuerpos de agua debido a la eutroficación en los embalses y lagunas causada por el aumento en la concentración del nitrógeno combinado.

Como alternativa al problema referido se encuentran poblaciones microbianas que cuentan con actividades importantes, como la fijación biológica del nitrógeno y la producción de sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas, así como la producción de sustancias benéficas contra algunos patógenos (Burdman *et al.*, 2000; Lynch, 1990). El uso potencial de los fijadores de N₂ en la agricultura y bacterias productoras de fitohormonas ha conducido a evaluar las especies rizosféricas que contribuyen en el incremento del rendimiento de los cultivos de importancia agrícola. Las diferentes actividades de las bacterias del suelo que se asocian naturalmente con las plantas traen como consecuencia para el vegetal efectos tales como la estimulación del crecimiento y promoción en la absorción de nutrientes (Okon *et al.*, 1988; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000) y una mayor acumulación de biomasa (Michielis *et al.*, 1989; Burdman *et al.*, 2000) que se traduce en mayores rendimientos del cultivo.

8.2.1 Problemas

- Los productores de las zonas del estudio presentan problemas en cuanto a altos costos en producción.
- Se ha registrado utilización excesiva de fertilizantes químicos debido a la baja fertilidad de los suelos, sin embargo, se obtienen rendimientos bajos.
- Hasta ahora hay bajo o nulo uso de fertilizantes biológicos.
- Se hace un manejo tecnológico inadecuado en sus cultivos, debido al exceso de labranza intensiva (Cuadro 15).

8.2.2 Oportunidades

- El interés de las comunidades menonitas y mormones por la utilización de alternativas naturales que beneficie sus cultivos.
- El estudio de bacterias obtenidas de estas regiones de condiciones muy extremas nos da la oportunidad de obtener bacterias con mayor potencial biofertilizante.
- El uso y manejo de los biofertilizantes se adaptan a las condiciones físicas y socioeconómicas de las regiones en estudio (Cuadro 15).

8.2.3 Problemática

La producción de alimentos es una de las prioridades en México y en el ámbito mundial. La demanda de alimentos continúa con el aumento de la población y se requiere generación de tecnología para incrementar al máximo el rendimiento de la producción.

En contrapunto, el exceso de los fertilizantes inorgánicos y su uso indiscriminado en la producción, específicamente en la superficie de riego, ha ocasionado la contaminación del agua con niveles de nitratos en ocasiones superiores a 50 mg kg^{-1} , en mantos freáticos, ríos y lagos. La problemática situación en lugar de disminuir tiende a incrementarse con el aumento en el uso de agroquímicos, debido a que la falta de alimentos obliga a incrementar los rendimientos por unidad de superficie.

Si consideramos que para el año 2020 será una población 7.7 billones y requerimos producir 2,500 millones de toneladas de alimentos, y con las prácticas agrícolas actuales se producen 23 toneladas de grano por tonelada de fertilizante nitrogenado. Esta producción de alimento requerirá de 108 millones de toneladas de fertilizante, incrementando el uso de combustible fósil y los costos de producción y por consecuencia un aumento en la contaminación ambiental, debido a que los fertilizantes cuando son usados inadecuadamente, generan contaminación por volatilización y lixiviación.

El uso y la aplicación de los fertilizantes químicos han caído en el abuso, principalmente por la demanda tan grande de alimentos que se tiene hoy en día, incluso la falta de investigación para el uso adecuado de los fertilizantes aplicados a cada cultivo. La producción de cultivos orgánicos en México, se ha dirigido hacia las hortalizas, ya que

éstas tienen mayor demanda y consumo, sobre todo a nivel internacional (Bernal y Urias, 1991), por tal motivo es necesaria la aplicación adecuada y en forma eficiente de los fertilizantes.

8.2.4 Análisis de las alternativas de solución

La aplicación de biofertilizantes en las áreas menos favorecidas, representa una oportunidad para incrementar la producción y productividad de los cultivos a bajo costo, sin la contaminación de los mantos freáticos y a la vez permite la conservación de los recursos naturales (Aguirre, 2004).

Se pretende establecer un vínculo más directo entre el sector productivo y la nueva opción tecnológica que se les presenta. Esto permitirá mostrar las ventajas y eficiencias en el desarrollo vegetal (aéreo y radical) y reproductivo de los cultivos biofertilizados, en comparación con los diferentes testigos seleccionados por los investigadores, que pueden ser la reducción de la fertilización química o la suspensión total de la misma (Aguirre *et al.*, 2004).

Una de las mayores contribuciones benéficas de los microorganismos del suelo a las plantas es el abastecimiento de nutrientes esencial para su crecimiento. Microorganismos involucrados en los ciclos de nitrógeno y fósforo, nutrimentos que comúnmente son deficientes en el suelo y limitan el desarrollo de las plantas, participan mediante la interacción que se establece con las raíces de las plantas y otros tejidos vegetales para facilitar la movilización y biodisponibilidad de estos elementos.

El uso de biofertilizantes a base de microorganismos aislados de diversos cultivos y condiciones edafoclimáticas con gran competitividad permitirá validar esta tecnología para su aplicación en diversos sistemas agrícolas, mejorando la generación de los cultivos en México, para contribuir en la reducción de los costos de producción y la contaminación del suelo y el agua (Cuadro 15).

Es importante la obtención de estos microorganismos para su aplicación como biofertilizantes, tecnología benéfica para los cultivos, los cuales se podrían utilizar en Chihuahua, como parte de un programa de apoyo para el productor, con la colaboración de instituciones de enseñanza superior e investigación que participen en el campo y que constituya una alianza para trabajar en el medio rural.

Así mismo, la asociación, intercalado y rotación de cultivos pueden permitir la reducción en la utilización de fertilizantes, sin abatir los nutrimentos del suelo, o bien ser útiles como aportación de abono verde al suelo, lo que puede mejorar la fertilidad del mismo (Sandoval, 1997).

Se considera que el desarrollo agrícola requiere y produce vastos y numerosos cambios en el comportamiento humano, no sólo en los cultivos y el ganado, sino que estos se presentan también en los agricultores. Ellos absorben nuevo conocimiento, aprenden nuevas habilidades y llegan a ser parte integral de la ciudadanía de una nación, el desarrollo agrícola requiere de cambios en la conducta de los legisladores y en la de los ciudadanos de un país (Martínez, 1993).

Volcke y Sepúlveda, mencionan que considerando al hombre en colectivo, como grupo social en condiciones económicas y productivas similares, que sólo en la medida que tenga capacidad de reflexión y poder de decisión y acción sobre su problemática, podrá ser centro y gestor de su propio desarrollo (Volcke y Sepúlveda, 1987).

8.3 Objetivos para la producción de biofertilizantes

El punto central de este trabajo es generar tecnología de producción para los cultivos del estado de Chihuahua, en materia de biofertilizantes, buscando incrementar la rentabilidad de los cultivos en la región, así como la sostenibilidad de los recursos naturales mediante el uso de tecnología amigable con el medio ambiente.

Con el objeto de producir biofertilizantes económicamente viables y ecológicamente racionales que puedan ser utilizados en todos los agroecosistemas de México elevando sustancialmente la productividad, pues se obtienen ahorros del orden del 50% en los costos de fertilización.

Los objetivos primarios son:

- Fomentar y fortalecer el desarrollo de Agricultura, con el uso de productos sustentables como los biofertilizantes, buscando mayor rentabilidad de la agricultura y sustentabilidad de la misma en el largo plazo.
- Aislar y seleccionar cepas con mayor potencial de diferentes condiciones edafoclimáticas.

- Utilizar cepas desarrolladas por las instituciones con las que se tenga establecido convenio de colaboración.
- Transferir las nuevas tecnologías a la producción agrícola para que los productores se incorporen al desarrollo de una agricultura sustentable.
- Reducir los costos de producción de los agricultores en los cultivos agrícolas.
- Fortalecer el desarrollo de la recuperación a largo plazo de la calidad de nuestros suelos ante el desgaste sufrido por el uso de fertilizantes químicos.
- Promover una agricultura de mayor sustentabilidad, donde los fertilizantes biológicos sean un complemento de los químicos.

8.3.1 Objetivo técnico

- Aislar cepas bacterianas a partir de la rizósfera y del ambiente endófito de las principales variedades de los cultivos más utilizados en Chihuahua.
- Seleccionar cepas bacterianas bajo condiciones de invernadero y campo.
- Evaluar las cepas seleccionadas en invernadero y campo, para probar su eficiencia en diferentes regiones ecológicas y manejo de los cultivos.

8.3.2 Metas

- Seleccionar las mejores cepas que promuevan el crecimiento de las principales variedades de cultivos.
- Disponer de cepas bacterianas para ser empleadas en la fabricación industrial de biofertilizantes.
- Encontrar cepas que permitan reducir la aplicación de fertilizante mineral en por lo menos 50%.
- Ofertar cursos de capacitación a productores y técnicos, estableciendo un programa anual de capacitación en Agricultura Sustentable.
- Ofertar biofertilizantes de alta calidad y a precios competitivos con el mercado Nacional, contando con un Laboratorio para control de la calidad de los biofertilizantes.
- Con esta biotecnología se plantea reducir los costos en la producción de los cultivos agrícolas y superar el rendimiento de su producción.

- Brindar asistencia técnica para la producción, con paquetes tecnológicos competitivos.
- Actuar en forma conjunta con organizaciones de productores.
- En cuanto a la articulación investigación científica–productiva: Establecer alianzas estratégicas con C. P., I. P. N., para intercambio de tecnología y cepas.

8.4 Estrategias en el uso de microorganismos como biofertilizantes

En México, usando como estrategia la selección de cepas bacterianas aisladas de la rizósfera y rizoplano de los cultivos más importantes del estado de Chihuahua, se logrará incrementar el rendimiento de los mismos, reduciendo el 50% de la dosis de fertilizantes aplicados comercialmente a estos cultivos inoculados con cepas bacterianas seleccionadas por su capacidad para promover el crecimiento de las plantas.

Un ambicioso programa de inoculación con *Azospirillum* fue desarrollado por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-SAGAR) en colaboración con el Centro de Investigación sobre Fijación Biológica de Nitrógeno (CIFN-UNAM). Los resultados en el año 1999 mostraron efectos positivos en el 75% de las evaluaciones (170 parcelas, equivalente a cerca de 600 ha), con incrementos promedio del 26% en el rendimiento de maíz, sorgo, trigo y cebada. A pesar de los buenos resultados obtenidos es claro que existen algunos factores que impiden que el éxito de la inoculación sea mayor. Entre los factores conocidos que influyen en las interacciones benéficas planta-bacteria se encuentran las características del suelo (pH, materia orgánica, etc.), de la bacteria y la variedad de la planta y los niveles de fertilización utilizados en los cultivos. Es importante considerar el manejo de los biofertilizantes al momento de la inoculación, luz, humedad, hora de aplicación, entre otros factores.

El conocimiento de la diversidad microbiana puede ayudar a definir sistemas de reforestación o rehabilitación de zonas perturbadas puesto que, como se ha dicho, los microorganismos ayudan directamente al desarrollo de las plantas por su aporte nutricional, o bien mejorando las características del suelo mediante una mejor

agregación de partículas, incrementando la retención de suelo, la porosidad, la retención de agua y el control de la erosión.

El estudio de la diversidad microbiana no puede llevarse a cabo sin establecer colecciones de microorganismos que se consideren relevantes en una amplia gama de actividades biológicas y, en este sentido, falta aún mucho por hacer. Así mismo es necesario correlacionar las actividades de los microorganismos con las plantas con las que se asocian y conservar dichos sistemas biológicos.

Se debe considerar:

1. Estudiar la distribución y diversidad de los microorganismos nativos.
2. Conocer el efecto de la biodiversidad en los sistemas productivos.
3. Utilizar los conocimientos sobre la diversidad biológica en sistemas de producción sustentable.
4. Conservar los microorganismos en colecciones o en hábitats naturales.

8.5 Resultados esperados

Con esta tecnología (Biofertilizantes) se plantea reducir los costos en la producción de los cultivos agrícolas y superar el rendimiento de producción.

Debido a que la constante renovación de los procesos tecnológicos ha modificado la concepción de la formación de recursos, considerando como una componente central y estratégica dentro de los procesos de asimilación, adaptación, innovación, desarrollo y transferencia de tecnología, mostrando la necesidad de una formación y educación a lo largo de toda la vida activa de una comunidad. Es decir, un proceso de formación permanente que le permita relacionarse con una tecnología en cambios progresivos basada en los avances de la ciencia y la técnica.

Por otra parte, a veces el acceso a los biofertilizantes es muchas veces limitado para los más necesitados y rezagados, están casi excluidas de las ofertas formativas, principalmente los que se desenvuelven en el sector agrícola informal, por no disponerse en cantidad y eficacia de suficientes instrumentos y recursos para generar, difundir y utilizar el conocimiento que necesitarían para acortar la brecha entre la cantidad y calidad de sus conocimientos y los que potencialmente existen y requieren

para lograr un impacto tecnológico y económico que modifique las condiciones agrícolas y socioeconómicas.

- Lograr la aceptación pública. Esta aceptación debe emerger de un proceso en el cual se reconozcan derechos, se acepten riesgos y se garanticen los derechos de los grupos más vulnerables.
- Análisis exhaustivo de alternativas. El uso de biofertilizantes es una alternativa más económica, aceptable socialmente y menos problemática para el medio ambiente.
- Revisión de biofertilizantes existentes. Existen muchas oportunidades para lograr un uso más intensivo de microorganismos, ya construidas o bien en donde las reglas de operación pueden modificarse para lograr una operación acorde con las necesidades actuales.
- Sustentabilidad del medio ambiente. Los ríos, cuencas y ecosistemas acuáticos son los motores biológicos del planeta, son la base de vida de las comunidades. Entender estos procesos y lograr minimizar los impactos ecológicos debe formar parte integral del desarrollo de los proyectos e incorporarse desde su inicio al proceso de decisión que permita su manejo en los cultivos.
- Asegurar el cumplimiento de los compromisos. Es indispensable que los gobiernos, empresas y grupos de interés cumplan efectivamente con las normas, reglamentos y compromisos alcanzados para la aceptación de biofertilizantes. Esto requiere un profundo cambio en las instituciones que deben velar por la salvaguarda de estos principios y el marco jurídico vigente.
- Todas estas recomendaciones llaman a la reflexión y, aún con su carácter general y un tanto cuanto utópico, van a ir permeando paulatinamente en los organismos internacionales y los grupos no gubernamentales y ecologistas, de tal forma que es indispensable tomarlos en cuenta seriamente en las decisiones, o bien pagar las consecuencias en un futuro ya muy cercano.

8.5.1 Obtención de cepas altamente potenciales

- Aislar cepas de alto potencial en cultivos agrícolas.
- Evaluar el grado de efectividad de estas cepas en invernadero.
- Evaluar el grado de efectividad de estas cepas en campo.
- Generar biofertilizantes en diferentes presentaciones.
 - Sólido: Utilizando peat moss, bagazo de caña, cáscara de café, bagazo de maguey.
 - Compostas (residuos orgánicos vegetales y animales, libres de iones tóxicos y patógenos).
 - Líquido: ácidos húmicos, ácidos fulvicos, ácidos carboxílicos, humus y extractos vegetales cuando la materia orgánica sea vegetal.
- Monitorear el control de calidad.
 - Monitorear del control de calidad a lo largo del proceso y del producto terminado.
- Capacitar de manera continua a técnicos de campo del Programa Alimentario.
- Editar una ubicación Especial sobre el Impacto Productivo de la tecnología evaluada.
- Informar de los resultados del estudio.
- Informar del estado nutrimental de los suelos a nivel general de las regiones seleccionadas, con un programa de manejo de los mismos

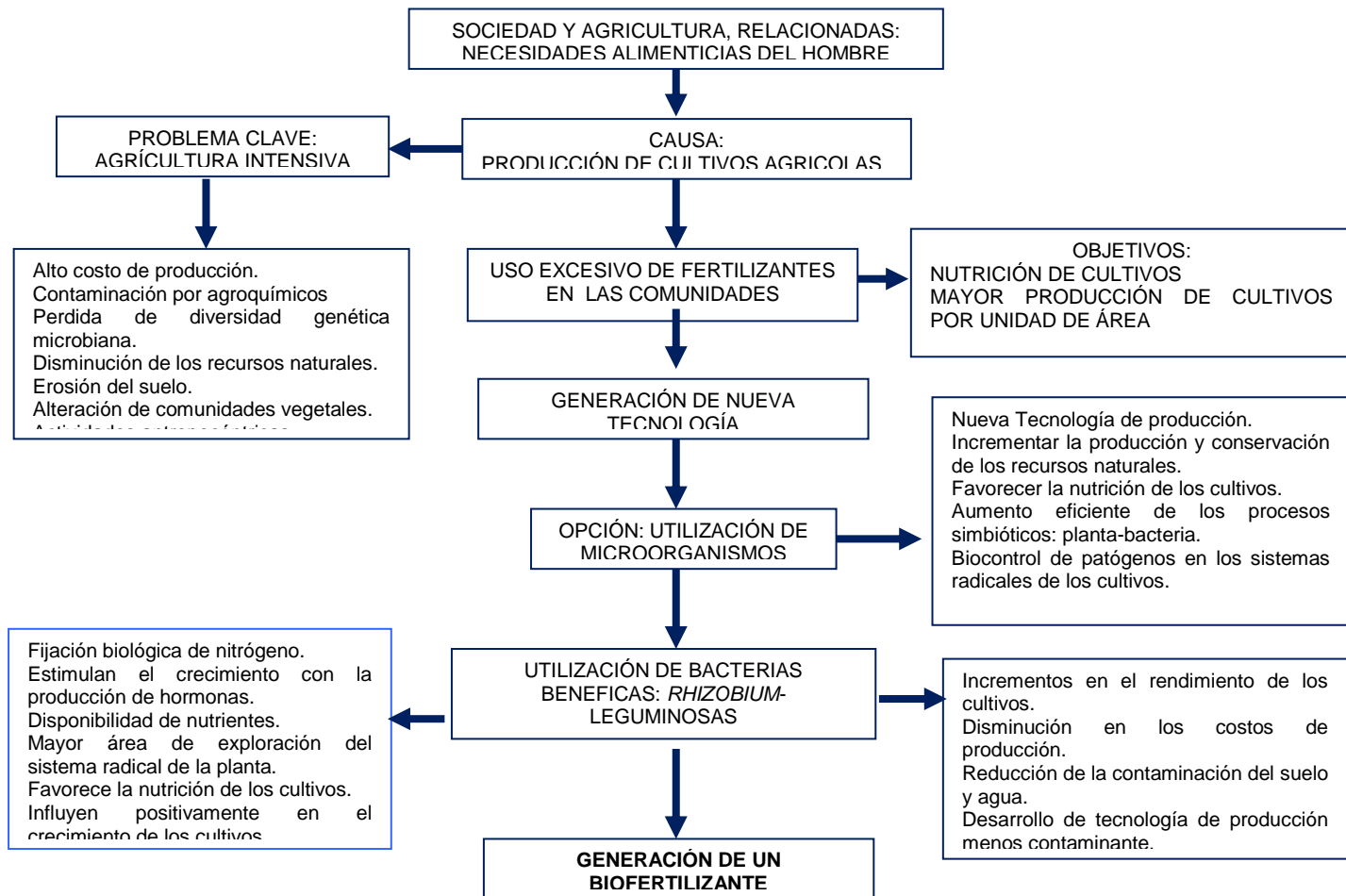
8.6 Aplicaciones estratégicas

El hecho de conocer el grado actual de desarrollo en las tres localidades permite diseñar la estrategia rebasando acciones que corresponden a fases de un grado bajo de desarrollo agrícola (Cuadro 15, 16 y 17), como lo podrían ser:

- Estas comunidades a través de la empresa Bio Sayta S. A. de C. V. les interesa la asesoría e investigación tecnológica en sus cultivos.
- Introducción de biotecnología productiva.
- Asesorías para mejorar la organización primaria de los agricultores.
- Estimular el incremento del ingreso.
- Proponer acciones tendientes a incrementar la producción y productividad agropecuaria sobre la base positiva que existe en el plano económico.

- Creación de microempresas para la producción de biofertilizantes.
- Evaluar el impacto productivo de los biofertilizantes en las localidades en estudio.
- Validar la adaptación y producción de los cultivos más importantes, con el uso de las cepas seleccionadas.
- Evaluar la rentabilidad de los cultivos producidos con biofertilizante en comparación con cultivos con fertilizante químico, mediante el uso de los biofertilizantes (cepas nuevas seleccionadas).
- Capacitar de manera continua al personal técnico en el manejo de los biofertilizantes.
- Evaluar la calidad de las cepas seleccionadas.
- Evaluar la eficiencia de los biofertilizantes como fuente nutrimental de los cultivos, con énfasis en el uso de las nuevas cepas seleccionadas.
- Promover la investigación en cuanto a microorganismos.
- Demostraciones de los cultivos con biofertilizante.
- Producción de cultivos con biofertilizantes.
- Equipamiento para la producción de biofertilizantes.
- Distribución de los biofertilizantes.
- Procesos de producción de los biofertilizantes.
- Control de calidad de los biofertilizantes.
- Disponibilidad de mano de obra y generación del empleo.
- Análisis de la demanda y oferta.

Cuadro 15. Taller de ideas del proyecto



Cuadro 16. Marco lógico del proyecto

LÓGICA DE INTERVENCIÓN	INDICADORES VERIFICABLES	FUENTES DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS IMPORTANTES
<p>Propósito: la aplicación de nueva tecnología orientada hacia reestructurar y mejorar lo deteriorado de los recursos naturales sin dejar de producir eficientemente alimentos básicos para el consumo humano y animal.</p>	<p>La pérdida de la diversidad biológica, la disminución de los recursos naturales, la erosión del suelo y los cambios climáticos, son algunos de los resultados que ha dejado la agricultura intensiva debido principalmente al excesivo uso de altas dosis de agroquímicos.</p>	<p>búsqueda de una mayor productividad por unidad de área ha originado la alteración de las comunidades vegetales y como consecuencia de esta actividad antropocéntrica, se ha acelerado la degradación de los sistemas agrícolas</p>	<p>En la actualidad los sistemas de producción agrícola enfrentan el problema de lograr una producción sustentable sin degradar los recursos naturales.</p>
<p>Fin: Elaborar un biofertilizante con bacterias competitivas para la zona norte de México</p>	<p>Esto permitirá aumentar la eficiencia de los procesos simbióticos planta-microorganismo con el desarrollo de tecnologías de producción que permitan favorecer la nutrición de los cultivos, incrementar la productividad y conservar los recursos naturales.</p>	<p>Los sistemas de producción agrícolas enfrentan el problema de lograr una producción sostenida sin degradar los recursos naturales.</p>	<p>El impacto ecológico es cada vez más importante en los sistemas de producción en el norte del país.</p>
<p>Productos: La generación de un biofertilizante compuesto de bacterias aisladas de la región norte de México.</p>	<p>Validación de tecnología disponible para conocer su eficacia y potencial de Aplicación en diversos sistemas de producción, así como, inducir, promover y difundir el uso de biofertilizantes como complemento o sustituto parcial de los agroquímicos para mejorar la producción de los cultivos en México, para coadyuvar a la reducción de los costos de producción y reducir la contaminación del suelo y agua.</p>	<p>la última década la sociedad reclama, además de la producción de alimentos de mayor calidad proteínica, la conservación de los recursos naturales. Esta aptitud ha favorecido el desarrollo de tecnologías de producción menos contaminantes y ecológicamente más racionales.</p>	<p>El costo de los biofertilizantes es muy bajo en comparación con los fertilizantes.</p>

<p>Actividades: Elaboración de una estrategia para la transferencia de tecnología para el campo. Utilización de biofertilizante en cultivos agrícolas.</p>	<p>Se realizara la incorporación de asesoría a productores con una visión integral del proceso productivo, impulsando la vinculación agricultura-industria, así como el uso de tecnología que no deteriore los recursos naturales.</p>	<p>El uso de tecnología amigable con el medio ambiente resulta imprescindible para preservar y mantener los recursos naturales, pero además son un factor clave para elevar la rentabilidad en la producción agrícola.</p>	<p>Utilización en diversos cultivos, promoviendo su uso de biofertilizantes a través del gobierno estatal y de instituciones como INIFAP, IPN y CP.</p>
--	--	--	---

Cuadro 17. ANÁLISIS FODA

<p>FORTALEZAS</p> <p>Participación de Instituciones con gran experiencia (IPN, CP, INIFAP).</p> <p>La necesidad de generar una tecnología útil.</p> <p>Beneficios de los biofertilizantes.</p>	<p>OPORTUNIDADES</p> <p>Falta de estudios referentes a microorganismos benéficos en el norte de México.</p> <p>Interés de las comunidades que tienen más impacto en la agricultura en Chihuahua.</p> <p>Altos costos de producción con el uso de fertilizantes químicos.</p> <p>Interés de los productores para recuperar los suelos.</p> <p>Favorecer un equilibrio ecológico.</p> <p>Excesivo uso de altas dosis de agroquímicos.</p> <p>En el norte de México pocos son los estudios y aplicación de bacterias como biofertilizantes.</p>
<p>DEBILIDADES</p> <p>Costo del proyecto.</p> <p>La transferencia de tecnología.</p> <p>La credibilidad de los biofertilizantes debido a la generación de productos de mala calidad.</p> <p>La utilización excesiva de fertilizantes.</p> <p>Erosión del suelo y los cambios climáticos</p>	<p>AMENAZAS</p> <p>La falta de información sobre biofertilizantes.</p> <p>Pérdida de la fertilidad total de los suelos.</p> <p>Amenaza de la contaminación de los mantos acuíferos y del agua disponible en la superficie.</p> <p>Pérdida de la diversidad biológica presente en los microorganismos benéficos.</p> <p>Erosión del suelo y los cambios climáticos</p>

8.7 Variables de respuesta

Para determinar el impacto productivo de las cepas seleccionadas, se tomarán datos de las siguientes variables de respuesta:

1. Rendimiento de Grano ajustado al 14% de humedad
2. Costos de Producción del cultivo
3. Costo por tonelada para medir la rentabilidad

Para la evaluación del rendimiento se tomará por unidad de muestreo un tramo de surco de 10 m de largo, en los cuales se tomarán los siguientes datos de campo: Nombre de Productor, No. de muestra, localidad, municipio, genotipo, ancho de surco, número de plantas, número de mazorcas.

Para medir la rentabilidad a través de la evaluación del costo por tonelada se cuenta con un formato donde se describen las diferentes operaciones e insumos utilizados durante el ciclo del cultivo así como su costo respectivo. Para obtener el costo por tonelada se usa la siguiente ecuación:

$CT = CC / R$ donde:

CT = Costo por tonelada (\$ / t)

CC = Costo del cultivo (\$)

R = Rendimiento de grano Kg/ha estandarizado al 14% de humedad

8.8 Recomendaciones

Sobre el diseño, operación y evaluación de estrategias de desarrollo agrícola regional.

El diseño y operación de estrategias de desarrollo agrícola no sólo debe realizarse en los centros de decisión política y administrativa, es necesario buscar la participación de los agricultores en la toma y ejecución de decisiones con el propósito de lograr procesos de autogestión de desarrollo.

El proceso de diagnóstico es un elemento de principal importancia en el que se basa el diseño de estrategias de desarrollo, conocer el comportamiento de ciertos indicadores en el pasado para comprender sus tendencias y, a partir de ello, aplicar modelos normativos que permitan modificarlas positivamente es ineludible para los fines antes expuestos.

La información acerca del comportamiento de indicadores que tienen que ver con la actividad agrícola no ha sido sistematizada en las instituciones del Sector Agropecuario o no existe, lo cual dificulta la explicación del fenómeno en su retrospectiva. Es recomendable instrumentar un centro de documentación regional para captar la información anualizada de indicadores como financiamiento, precios, rendimiento, volúmenes de producción, superficies, tecnología, etc.

La participación de representantes de ejidatarios y pequeños propietarios asentados en el municipio, participando en el grupo de gestión que esta estrategia recomienda, deberá considerarse de principal importancia en sus etapas iniciales; pero con el objetivo de obtener posiciones en los niveles de toma de decisiones regional, para que a través de ello puedan introducir su concepción de desarrollo agrícola.

El propósito central es buscar la toma de posiciones políticas, preparar el terreno para que estrategias, de origen exógeno, se hagan endógenas y se integren a la dinámica de trabajo de la población agrícola.

Para lograr ese proceso de toma de posiciones políticas es recomendable el fomento de la actividad política hacia dentro de las comunidades, como en expresiones de partidismo formal, respetando el interés y decisiones de la población agrícola.

8.9 Impactos sociales, económicos, ecológicos y tecnológicos de los resultados

En la región de Chihuahua los costos de producción de los cultivos son altos, su producción involucra tanto hombres como mujeres, además de personal técnico encargado del manejo del cultivo y técnicos de compañías de agroquímicos que viven de los cultivos.

Con un incremento en los costos y sin incrementar la productividad se tenderá a disminuir la superficie de siembra en la región y se dejarán de percibir estas aportaciones, por lo que la población rural tenderá a trasladarse a otras ciudades para emplearse, que es una de las causas del incremento de población en estas ciudades.

Además es necesario evitar el deterioro de los recursos y mantener la actividad económica en la región, por lo cual se plantea este proyecto con asociaciones de productores que desean mantener la región productiva en forma sostenible.

El impacto tecnológico no se limita a la industria y los servicios. Las innovaciones derivadas de los avances de la biotecnología repercuten en el sector agrícola, provocando trascendentales modificaciones. El desarrollo del sector rural debe trascender la esfera agrícola a fin de posibilitar el nivel de ocupación productiva y remuneración que se requieren para el mejoramiento de los índices de bienestar familiar, de las comunidades y núcleos de población rural.

Adicionalmente, y ante el deterioro de los recursos naturales del medio rural, las instituciones y organizaciones de productores inician un serio esfuerzo por revertir este proceso, para que el crecimiento económico no signifique la destrucción de la riqueza natural y, en este terreno, la capacitación con un propósito orientador debe incorporar una visión sustentable del medio ambiente.

Por ello, en años recientes la óptica con que se aprecia la formación de los recursos humanos ha cambiado sustancialmente, convirtiéndose en una variable estratégica fundamental en los intentos o modelos de políticas de desarrollo económico y social. En particular, en la concepción sistémica de una estrategia de desarrollo rural, se está insertando como componente clave y funcional al sistema la capacitación de los recursos humanos del medio rural (Ordoñez, 2004).

La capacitación enfrenta el reto de contribuir al desarrollo rural y particularmente a la productividad, ya sea para lograr una producción agropecuaria competitiva en el mercado nacional e internacional o bien para garantizar el abasto que permita contar con inventarios nacionales que garanticen la seguridad alimentaria.

En los países de la región latinoamericana y, particularmente en México, la capacitación (que se denominó antes extensionismo) tiene una larga tradición, que data desde los albores de la década de los años cincuenta, siendo asumida principalmente por los Estados como un instrumento de política para el mercado de trabajo, para compensar las insuficiencias del sistema educativo.

También se desarrollan programas de mayor duración de capacitación y asistencia técnica específicos que con frecuencia son componentes de programas o proyectos de desarrollo más amplios (RCE, 2002).

8.9.1 Comercialización y difusión

Para difundir el uso de biofertilizantes se requiere del contacto con la Secretaría de Desarrollo Agropecuario y Forestal del estado de Chihuahua, así como con distintas organizaciones de productores del país, para dar a conocer la existencia de estos biofertilizantes y ponerlos a su disposición, estableciendo parcelas demostrativas donde puedan conocer en forma práctica y bajo sus distintos sistemas de producción, las ventajas del uso de estos productos.

Estableciendo alianzas estratégicas con organizaciones de productores tal como la CNC, así como asociaciones gremiales como la Confederación Nacional Agronómica y vía despachos profesionales de agrónomos.

Fortalecer las parcelas demostrativas en diversas regiones, iniciar programas de producción y llevar un seguimiento puntual de los resultados obtenidos.

Se efectuaría la promoción y difusión de los productos en diversos estados del país, pero consolidando los avances logrados en los estados en los que se haya trabajado (Cuadro 14).

8.9.2 Demostración

Se trabajará en diferentes estados de la República Mexicana, donde se consolidará el trabajo realizado y fortalecerán las parcelas demostrativas en diversas regiones, se iniciarán programas de producción y se llevará un seguimiento puntual de los resultados obtenidos.

Este trabajo se dividirá en dos etapas de trabajo conjunto con instituciones, donde se obtendrá el germoplasma y se efectuará la evaluación. Otra estrategia es realizar demostraciones en las instalaciones de la misma institución.

8.10 Procesos de producción de biofertilizantes

Es importante que el proceso tenga continuidad y haya facilidad para el seguimiento en los distintos pasos para lograr un buen control de la producción, optimizar los tiempos del proceso, abatir costos y asegurar la calidad del producto terminado, de acuerdo a las normas nacionales, e incluso internacionales, establecidas para la producción de biofertilizantes.

A) El proceso para la producción de biofertilizantes es el siguiente:

1. Preparar el inóculo con la multiplicación de la bacteria.
2. Mezcla para preparar el sustrato.
3. Mezclar las bacterias con el sustrato
4. Embolsado a la cantidad requerida
5. Pesar el contenido de cada una de las bolsas
6. Sellado de las bolsas
7. Almacenamiento
8. Distribución

B) Control de calidad

El objetivo es mantener la calidad del producto terminado y evitar la posible contaminación en algún paso del proceso de producción.

Para asegurar la calidad en la etapa de producción de la bacteria se toman muestras en cada lote, para analizar los niveles poblacionales (óptimo de 10^9 , mínimo requerido 10^8 UFC), determinar la viabilidad de los microorganismos y verificar que no haya contaminación en el producto.

8.11 CONCLUSIONES

La generación de una estrategia de desarrollo sustentable para el estado de Chihuahua requiere el diseño de inoculantes multicepa que permitan cubrir diferentes carencias nutricionales del suelo y la adaptación y supervivencia de las cepas bacterianas bajo diferentes esquemas de prácticas agrícolas, incluyendo suelos en los que se aplique fertilizante químico, siempre y cuando se haga en forma dosificada y sólo para permitir el arranque del cultivo.

Actualmente la aplicación de nueva tecnología está orientada hacia reestructurar y mejorar lo deteriorado de los recursos naturales, sin dejar de producir eficientemente alimentos básicos para el consumo humano y animal.

Además, es importante mencionar el beneficio que los productores podrían apropiarse con la aplicación de los biofertilizantes, los productores conseguirían acceder al beneficio que reportaría el incremento de aproximadamente 20% en los rendimientos, el cual no ha sido cuantificado. Por lo que la utilización de biofertilizantes en los sistemas productivos puede ser una alternativa viable para consolidar un desarrollo agrícola sostenible.

Es importante que el proceso de producción tenga continuidad y haya facilidad para el seguimiento en los distintos pasos para lograr un buen control de la producción, optimizar los tiempos del proceso, abatir costos y asegurar la calidad del producto terminado.

En efecto, los resultados obtenidos con biofertilizantes registran incrementos del orden del 30% en rendimientos, con relación al cultivo no fertilizado y del 40% en el contenido de proteína, por lo que la utilización de esta tecnología en los sistemas productivos es una alternativa viable para consolidar un desarrollo agrícola ecológico más sostenible.

Esta tecnología para producción de cultivos favorecerá la nutrición de los mismos, su uso permitirá validar y conocer su eficacia y potencial de aplicación, así como, mejorar la producción de los cultivos en el norte de México, coadyuvando a la reducción de los costos de producción y reduciendo la contaminación del suelo y agua. Promoviendo una agricultura de mayor sustentabilidad, donde los fertilizantes biológicos sean la base y los químicos el complemento alternativo.

CAPITULO IX

9. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos durante esta investigación, en tres localidades del estado de Chihuahua, mostraron la importancia de evaluar el comportamiento de las cepas nativas y la importancia de considerar aquellas con mayor potencial simbiótico para la elaboración de biofertilizantes, mismos que deben responder a condiciones edáficas, climáticas, de variedades de cultivo y de prácticas agrícolas particulares.

El análisis de las poblaciones bacterianas totales puso de manifiesto la presencia de una población bacteriana mayor en suelos con cultivo de alfalfa de la localidad de Ojinaga y de cultivo de nogal en la localidad de Casas Grandes, mientras que la menor población bacteriana en suelo se detectó en terrenos con historial de cultivo de papa en la localidad de Delicias, suelo sometido a una aplicación intensiva de agroquímicos, alta tecnificación y uso de maquinaria pesada. Lo que evidenció el impacto del manejo agrícola en las poblaciones bacterianas del suelo.

La baja capacidad de supervivencia que presentaron algunos de los aislados, es un indicio de los requerimientos de las poblaciones bacterianas y del hecho de que hay elementos de su entorno que favorecen su prevalencia en los suelos de cultivo, implicando además el impacto que sobre estas poblaciones tiene el uso de agroquímicos, el tipo de laboreo y labranza aplicados en cada localidad.

En Ojinaga, en terrenos de comunidades menonitas, el uso de agroquímicos y el tipo de labranza es más intensivo que en las otras dos localidades, fue en sitios de muestreo de esta localidad que las poblaciones bacterianas reflejaron mayor perturbación y, debe hacerse notar que a pesar de ello prevalecen poblaciones benéficas del tipo de los rhizobia, en presencia o ausencia de cultivos de leguminosas.

En referencia a las poblaciones del grupo rhizobia, se determinó que el número de UFC fue mayor en suelo con el cultivo de cacahuete de la localidad de Delicias (6.6×10^3), mismo que no es sometido a la aplicación de fertilizante químico, ni uso de maquinaria pesada, pero en cambio presenta un alto estrés hídrico y problemas de textura del suelo. En esta misma localidad se registró la menor población de rhizobia presente en suelo, ello en cultivo de papa (0.1×10^3 UFC) con registro de aplicación de fertilizante y

otros agroquímicos, además de un historial de por lo menos 10 años de monocultivo de papa.

Al analizar el número de nódulos desarrollados tras inoculación en plantas de alfalfa y frijol, se detectó una mayor cantidad de nódulos en plantas de frijol inoculadas con suelo donde se cultivaba alfalfa. Ello, independientemente de la eficacia para la FBN de las cepas responsables de la nodulación. Lo que llama la atención es la baja de especificidad simbiótica en las cepas que prevalecen en estos suelos.

Así mismo, de acuerdo a los resultados de inoculación en plantas de frijol y alfalfa se encontró que las diferentes cepas poseen ventajas adaptativas particulares, lo que trajo como consecuencia que ninguna de las cepas evaluadas presentara ventaja para todos los parámetros evaluados. Pero sí que se puede contar con cepas adaptadas a diferentes condiciones adversas y, por lo tanto, capaces de sobrevivir y ser útiles en la elaboración de fertilizantes con requerimientos específicos.

Se sabe también que hay respuestas diferenciales que obedecen a la especificidad simbiótica, lo que implica que no sólo las condiciones ambientales rigen la selección de las cepas para el diseño de los biofertilizantes, sino también la pareja simbiótica desde el punto de vista del cultivar elegido por el productor. Este punto es de particular importancia debido a la capacidad de nodulación de amplio espectro encontrada en las cepas aisladas durante este trabajo.

Las principales especies identificadas que nodularon las variedades de frijol y alfalfa se identificaron como *Ensifer meliloti*, el cual no ha sido reportado como simbiote de frijol, pero es el simbiote habitual de la alfalfa, estos resultados llevan a considerar que hay pérdida de especificidad simbiótica, misma que puede deberse a la pérdida, ganancia o intercambio de material genético entre las cepas que poseen mayor capacidad de adaptación y prevalencia en condiciones ambientales adversas y en ausencia del macrosimbionte.

La identificación taxonómica (a nivel de género) de 31 cepas ubicó a 18 de estas en el género *Ensifer* y otras 13 se agruparon en el género *Rhizobium*.

Estos resultados pueden ser interpretados como una evidencia de la fuerte presión de selección impuesta por las condiciones edafoclimáticas y las prácticas agrícolas en cada una de las regiones, en contraposición con la especificidad simbiótica lo cual

favorece la prevalencia de cepas de rhizobia altamente resistentes a condiciones adversas pero que reflejan pérdida de especificidad y reducción en las tasas de fijación de nitrógeno.

Durante nuestro estudio no se documentó la presencia de rhizobia en los cultivos de algodón, papa, chile, durazno y manzano, sin embargo, no debe descartarse la presencia de cepas de rhizobia que carezcan de genes simbióticos y que represente un reservorio capaz de adquirir esta información y responder a las necesidades cambiantes de entorno. Estas son cepas de alto potencial que deben tener seguimiento bajo una estrategia integral, debido a la plasticidad genómica y la capacidad de recuperar su potencial simbiótico bajo condiciones adecuadas en presencia de una pareja simbiótica.

Se obtuvieron siete cepas que presentaron mayor capacidad de adaptación a condiciones adversas del medio, crecimiento a elevadas temperaturas, crecimiento en un amplio intervalo de valores de pH y osmotolerancia. Estas cepas representan el potencial de supervivencia requerido por las cepas que constituyan un biofertilizante en las primeras etapas de introducción, de manera que logre establecerse la población en presencia de las variedades cultivadas y una vez que inicie la regeneración de las propiedades del suelo poder enfocar los esfuerzos al incremento en la tasa de FBN por parte de los microsimbiontes.

La aplicación de nueva tecnología está orientada a reestructurar y mejorar lo deteriorado de los recursos naturales, sin dejar de producir eficientemente alimentos básicos para el consumo humano y animal. La utilización de esta tecnología en los sistemas productivos del estado de Chihuahua, bajo un esquema integral y diseñado *ad hoc*, es una alternativa viable para consolidar un desarrollo agrícola ecológico y sostenible.

LITERATURA CITADA

- Abd-Alla, M. H. 2001. Regulation of nodule formation in soybean-*Bradyrhizobium* symbiosis is controlled by shoot or/and root signals. *Plant Growth Regulation* 34:241-250.
- Aboites A., L. 1993. Presencia menonita en México. Trabajo presentado en el seminario destino México: un estudio de las migraciones internacionales a México, siglos XIX y XX. México. Colegio de México. P 3.
- Aguirre, M. J. F. y E. Velazco Z. 1994. Componentes morfológicos y fisiológicos del rendimiento en *Leucaena leucocephala* al inocularse con micorrizas VA y/o *Rhizobium loti* J. *Agricultura Técnica en México* 20(1):43-45.
- Aguirre, J. A. 2001a. Comercialización y consumo de productos orgánicos en ferias y supermercados: Costa Rica 2001. En: Chaves V., J. A. (ed.). Memoria: Intercambio sobre comercialización de productos orgánicos. COPROALDE-CEDECO-UNED. 23 de abril del 2001. Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. p. 24-29.
- Aguirre, M. J.F. 2001b. Programa Nacional de Biofertilizantes del INIFAP. Informe de labores. Dirección General de la División Agrícola. México, D.F. (Impreso).
- Aguirre, M. J. F. y J. Kohashi-Shibata. 2002. Dinámica de la colonización micorrizica y su efecto sobre los componentes del rendimiento y el contenido de fosforo en frijol común. *Agricultura Técnica en México* 28(1):23-33.
- Aguirre, M. J. F. 2004. Biofertilizantes microbianos: Antecedentes del programa y resultados de validación en México. En: Simposio de biofertilización realizado el 25 de noviembre 2004, Rio Bravo, Tam., México. Memorias. 127 p.
- Aguirre, M. J. F.; J. Kohashi-Shibata; Trejo-López, C.; Acosta-Gallegos, J. A. y Cadena-Iñiguez, J. 2005. La inoculación de *Phaseolus vulgaris* L. con tres microorganismos y su efecto en la tolerancia a la sequía. *Agr. Téc. Méx.* 31:125-137.
- Aguirre-Medina. J. F. 2006. Biofertilizantes microbianos: experiencias agronómicas del programa nacional del INIFAP en México. Libro Técnico Num. 2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas, México. 201 p.
- Alcantar, G. y Sandoval V., M. 2001. Funciones de los nutrimentos en las plantas. Curso postgrado. Colegio de Postgraduados IRENAT-Edafología-Nutrición Vegetal. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. p. 1-104.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Editado por AGT editor, con la colaboración de García E. S. A: 2da. Edición. México. 491p.
- Álvarez-Solís J. D. y M. de J. Anzueto-Martínez. 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. *Agrociencia* 38:13-22.
- Álvarez, S. y Ferrara-Cerrato, R. 1994. Los microorganismos del suelo en la estructura y función de los agroecosistemas. Montecillo, Estado de México: Instituto de Recursos Naturales-Programa de Edafología/Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas cuaderno de Edafología, 25 p.
- Antoun, H. and Pre´vost, D. 2005. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In Siddiqui, Z.A., Ed. PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Springer, N. Y. p. 1–38.
- Aquilanti, L.; Mannzzu, I.; Papa, R.; Cavalca, L.; Clementi, F. 2004. Amplified ribosomal DNA restriction analysis for the characterization of *Azotobacteriaceae*: a contribution to the study of

- the study of these free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 57:197-206.
- Ardourel, M.; Demont, N.; Debelle, F.; Maillet, F.; De Billy, F.; Pormé, J.; Dénarié J. y Truchet, G. 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6:1357-1374.
- Baca, E. B.; Soto, U. L. y Pardo R. Ma. P. A. 2000. Fijación Biológica de Nitrógeno. Elementos 38. 43-49.
- Bais, H.P; Weir, T.L; Perry, L.G; Gilroy, S. and Vivanco, J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233-66.
- Balkwill, D. L. 2005. Genus VI. Ensifer Casida 1982, 343VP. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn., vol. 2, part C. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G. M. Garrity. NY: Springer. p. 354-358.
- Barea, J. M.; Pozo, M. J; Azcón R. y Azcón-Aguilar, C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 56(417):1761-1778.
- Barney, T.; Burns, T. and H. Naylo. 1973. Colonia Morelos: a short history of a Mormon colony in Sonora, México, *The Smoke Signal* 27:142-180.
- Bastian, F.; Cohen, A.; Piccoli, P.; Luna, V.; Baraldi, R. and Bottini, R. 1998. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Research* 24:7-11.
- Begum, A. A.; Leibovitch, S.; Migner, P. and Zhang, F. 2001a. Specific flavonoids induced nod gene expression and reactivated nod genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. *Journal of Experimental Botany* 52:1537-1543.
- Begum, A. A.; Leibovith, S.; Migner, P. and Zhang, F. 2001b. Inoculation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. viceae preincubated with arrangement and hesperetin directly into soil increased pea conditions. *Plant and Soil* 237:71-80.
- Ben-Dow, E.; Shaphiro, O. H.; Siboni, N.; Kushmaro, A. 2006. Advantage of using inosine at the 3'termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol* 72:6902-69-06.
- Bernal, R. C. R. y Urias, C. R. M. 1991. Agricultura orgánica en hortalizas para exportación. En memoria del Primer Simposio Agricultura Sostenible: Colegio de Postgraduados y M. O. A. Internacional. Montecillo, Méx 122 p.
- Bhattacharjee, R.; Singh, B.; and Mukhopadhyay, S. N. 2009. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:199–209.
- Bohlool, B.; Ladha, J.; Garrity, D. and George, T. 1992. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. *Plant and Soil* 141:1-11.
- Brady, N.C. and R.R. Weil. 1999. The nature and properties of soil. Macmillan publishing. New York, 11th Ed. p. 263-277.
- Brencic, A. and S.Winans. 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 69:155-194.
- Brewin, N.J.; Downie, J. y P.W. Young. 1992. Nodule formation in legumes. In: "Encyclopedia of Microbiology". Academic Press Inc., p. 239-248.

- Broughton, W. J. 2003. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J Bacteriol* 185:2975-2979.
- Broughton, W.J.; S. Jabbouri, and X. Perret. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J Bacteriol* 182:5641-5652.
- Burdman, S.; Hamaoui, B. and Okon, Y. 2000. Improvement of legume crop yields by co-inoculation with *Azospirillum* and *Rhizobium*. The Otto Warburg Center for Agricultural Biotechnology. The Hebrew University of Jerusalem, Israel. p. 3-29.
- Caba, J.M.; Poveda, J.L. y Ligeró, F. 2001. Control de la nodulación en las leguminosas: Implicación de las fitohormonas. En: (<http://193.146.205.198/sefin/Ligeró.html>).
- Caballero-Mellado, J.; Fuentes-Ramírez, L. E.; Reis, M. V. and Martínez-Romero, E. 1995. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. *Applied and Environmental Microbiology* 61(8):3008-3013.
- Caballero-Mellado, J. and E. Martínez-Romero. 1999. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis* 26:111-121.
- Caesar-Ton, T.; That, T. C.; A. J. Caesar; J. F. Gaskin; U. M. Sainju y W. J. Busscher. 2007. Taxonomic diversity of predominant culturable bacteria associated with microaggregates from two different agroecosystems and their ability to aggregate soil in vitro. *Applied Soil Ecology* 36(1):10-21.
- Camas, G. R. 2000. Programa de validación de biofertilizantes en Chiapas. En; informe anual de labores PV 1999, OI 1999-2000. Campo Experimental en Chiapas. Centro de Chiapas. Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur. (Impreso).
- Campillo, R. R.; Urquiaga, S. C.; Pino, I. N. y Montenegro, B. A. 2003. Estimation of biological nitrogen fixation in forage legumes using a ¹⁵N labeling methodology. *Agricultura Técnica* 63(2):169-179.
- Case, R.J.; Boucher, Y.; Dahllöf, I.; Holmström, C.; Doolittle, W.F. and Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol* 73:278-288.
- Casida, L. E. Jr. 1982. *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *Int J Syst Bacteriol* 32:339-345.
- Castellanos, J.Z.; J.X. Uvalle-Bueno y A. Aguilar-Santelises. 2000. Manual de interpretación de análisis de suelos y aguas. 2ª Edición. INCAPA. Celaya, Gto. 226 p.
- Cerna, B.; Rejmankova, E.; Snyder, J. M. y Santruckova, H. 2009. Heterotrophic nitrogen fixation in oligotrophic tropical marshes: changes after phosphorus addition. *Hydrobiology*, 627:55-65.
- Chabot, R.; Antun, H. and Cescas, M. P. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosae bivar phaseoli*. *Plant and Soil* 184:311-321.
- Chen, W.X.; Yan, G.H. y Li, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacterio.* 38:392-397.
- Chen, W. M.; Laevens, S.; Lee, L. M.; Coenye, T.; De Vos, P.; Mergeam, M.; Vandamme, P. 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* and sputum of a cystic. Fibrosis patient. *Int. J. System. Evol. Microbiol* 51:1729-1735.
- Chen, Wen-Ming; M. de Faria, S.; James K. E.; Elliott, J. N.; Kuan-Yin Lin; Jui-Hsing Chou; Shih-Yi Sheu; Cnockaert, M.; Sprent J. I. and P. Vandamme. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov.,

- isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 57:1055-1059.
- Chen, W. M.; de Faria, S. M.; Chou, J. H.; James, E. K.; Elliott, G. N.; Sprent, J. I.; Bontemps, C.; Young, J.P.; Vandamme, P. 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 58(9):2174-2179.
- Chen, W.; Zhu, Wenfei; Bontemps, Cyril; Young, J.; Peter W. and Wei, Gehong. 2009. *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from root nodules of the wild legume *Alhagi sparsifolia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:958-962.
- CNA, Comisión Nacional del Agua. 2005. Actualización del estudio Geohidrológico del Acuífero Meoqui- Delicias.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2004. Estadísticas semanales de incendios forestales en Chihuahua 1990-2004. Gerencia Región VI Río Bravo. Chihuahua, Chih.
- Cong, P.T.; Dang-Dung, T.; Minh-Hien, T.; Thanh-Hien, N.; Choudhury-Abu, T.M.A.; Kecské, M. L. and Kennedy, I. R. 2009. Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilization of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. *European Journal of Soil Biology* 45:52–61.
- Contreras-Moreira, B.; Figueroa-Palacios, I.; Ávila-Casanueva, A.; Zozaya, E.; Sachman, B. and Vinuesa, P. 2008. Genome-wide selection of primer pairs amplifying highly informative amplicons for multilocus sequence analyses. 8th European Nitrogen Fixation Conference, Workshop 1. Ghent, Belgium. 265 p.
- Contreras-Moreira, B.; Sachman-Ruiz, B.; Figueroa-Palacios, I. and Vinuesa, P. 2009. Primers 4clades: a web server that uses phylogenetic trees to design lineage-specific PCR primers for metagenomic and diversity studies. *Nucleic Acids Research*. p.1-6.
- Cooper, J.E. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* 1364-5072.
- Cruzaley, S. R. 2000. Validación de biofertilizantes en cultivos básicos en el Estado de Guerrero. *En: Informe anual de labores de la Dirección de Vinculación del INIFAP en el estado de Guerrero*. Centro de Investigación Regional del Pacífico Sur (Impreso).
- Dakora, F. 1994. Nodulation gene induction and genetic control in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *South African Journal of Sciences*. 90:596-599.
- Dance, I. 2008. The chemical mechanism of nitrogenase: hydrogen tunneling and further aspects of the intramolecular mechanism for hydrogenation of g²-N₂ on FeMo-co to NH₃. *The Royal Society of Chemistry* 5992–5998.
- Daniel, G. J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 280-300.
- De Lajudie, P.; E. Laurent-Fulele; A. Willems; U. Torck; R. Coopman; M. D. Collins; K. Kersters; B. Dreyfus, and M. Gillis. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1277-1290.
- Delany, I.; Sheehan, M. M.; Fenton, A.; Bardin, S.; Aarons, S. and F. O’Gara. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. *Microbiology* 146:537–546.

- Dobbelaere, S.; Vanderleyden J. y Okon. Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in the Plant Sciences* 22(2):107-149.
- Doran, J. W. 1980. Soil microbial and biochemical changes associates with reduce tillage. *Soil Sci. Soc. Am. J* 44:765-771.
- Dordas, C. 2009. No symbiotic hemoglobin and stress tolerance in plants. *Plant Science* 176:433-440.
- Doyle, J.J. y Luckow, M.A. 2003. *Plant Physiology* 131:900-910.
- Durán, P. A.; Aguirre-Medina, J. F. y López, V. G. 2001. Modulo de investigación en frijol ciclo otoño-invierno 2000-2001. *En*; Informe anula de labores del Campo Experimental Cotaxtla. Centro de Investigación Regional del Golfo.
- Dreyfus, B.; Garcia, J. L. y Gillis, M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 38(1):89-98.
- Eardly, B. D.; Nour, S. M.; van Berkum, P. and Selander, R. K. 2005. Rhizobial 16S rRNA and DNak genes: mosaics and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1328-1335.
- Echegaray, A., A. 1995. El ciclo del nitrógeno y sus fases que lo constituyen. *En*: Agromicrobiología. R. Ferrera C. y J. Pérez M. Eds. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. p. 7-35.
- Escalante-Lozada, A.; G. Gosset-Lagarda; A. Martínez-Jiménez y F. Bolívar-Zapata. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia* 38(6):583-592.
- Escalante, A.E. 2007. Ecología molecular en el estudio de comunidades bacterianas.
- Espinoza, Y. y Malpica, L. 2007. El género *Rhizobium* como inoculante para leguminosas, *Rev. Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, abril-diciembre.
- Farrand S.K.; Van Berkum y P. Oger. 2003. *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1681-1687.
- Felix, S.J.N.; Gutierrez, C.T.; Lemos, P.A.; Ortiz, J.M.A.; Pescador, E.N. L. and Varela, F.L. 1996. Manual de Lab. de Ecología Microbiana. Instituto Politécnico Nacional. p. 180.
- Feng. 2005. Ascending migration of entophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:7271-7278.
- Ferrera-Cerrato, R. 1995. Efecto de rizósfera. *En*: Agromicrobiología. R. Ferrera C. y J. Pérez M. Eds. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. p. 36-56.
- Figueiredo, M.B.; Burity, H. A.; Martinez, C. R. And Chanway, C. P. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Applied Soil Ecology* 40:182-188.
- Fisher, R.F. and R.J. Long. 1992. *Rhizobium*-plant signal exchange. *Nature* 357:655-660.
- Fortis-Hernández, M.; Leos-Rodríguez, J.A.; Corona-Castillo, I.; García-Hernández, L.; Salazar-Sosa, E.; Precio-Rangel, P.; Orozco-Vidal, J. A.; Segura-Castruita, M.A. 2009. Capitulo V: Uso de estiércol bovino en la Comarca Lagunera. *En*: Agricultura orgánica. Corona-Castillo, I.; Salazar-Sosa, E.; Fortis-Hernández, M.; Trejo-Escareño, H. I.; Vázquez-Vázquez, C.; López-Martínez, J. D.; Figueroa-Viramontes, R.; Zúñiga-Tarango, R.; Preciado-Rangel, P. y Chavarría-Galicia, J. A.; Gómez-Palacio, Dgo México, Facultad de Agricultura y Zootecnia de

- la UJED, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, COCyTED 2009. (ISBN: 978-607-00-1646-7), p. 233-258. 83 citas bibliográficas. 483 p.
- García-Fraile, P.; Rivas, R.; Willems, A.; Peix, A.; Martens, M.; Martínez-Molina, E.; Mateos, P. F.; Velázquez, E. 2007. *Rhizobium cellulosilyticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol 57:844-848.
- Garza-Requena, J.L. y M. Valdés. 2000. Tamaño de la población microbiana del suelo y desarrollo inicial de *Desmanthus virgatus* (L.) Willd. Agrociencia 34:445-451.
- Geertz, C. 1997. La interpretación de las culturas. Barcelona. Editorial Gedida.
- Giles, E.; Oldroyd, D. y Allan, D. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. Annu. Rev. Plant Biol. 59:519-46.
- Gilles-Gonzalez, M. A. and G. González. 2004. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. J. Appl. Physiol 96:774-783.
- Gogarten, J. P.; Doolittle, W. F. and Lawrence, J. G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. Mol. Biol. Evol 19:2226-2238.
- González, J. y Lluch, C. 1992. Biología del nitrógeno. Interacción planta-microorganismo. Ed. Rueda. Madrid. España. p. 141-161.
- González, E. J. and Marketon, M. M. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4):574-592.
- Griffith, J. J. and T. J. Toy. 2001. Evolution in revegetation of iron-ore mines in Minas Gerais State, Brazil. Unasyuva 52. Disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2795e/Y2795e00.HTM>.
- Guerrero, R. y M. Berlanga. 2005. Microbios en la niebla: descubriendo el papel de los microbios en la biosfera. Ecosistemas. 14(2):3-10.
- Gou, R.; Silsbury, J. H. and Graham, R. D. 1992. Effect of four nitrogen compounds on nodulation and nitrogen fixation in faba vena, white lupin and medic plants. Austrian Journal of Plant Physiology 19:501-508.
- Gu, Ch. T.; En Wang, T.; Chang, F. T.; Tian, X. H.; Wen, F. C.; Xin, H. S. and Wen, X. C. 2008. *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules. Int J Syst Evol Microbiol 58: 1364-1368.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Han, T. X.; L. L. Han; L. J. Wu; W. F. Chen; Xin, H. Sui; J. G. Gu; En Tao Wang and Wen Xin Chen. 2008. *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. Int J Syst Evol Microbiol. 58(11):2610-2618.
- Hartwing, U. A.; Maxwell, C. A.; Joseph, C. M. y Phillips, D. A. 1990. Chryseriol and luteolin from alfalfa seeds induce nod genes in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiology. 92: 116-122.
- Hassan-Moawad, A. A. 2004. Application of microbial biotechnology for sustainable legume production in desert conditions, International Conf. on Water Resources and Arid Environment. 10 p.
- Heckmann, A. B. 2006. Lotus japonicus nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. Plant Physiology. 1739-1750.

- Heeb, S.; Blumer, C. and D. Haas. 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J. Bacteriol.* 184:1046-1056.
- Hernandez-Rodriguez, O. A.; Ojeda-Barrios, D. L.; López-Días, J. C. y A. M. Arras-Vota. 2010. Abonos orgánicos y su efecto en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. *Tecnociencia Chihuahua.* 4(1):1-6.
- H. Congreso del Estado de Chihuahua. Constitución Política del Estado Libre y Soberano de Chihuahua. Consultado el 07-02-2011.
- Herridge, F. D. 2006. Biological nitrogen fixation: Techniques to enhance. *Encyclopedia of soil Science.* By Taylor and Francis. Pp 169-173.
- Hoegen, B. 1995. Influence of long-term slurry and mineral fertilizer application on the potential soil nitrogen availability (*Auswirkung langjähriger Begullung bzw. Mineralischer Dungung auf das Stickstoff-Nachlieferungsvermögen von Boden*). *Agrobiological Research.* 48(2):115-126.
- Hungria, M. y Stacy, G. 2001. Intercambio de señales moleculares entre planta huésped y *Rhizobio*: aspectos básicos y aplicación potencial en agricultura. *Soil Biol. Biochem.* 29:819-830.
- INIFAP. 2000. Biofertilizante. Desplegable técnica. México, D.F.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (ed.): Principales resultados por localidad 2010 (ITER) - Chihuahua (XLS) (2010). Consultado el 5 de marzo de 2011.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (ed.): Tasa de crecimiento media anual de la población por entidad federativa, 1990 a 2010. 2010. Consultado el 5 de marzo de 2011.
- Informe de la Escuela Particular Mixta de Colonia Morelos al Gobierno del Estado. 2004. Archivo General del Estado de Sonora. Hermosillo. Tomo 1907. Ramo Instrucción Pública. Distrito de Arizpe. Escuela Mixta de Colonia Morelos.
- Islam, M.S.; Kawasaki, H.; Muramatsu, Y.; Nakagawa, Y. and Seki, T. 2008. "*Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72:1416-1429.
- Jarvis, B.D.W.; VanBerkum, P.; Chen, W.X.; Nour, S.M.; Fernández, M.P.; Cleyet-Marel, J.C. y Gillis, M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol* 47(3): 895-898.
- Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacterio* 32:136-139.
- Jourand, P.; Giraud, E.; Bena, G.; A. Sy.; Willems, A.; Gillis, M.; Dreyfus, B. and P. de Lajudie. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultative methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 54:2269-2273.
- Kaminski, P. A.; J. Batut, and P. Boistard. 1998. A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia, *In* H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas (ed.), *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 431-460.
- Khan, A. G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18:355-364.

- Khan, A. G. 2006. Mycorrhizo remediation an enhanced form of phytoremediation. Journal of Zhejiang University SCIENCE B. 7(7):503-514.
- King, L. D. 1990. Sustainable soil fertility practices. In: Sustainable agricultural in temperate zones. Francis C., C.B. Flora, and L.D. King (eds) John Wiley USA p.147-173.
- Kneip, C.; P. Lockhart; C. Voß y U.G. Maier. 2006. Nitrogen fixation in eukaryotes—new models for symbiosis. BMC Evolutionary Biology 7:55.
- Knösel, D.H.1984. Genus IV *Phyllobacterium* nov. rev. In Bergey´s Manual of Syst. Bacteriol. Vol I. p. 254-256.
- Konstantinidis, K. T. and Tiedje, J. M. 2005. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 102:2567–2572.
- Kyei-Boahen, S.; Slinkard, E. A.; Walley, F. L. 2002. Evaluation of rhizobial inoculation methods for Chickpea. Agronomy journal 94:854-859.
- Laguerre, G.; Nour, S.M.; Macheret, V. 2001. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147:981–993.
- Lanzilotta, W. N. and Seefeldt, L. C. 1996. Electron transfer from the nitrogenasa iron protein to the 8Fe-(7/8)S clusters of the molybdenum-iron protein. *Biochemistry* 35:16770-16776.
- Lawrence, J. G. y Hendrickson, H. 2003. Lateral gene transfer: when will adolescence end *Mol. Microbiol* 50:739-749.
- Lee, A. and Hirsch, A. M. 2006. Signals and responses: Choreographing the complex interaction between legumes and α and β -rhizobia, *Plant Signaling and Behavior* 1(4): 161-168.
- Levollay, J. 1988. L´azote et la vie: l´ouvre de Jean Baptiste Boussingault Vies Scientifiques CR5, 59-72.
- Lin, D. X.; Wang, En Tao; Tang, Hui; Han, Tian Xu; He, Yu Rong; Guan, Su Hua; and Chen, Wen, Xin. 2008. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1409-1413.
- Loh, J.; Pierson, E. A.; Pierson, L. S.; Stacey, G. and Chatterjee, A. 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:285-290.
- Lohrke, S. M.; Yang, H. J. and Jin, S. G. 2001. Reconstitution of acetosyringone-mediated *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene expression in the heterogenous host *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:3704-3711.
- López-Lara, I. 2006. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lucy, M.; Reed, E. and Bernard R. Glick. 2004. Applications of free living growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86(1):1-25.
- Lloret, L.; Ormeno-Orrillo, E.; Rincón, R.; Martínez-Romero, J.; Rogel-Hernández, M. A.; and Martínez-Romero, E. 2007. *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Syst Appl Microbiol.* 30 (4):280-290
- Lloyd, Jane-Dale. 2001. Cinco ensayos sobre cultura material de rancheros y medieros del noroeste de Chihuahua, 1886-1910 (México: Universidad Iberoamericana). 168 p.
- Lu, Yang L.; Chen, W.; Feng, H.; Li Li, Wang, En Tao, Zhang, Xiao Xia, Chen, Wen Xin, Han, Su Zhen. 2009. *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* spp. *Int J Syst Evol Microbiol.* Pp 73-93.
- Lynch, J. M. 1990. Beneficial interactions between microorganisms and roots. *Biotech. Adv.* 8:335-346.

- Madigan, M. T. and Martinko, J. M. 2006. Brock Biology of Microorganisms, 11th edn. Pearson Prentice-Hall Upper Saddle River, NJ. Toronto:Prentice-Hall Canada, Inc. 911 p.
- Mantelin, S.; Fischer-Le, M. S.; Zakhia, F.; Bena, G.; Bonneau, S.; Jeder, H.; Philippe de Lajudie and Jean-Claude, Cleyet-Marel. 2006. Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassicacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 56 (4):827.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants (2nd Ed.). Academic Press. 889 p.
- Martens, M.; Delaere, M.; Coopman, R.; De Vos, P.; Gillis, M.; Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 489-503.
- Martínez, D.J.P. 1993. Elementos de la estrategia para el desarrollo agrícola del municipio de Veracruz. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Puebla, Méx., 244 p.
- Martínez, M., L. M. y Reynoso, M., A. 1993. Inmigración Europea y asiática siglo XIX y XX, en Simbiosis de culturales, los inmigrantes y su cultura en México. Bonfil Batalla G.
- Martínez-Romero, E. 2009. Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis?. *DNA Cell Biol.* 28(8):361-70.
- Martínez-Scott, M. M.; Hernández-Hernández, V.; Palomo-Gil, A. y Vásquez-Arroyo, J. 2002. Diversidad genética de rhizobia asociada a cuatro leguminosas arbóreas del noreste de México. En: Revista Chapingo. 3(1):9-18.
- Mayea, S.; Carone, M.; Novo, R.; Boado, I.; Silveira, E.; Soria, M.; Morales, Y. y Valiño, A. 1998. Microbiología Agropecuaria. Tomo II. Ed. Félix Varela. La Habana. p. 156-178.
- Mendoza, L. A. y Aguirre M. J. F. 2002. La biofertilización del cacao *Theobroma cacao* L. con *Azospirillum brasilense* y *Glomus intraradices* en etapas de vivero. Avances de resultados. Primer Congreso Internacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria Chiapas realizado del 19 al 22 de febrero del 2002 en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (Memorias). p. 134.
- Michiels, K.; Vanderleyden J. and Van Gool, A. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: a review. *Biology and fertility of soils.* 8:356-368.
- Morris, C.E.; Bardin, M.; Berge, O.; Frey-Klett, P.; Fromin, N.; Girardin, H.; Guinebretiére, M.H.; and Lebaron, P. 2002. Microbial biodiversity: Approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:592-616.
- Moulin, L. ; Munive, A.; Dreyfus, B. y Boivin, C. 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411:948-950.
- Mulas, D.; Ramírez-Bahena, M.; García-Fraile, H.; Velázquez, E., y González, A. F. 2008. *Rhizobium leguminosarum* is the predominant species found among rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in León (Spain). In: Memorias de 8th European Nitrogen Fixation Conference of Ghent Belgium. Del 30 de agosto al 3 de septiembre.
- Nandasena, Kemanthi; G., O'Hara; Graham, W.; Tiwari, Ravi P.; Willems, A.; Howieson, J. G. 2009. *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:2140-2147.
- Naya, L.; Ladrera, R.; Ramos, J.; Gonzalez, E. M.; Arrese-Igor, C.; Minchin, F. R. and Becana, M. 2007. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Plant Physiol* 144:1104-1114.

- Nogales, B. 2005. Microbiología del suelo en la era de la biología molecular: Descubriendo la punta del iceberg. *Ecosistemas*. 2:1-10.
- Normand, P., Cournoyer, B., Nazareth, S., Simonet, P., 1992. Analysis of a ribosomal RNA operon in the actinomycete *Frankia*. *Gene* 1:119-124
- Núñez, E. R. 2001. Fertilidad de suelos. Área de Fertilidad. Especialidad de Edafología. IRENAT-CP. Montecillos, México. 90 p.
- Núñez-López, D.; Muñoz-Robles, C. A.; Reyes-Gómez, V. M.; Velasco-Velasco, I. and Gadsden-Esparza, H. 2007. Characterization of drought at different time scales in Chihuahua, México. *Agrociencia*. 41(3):253-262.
- Nutman, P. S. 1987. Centenary lecture, *Phil Trans Real Society London B*. 317:69-106.
- Okon, Y.; Fallik, E.; Sarig S.; Yahalom, E. and Tal, S. 1988. Plant growth promoting effects of *Azospirillum*. In De Bruijn. News (eds). Nitrogen fixation: Hundred years After. Fischer Stuttgart. N. Y. p. 741-746.
- Okon, Y. and Labandera, C. A. G. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*. 26: 1591-1601.
- Olalde, P.V. y Aguilera, G.L.I. 1998. Microorganismos y biodiversidad. *TERRA* 16(3):289-292.
- Oldroyd, G.E.D and Downie, J. A. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with *Rhizobial* infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:519-46.
- Olivares, J.; Martin, E. and Recalde-Martinez, L. 1983. Effect of nitrogen and sulphur application and seed inoculation with *Rhizobium leguminosarum* on the yield of beans (*Vicia faba*) in field trials. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 100:149-152.
- Olsen, G. J. and Woese, C. R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7. 113-123.
- Ordoñez, S. 2004. La nueva fase de desarrollo y el capitalismo del conocimiento: elementos teóricos. *Revista Comercio Exterior*, Vol. 54 Núm.1. pp: 4-17.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2008. Current world fertilizer trends and outlook to 2011/12. Electronic publishing policy and support branch. FAO. Rome Italy. p. 57.
- Page, R. D. M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Palacios, V. J.P.; L. Cutz, P. R.; Iglesias, M. y C. Maldonado, V. 2000. La microfauna edáfica y los contaminantes del suelo. En: *La edafología y sus perspectivas al siglo XXI*. Quintero *et al* Ed. Tomo II. P. 439-447.
- Patt, T.E.; Cole, G.C.; Hanson, R.S. 1976. *Methylobacterium*, a new genus of facultative methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26:226-229.
- Patra, A.K.; Abbadie, L.; Clays-Josserand, A.; Degrange, V.; Grayston, S.J.; Guillaumaud, N. 2006. Effects of management regime and plant species on the enzyme activity and genetic structure of N-fixing, denitrifying and nitrifying bacterial communities in grassland soils. *Environ Microbiol* 8: 1005-1016.
- Peng, S.; Biswas, J.C.; Ladha, J. K.; Gyaneshwar P. and Chen, Y. 2002. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agron. J.* 94:925-929.
- Peng, Guixiang, Yuan, Qinghua, Li, Huaxing, Zhang, Wu, Tan, Zhiyuan. 2008. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:2158-2163.
- Pérez, S. y Torralba, A. 1997. La fijación del nitrógeno por los seres vivos. Seminario Fisiología Vegetal, Facultad Biología Oviedo. 21 pp. *Scriptus Naturae* (<http://scriptusnaturae.8m.com>).

- Pérez-Ramírez, N. O.; Rogel, M. A.; Wang, E.; Castellanos, J. Z. and E. Martínez-Romero. 1998. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. FEMS Microbiol. Ecol., 26:289-296.
- Peters, N. K. y Long, S. R. 1998. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Plant Physiology. 88: 396-400.
- Phillips, D. A.; Maxwell, C. A.; Joseph, C. M. and Hartwich, U. A. 1988. Flavonoid nodulation signals in alfalfa. In "Nitrogen fixation: hundred years alter". Gustav Fischer Struttgart, New York. 1:411-415.
- Philippus, D.R.; Kiddle, G.; Pellny, T.K.; Mokwala, P.W.; Jordan, A.; Strauss, A.J.; De Beer, M.; Schlüter, U.; Kunert K.J. y Foyer, C.H. 2008. Regulation of respiration and the oxygen diffusion barrier in soybean protect symbiotic nitrogen fixation from chilling-induced inhibition and shoots from premature senescence. Plant Physiology 148:316-327.
- Pool-Novelo, L.; Trinidad-Santos, A.; Etchevers-Barra, J.; Pérez-Moreno, J. y Martínez-Garza, A. 2000. Mejoradores de la fertilidad del suelo en la agricultura de ladera de Los Altos de Chiapas, México. Agrociencia 34:251-259.
- Punos, L. M. y M. C. Iglesias, 2005. Relación entre el nivel de nodulación y la fertilización nitrogenada en soja, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Resumen: A-051.
- Rademaker, J. L. W.; Henk J. M. y Vinuesa Pablo. 2005. Molecular typing of environmental isolates. In: Molecular Microbial Ecology. Edit. Bios Advanced Methods. Eds. Mark Osborn y Cyndy Smith. New York, Ny. Pag.97-134.
- Ramírez-Bahena, M. H.; García-Fraile, P.; Peix, A.; Valverde, A.; Rivas, R.; Igual, J. M.; Mateos, P. F.; Martínez-Molina, E.; Velázquez, E. 2008. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 58: 2484-2490.
- Ramírez-Bahena, M. H.; Peix, A.; Rivas, R.; Camacho, M.; Rodríguez-Navarro, D. N.; Mateos, P. F.; Martínez-Molina, E.; Willems, A. and Velázquez, E. 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus* Int J Syst Evol Microbiol 59:1929-1934.
- Ramírez-Gama, R. M. y Luna-Millán, B. 1998. Simbiosis asociativas En: Ferrera-Cerrato y Pérez Moreno J. (eds.). Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo Edo. de México, 144 p.
- Redente, E. F. 1981. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhiza *Rhizobium* and their effect on sweetvetch growth. Soil Sci 132(6):410-415.
- Reis F.Jr.; Silva. M.; Teixeira, K.; Urquiaga, S.; Reis, V. 2004. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* asociados a *Brachiaria* spp. em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. R. Bras. Cie. Solo 28:103-113.
- Rengel, Z, and Marschner, P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: Exploiting genotypic differences. New Phytol 168:305-312.
- Revista Comercio Exterior. 2002. La economía del conocimiento. Vol. 52 Núm. 6, México.
- Reyes, I.; Álvarez, L.; El-Ayoubi, H. y Valery, A. 2008. Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimiento y maíz. Bioagro 20(1):37-48.

- Reyes, I.; A. Valery y Z. Valduz. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and Soil* 287(1-2):69-75.
- Rivas, R.; Velázquez, E.; Willems, A.; Viscaino, N.; Subba Rao, N.S.; Mateos, P.F.; Gillis, M.; Dazzo, F.B. y Martínez-Molina, E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol* 68:5217-5222.
- Rivas, R.; Willems, A.; Palomo, J. L.; Gracia-Benavides, P.; Mateos, P.F.; Martínez-Molina, E.; Gillis, M. and Velásquez, E. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. Nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1271-1275.
- Rodríguez, D.; Urrego L.; Martínez, P. y Bernal, J. 2003. Evaluación preliminar de dos matrices para la inmovilización de bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fosforo aislado de bosque alto andino cundinamarqués. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. p. 28.
- Rodríguez, M. N. 1995. Asociación *Rhizobium*-leguminosa. In. Manual de Agromicrobiología. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos, Estado de México. Edit. Trillas. 11-52 p.
- Rodicio, M. y Mendoza, M. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARN 16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Área de microbiología. Universidad de Oviedo. España Cap. 11. p 81-87.
- Rodionov, D. A.; Dubchak, I. L.; Arkin, A. P.; Alm, E. J.; Gelfand, M. S. 2005. Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: Comparative reconstruction of transcriptional networks, *PLoS Computational Biology* 1(5):55.
- Romero-Lima, M. del R.; Trinidad-Santos, A.; García-Espinosa, R.; y Ferrera-Cerrato, R. 2000. Producción de papa y biomasa microbiana en suelo con abonos orgánicos y minerales. *Agrociencia*. 34(3):261-269.
- Rueda-Puente, O. E.; Murillo-Amador, B.; García-Hernández, J. L.; Barrón-Hoyos, J. M.; Precio-Rangel, P.; Tarazón-Herrera, M. A. 2009. Capítulo XII: Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como biofertilizantes en ambientes áridos-salinos. *En: Agricultura orgánica*. Orona-Castillo, I.; Salazar-Sosa, E.; Fortis-Hernández, M.; Trejo-Escareño, H. I.; Vázquez-Vázquez, C.; López-Martínez, J. D.; Figueroa-Viramontes, R.; Zúñiga-Tarango, R.; Preciado-Rangel, P. y Chavarría-Galicia, J.; A. Gómez Palacio, Dgo México, Facultad de Agricultura y Zootecnia de la UJED, Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, COCyTED 2009. (ISBN: 978-607-00-1646-7), p. 259-275.
- Salazar-Sosa, E.; A. Beltrán-M.M.; Fortín-H, J. A.; Leos-R, J.A.; Cueto-W., C.; Vázquez-V. y J.J. Peña-C. 2003. Mineralización de nitrógeno y producción de maíz forrajero con tres sistemas de labranza. *Terra* 21(4):569-575.
- Sandoval, C. E., 1997. Dinámica de crecimiento y nutricional del haba (*Vicia faba* L.) bajo diferentes tratamientos de nitrógeno y humedad. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 104 p.
- Santillana, N.; Arellano, C. and Zúñiga, D. 2005. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum miller*). *Ecología Aplicada*. p. 47-51.

- Sarita, S. A.; Sharma, P. K.; Priefer, U. B.; Prell, J. 2005. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. *FEMS Microbiology Ecology* 54:1-11.
- Sawada, H.; Kuykendall, L.D. and Young J.M. 2003. Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* 49:155-179.
- Schaechter, M.; Kolter, R.; and Buckley, M. 2004. Microbiology in the 21st century: Where are we and where are we going? Report for Amer Acad Microbiol, ASM Press, Washington DC. 19 p.
- Schmeisser, C.; Liesegang, H.; Krysciak, D.; Bakkou, N.; Le Quere, A.; Wollherr, A.; Heinemeyer, I.; Morgenstern, B.; Pommerening-Roser, A.; Flores, M.; Palacios, R.; Brenner, S.; Gottschalk, G.; Schmitz, R. A.; Broughton, W. J.; Perret, X.; Strittmatter; A. W. and Streit, W. R. 2009. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable numbers of secretion systems. *Applied and environmental microbiology*, 75(12):4035-4045.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2009. Costos de producción y precios al productor, <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/> (verificado el 30/09/2009).
- Silva, C.; Eguiarte, L. E. and V. Souza. 1999. Reticulated and epidemic population genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli in a traditionally managed locality in Mexico. *Mol. Ecol.*, 8:277-287.
- Silva, C. y Vinuesa, P. 2007. Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los rizobios. In: *Ecología Molecular* Ed. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. Cap. 11:351-392.
- Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SNIIM). 2008. Mercados nacionales: insumos agrícolas. <http://www.secofi-sniim.gob.mx/> (verificado el 30/09/2009).
- Slatni, T.; Krouma, A.; Aydi, S.; Chaiffi, C.; Gouia, H. y Abdelly, C. 2008. Nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L) subjected to iron deficiency. *Plant Soil* 312:49–57.
- Smith, R. S. and Miller, R. H. 1974. Interactions between *Rhizobium japonicum* and soybean rhizosphere bacterial. *Agronomy Journal*. 66(4):564-567.
- Spaink, H. P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 54:257-288.
- Sprent, J., 2001. "Legume Nodulation". Royal Botanic Gardens, Kew, UK. p. 146.
- Stahl, D. A. and Tiedje, J. M. 2002. Microbial ecology and genomics: a crossroads of opportunity. Report Amer Acad Microbiol, ASM Press, Washington DC. Available at: <http://www.asm.org/Academy/index.asp?bid=2124>
- Steenhoudt, O., and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects *FEMS Microbiol. Rev.* 24:487-506.
- Strozycki, P. M.; Szczurek, A.; Lotocka, B.; Figlerowicz, M. and Legocki, A. B. 2007. Ferritins and nodulation in *Lupinus luteus*: iron management in indeterminate type nodules. *Journal of Experimental Botany* 58(12):3145-3153.
- Suneja, P.; Dudeja, S. S. and Narula, N. 2007. Development of multiple co-inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants. *Archives of Agronomy and Soil Science.* 53(2):221-230.

- Swofford, D. L. 2002. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sylvester-Bradley, R.; Kipe-Nolt, J. A. y Harris, D. J. 1985. Evaluación, selección y manejo de sistemas leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Guía de estudio del curso intensivo realizado del 18 de noviembre al 13 de diciembre de 1985 en la Universidad Federal de Río Grande do Sul. Departamento do solos. Facultad do Agronomía. Porto Alegre, Brasil. 79 p.
- Sy, A.; Giraud, E.; Jourand, P.; Garcia, N.; Willems, A.; de Lajudie, P.; Prin, Y.; Neyra, M.; Gillis, M.; Boivin-Masson C. y Dreyfus, B. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. 183:214-220.
- Tamura, K.; Dudley J.; Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Tate III, R. L. 1995. Soil microbiology. John Wiley and Sons, New Cork, USA.
- Thrall, P. H.; Millsom, D. A.; Jeavons, A. C.; Waayers, M.; Harvey, G. R.; Bagnall, D. J. y Brockwell, J. 2005. Seed inoculation with effective root-nodule bacteria enhances revegetation success. Journal of Applied Ecology 42:740-751.
- Trichant, J.C.; Drevon, J.J. y Rigaud, J. 2001. Symbiotic nitrogen fixation. In "Nitrogen assimilation by plants", J. F. MorotGaudry, May St, PO Box 699, Enfield, NH 03748, USA, p. 121-134.
- Trujillo, M. E.; Willems, A.; Abril, A.; Planchuelo, A-M.; Rivas, R.; Ludena, D.; Mateos, P. F.; Martínez-Molina, E. and Velázquez, E. 2005. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupine* sp. nov, Applied and Environmental Microbiology, 71(3):1318–1327.
- Uribe, V. G. 2000. Parcelas de validación establecidas por técnicos PEAT, ZINDER e Investigadores del INIFAP en Yucatán. En: Informe anual de labores del Campo Experimental Mochochá. Centro de Investigación Regional del Sureste.
- Urzúa, H. 2005. Beneficios de la fijación simbiótica de nitrógeno en Chile, Cien. Inv. Agr. 32(2):133-150.
- Valles de la Mora, B., G. Cádich y A. Aluja, 2003. Comparación de metodologías de isotopos para evaluar fijación de nitrógeno atmosférico y su destino en suelo y plantas, Agrociencias 37(02):17-128.
- Valverde, A.; Velázquez, E.; Gutiérrez, C.; Cervantes, E.; Ventosa, A.; Igual, M. J. 2005. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Int. J. Syst. Evol. Bacteriol. 53:1979-1983.
- van Berkum, P.; Terefework, Z.; Paulin, L.; Suomalainen, S.; Lindstro, M. K. and Eardly, B. D. 2003. Discordant phylogenies within the rrn loci of rhizobia. J Bacteriol. 185:2988-2998.
- Vandamme, P. and Coenye, T. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:2285-2289.
- Vandamme, P. ; Goris, J. ; Chen, W.M. ; de Vos P. and Willems, A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *System. Appl. Microbiol.* 25:507-512.
- Van Rhijn, P., y J. Vanderleyden, 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiological Reviews 59(1):124-142.
- Vidal, C. ; Chantreuil, Cl.; Berge, O.; Maure, L.; Escarre, J.; Bena, G.; Brunel, B.; Cleyet-Marel, Jean-Claude. 2009. *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiotic of

- Anthyllis vulneraria* growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59:850-855.
- Villarreal, A. A.; Corlay, Ch. L.; Robledo, S. E.; Álvarez, S. M. E.; Vargas, H. M. y Perez, N. J. 2000. Poblaciones microbianas del suelo en la conversión a labranza de conservación. La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. R. Quintero-Lizaola *et al.* P. 429-443.
- Villegas, M.C. y A. Munive. 2005. Taxonomía y genética de la nodulación de los rhizobia, el grupo más importante de fijadores simbióticos de nitrógeno. *Biótica* 2(1):55-106.
- Villegas, M.C.; Rome, S.; Mauré, L.; Domergue, O.; Gardan, L.; Cleyet-Marel J.C. and Brunel, B. 2006. Nitrogen-fixing *Sinorhizobium* with *Medicago laciniata* constitute a novel biovar (bv. medicaginis) of *S. meliloti*. *Systematic and Applied Microbiology* 29(7):526-538.
- Vinuesa, P.; Silva, C.; Lorite, M. J.; Izaguirre-Mayoral, M. L.; Bedmar, E. J. and Martínez-Romero, E. 2005. Molecular systematic of rhizobia based on maximum likelihood and bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of Sesbania microsymbionts from Venezuelan wetlands. *Syst Appl Microbiol* 28:702-716.
- Vinuesa, P.; Silva, C.; Werner, D. y Martínez-Romero, E. 2005b. Population genetics y phylogenetic inference in bacterial molecular systematic: the roles of migration y recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion y delineation. *Mol. Phylogenet. Evol.* 34:29-54.
- Vinuesa, P.; Rojas-Jimenez, K.; Contreras-Moreira, B., Mahna, S.K.; Prasad, B. N.; Moe, H.; Selvaraju, S. B.; Thierfelder, H. and Werner H. 2008. Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Appl. Environ. Microbiol* 74: 6987-6996.
- Volke, V. y Sepúlveda, I. 1987. Agricultura de subsistencia y desarrollo rural. Trillas. México.
- Vriezen, J. A.; F. J. De Bruijn. and K. Nusslein, 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and environmental microbiology* 73(11):3451-3459.
- Walley, F.; Clayton, G.; Gan, Y. and Lafond, G. 2004. Performance of rhizobial inoculant formulations in the field. Online. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-03-RV.
- Wang, E. T. and E. Martínez-Romero. 2000. Sesbania herbacea-Rhizobium huautlense nodulation in flooded soils and comparative characterization of S. herbacea nodulating rhizobia in different environments. *Microbial Ecol* 40:25-32.
- Wang, Feng Qin; Wang, En Tao; Liu, Jie; Chen, Qiang; Sui, Xin Hua; Chen, Wen Feng; Chen, Wen Xin. 2007. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1192-1199.
- Wani, S. P.; Rupela O. P. and Lee, K. K. 1997. Soil mineral nitrogen concentration and its influence on biological nitrogen fixation of grain legumes. *In: Extending nitrogen fixation research to farmers fields. Procc. of a international workshop on managing legume nitrogen fixation in the cropping systems of Asia, 20-24 Aug 1996. ICRISAT, Asia Center, Rupela, O., Johansen, C. and Herridge, D. F. (eds) Andhra Pradesh. India. P. 183-198.*
- Weir B. S.; Turner, S. J.; Silvester, W. B.; Duck-Chul, P. and J. M. Young. 2004. Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 70(10):5980-5987.

- Weir, B. S. 2008. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: 16th November, 2008.
- Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of rhizobia. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: 13 March, 2011.
- Wernegreen, J. y Riley, M. A. 1999. Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic y housekeeping loci: A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Mol. Biol. Evol.* 16:98-113.
- Wertz S.; V. Degrange; J. I. Prosser; F. Poly; C. Commeaux; T. Freitag; N. Guillaumaud, and X. Le Roux. 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8(12):2162-2169.
- Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plant inoculate with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*. 69:99-151.
- Willems, A.; Munive, A.; De Lajudie, P. and Gillis, M. 2003. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *Syst. Appl. Microbiol.* 26:203-210.
- Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287:3-14.
- Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Yano, Y.; Hotta I. and Nishiuchi, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Pelleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comn. Nov. and *Ralstonia eutropha* comb. nov. *Microbiol. Immunol* 39:897-904.
- Yeh, K. C.; M. C. Peck, and S. R. Long. 2002. Luteolin and GroESL modulate in vitro activity of NodD. *J. Bacteriol.* 184:525-530.
- Young, J. M.; L. D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr and Sawada, H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al*, 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 51:89-103.
- Young, J. M.; Kuykendall, L. D.; Martinez-Romero, E.; A. Kerr and Sawada, H. 2003. Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium*-a reply to Ferrand *et al*, 2003. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 53:1689-1695.
- Zahir A. Z.; H. M. Yasin; Naveed, M.; Anjum M. A. and Khalid, M. 2010. L-Tryptophan application enhances the effectiveness of *Rhizobium* inoculation for improving growth and yield of mungbean (*Vigna Radiata* (L.) Wilczek Pak. J. Bot., 42(3):1771-1780.
- Zahran, H. H. 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnology* 91:143-153.
- Zehr, J. P.; Jenkins, B. D.; Short, S. M. and Steward, G. F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: across-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539-554.
- Zheng Z.; S. Schwartz; L. Wagner and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences, *J Comput Biol.* 7(1-2):203-214.
- Zhulin, I. B.; Sarmiento, L. E. and Taylor, B. L. 1995. Changes in membrane potential upon chemotactic stimulation of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetic-physiology-ecology. Fendrik, I., Del Gallo, M., Vanderleyden, J. and De Zamaroczy, M. Eds. NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg; Germany. 37:299-305.

- Zuberer D. A. 1994. Recovery and enumeration of viable bacteria. In: Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. p. 119-144.
- Zurdo-Pineiro, J. L.; Rivas, R.; Trujillo, M.; Vizcaíno, E.; Carrasco, N.; Chamber, J. A.; Palomares, M.; Mateos, A.; Martínez-Molina, P.; Eustoquio, P.; Velázquez, E. 2007. *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain Int J Syst Evol Microbiol 57:784-788.

ANEXOS

Medio Agar Levadura Manitol (YMA) 1lt.

Extracto de levadura 1 gr

Manitol 10 gr

KH_2PO_4 0.05gr

Glutamato de sodio 0.5 gr

NaCl 0.05 gr

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1g en 100 ml) 10 ml

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.28 en 100 ml) 1 ml

$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (0.666g g en 100 ml) 1 ml

Agar 18 gr

Ajustar el pH del medio a 6.8

Medio TY 1lt.

Solución 1 Triptona 5 gr

Extracto de levadura 3 gr

Diluirlo en 990 ml de agua destilada.

Solución 2 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.3 gr

Diluirlo en 10 ml de agua destilada

Esterilizarlas cada una por separado y mezclar al preparar el medio

Claves de las cepas

Origen de las cepas en estudio

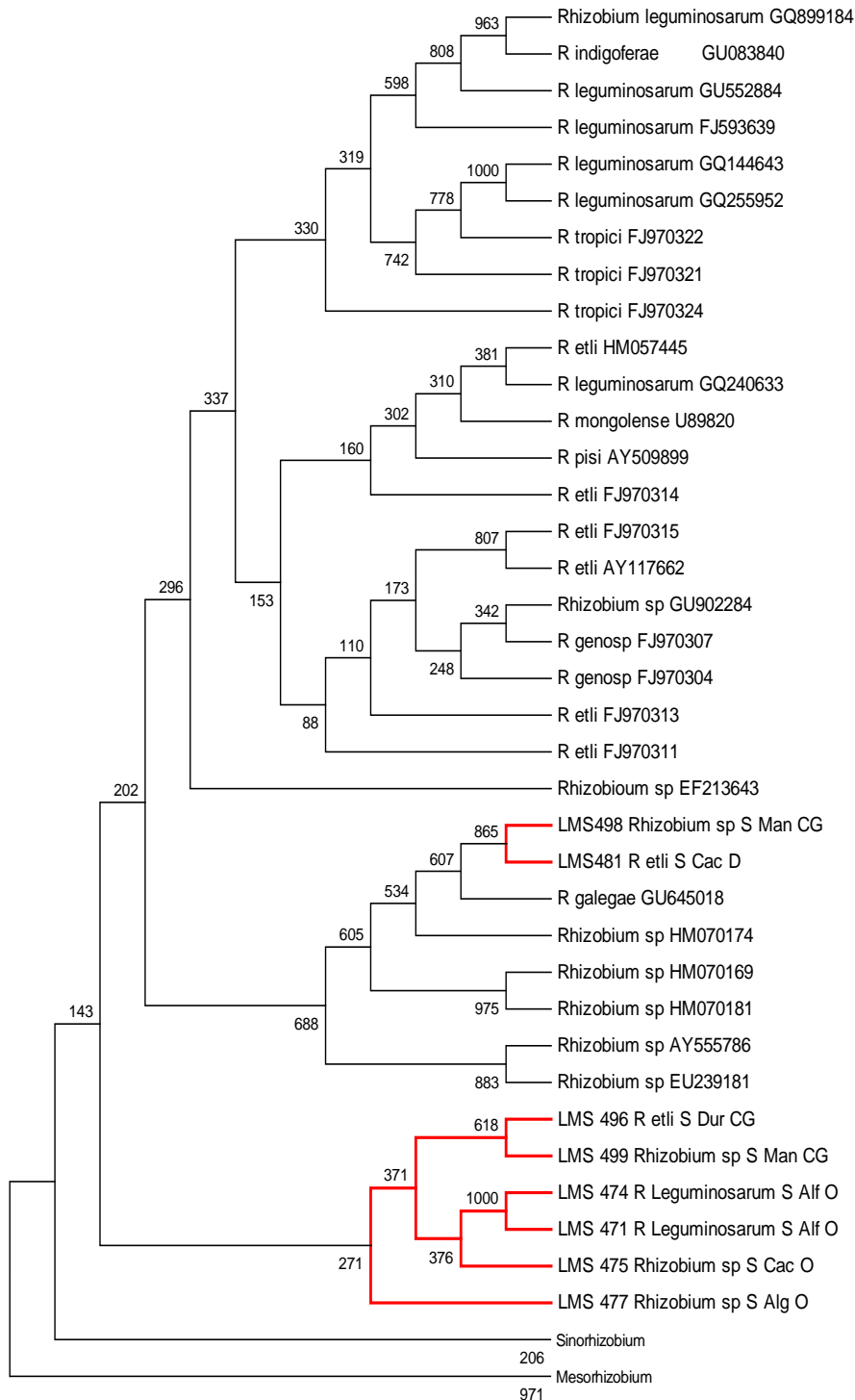


Figura Anexo. Dendrograma basado en el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA. Cepas aisladas de 3 localidades de Chihuahua agruparon dentro del género *Rhizobium*, donde se presenta las cepas obtenidas de NCBI y el origen de los aislamientos de este estudio, sin la escala de diversidad genética.

Claves de las cepas

Origen de las cepas en estudio

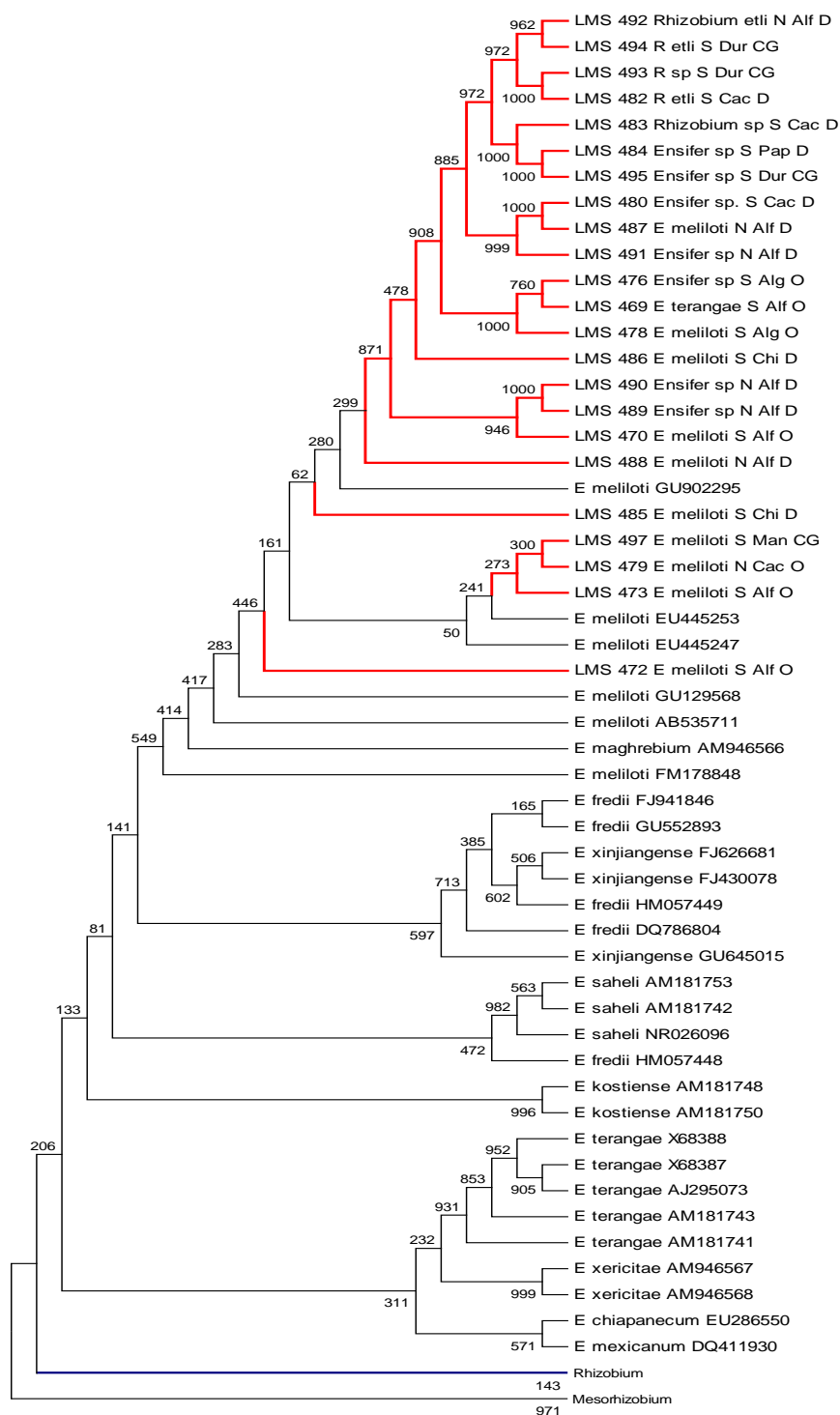


Figura Anexo. Dendrograma basado en el análisis de las secuencias del gen 16S rDNA de cepas agrupadas dentro del género de *Ensifer* y un pequeño grupo de *Rhizobium*, donde se presenta las cepas obtenidas de NCBI y el origen de los aislamientos de este estudio, sin la escala de diversidad genética.