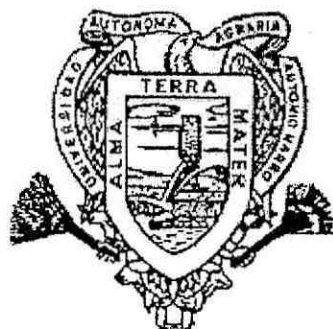


UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



SUPRESIÓN DE LA NODULACIÓN EN FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris*) BAJO CONDICIONES DE TEMPORAL EN  
GUADALUPE VICTORIA DURANGO.

TESIS  
QUE PRESENTA  
MAIRA MARGARITA OLVERA MINOR  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

**INGENIERO EN AGROECOLOGÍA**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA

“ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

SUPRESIÓN DE LA NODULACION BAJO CONDICIONES DE  
TEMPORAL EN GUADALUPE VICTORIA DGO.

TESIS

QUE PRESENTA

MAIRA MARGARITA OLVERA MINOR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

APROBADO POR:



DR. JESUS VAZQUEZ ARROYO

ASESOR



DR. ESTEBAN FAVELA CHÁVEZ

ASESOR



M.C. EDUARDO BLANCO CONTRERAS

ASESOR

ING. ELISEO RAYGOZA SÁNCHEZ

ASESOR

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CARRERAS AGRONOMICAS



ING. ROLANDO LOZA RODRÍGUEZ

TORREÓN, COAHUILA

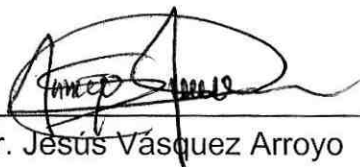
COORDINACION DE LA DIVISION  
DE CARRERAS AGRONOMICAS  
UAAAN UL

MARZO 2002

TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

PRESIDENTE

  
Dr. Jesús Vásquez Arroyo


VOCAL

  
M.C. Eduardo Blanco Contreras

VOCAL

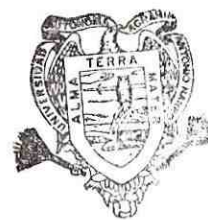
  
Dr. Esteban Havela Chávez

VOCAL SUPLENTE

  
M.Sc. Emilio Duarte Ayala

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE  
CARRERAS AGRONÓMICAS

  
ING. ROLANDO LOZA RODRÍGUEZ



COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN  
DE CARRERAS AGRONÓMICAS  
UAAAN UL

## **DEDICATORIA**

**A DIOS** POR TODO LO QUE ME RODEA POR PONER EN MI CAMINO COSA BUENAS Y MALAS POR DARME LA VOLUNTA Y LA FE PARA SEGUI ADELANTE POR DARME UNA FAMILIA, AMIGOS, COMPAÑEROS POR DARME LA CAPACIDAD DE AMAR Y PERDONAR POR SER UNA FUENTE DE INSPIRACIÓN EN MI VIDA POR APRENDER DE TU EJEMPLO.

**A MI MAMÁ** POR SER UNA PERSONA QUE SIEMPRE ME ENSEÑO EL CAMINO SIN INTERRUMPIR NUNCA MIS DECISIONES PERO SIEMPRE CONTAR CON ELLA CUANDO ME EQUIVOCO POR COMPARTIR MIS LOGROS Y FRACASO POR SER MI AMIGA ANTES QUE MI MADRE.

**A MI PAPÁ** POR SIEMPRE CONTAR CONTIGO POR COMPARTIR BELLOS MOMENTOS POR APRENDER DE TI.

**A MIS HERMANOS** POR SIEMPRE COMPARTIR JUNTOS HERMOSOS RECUERDOS, POR CUIDAR DE MÍ, POR ENSEÑARME EL CAMINO CON SU EJEMPLO POR SER UNA FUENTE DE APOYO FUNDAMENTAL EN MI VIDA.

**GORDO** POR TODO EL AMOR QUE SIEMPRE ME DEMUESTRAS POR TODO LO MARAVILLOSO QUE ERE POR TU APOYO Y COMPRENSIÓN.



## **AGRADECIMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO "NARRO" U.L** POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD SER UN PROFESIONISTA POR DARME LAS HERRAMIENTAS CON QUE ME DEFENDERE EN LA VIDA.

**DR, JESÚS VAZQUEZ ARROYO** POR TODA SU DEDICACIÓN POR TODO SU TIEMPO POR SER UN HOMBRE COMPROMETIDO EN TODO LO QUE REALIZA POR TRASMITIRME CONOCIMIENTOS PARA REALIZARME COMO PROFESIONISTA.

**A MIS MAESTROS:** M.C LUIS R. CASTAÑEDA, M.C, EDUARDO BLANCO, BIOL, PATRICIA GUZMÁN, BIOL. GENOVEVA HERNÁNDEZ, POR SU TIEMPO DEDICACIÓN, ESFUERZO Y POR TODOS SUS CONSEJOS QUE FUERON PARTE FUNDAMENTAL EN MI FORMACIÓN COMO PROFESIONISTA.

**MAGO** GRACIAS POR TODOS TUS CONSEJOS Y REGAÑOS POR SER UNA BUENA AMIGA.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS** ALVARO. PATY JESSICA, JANNETH, POR TODOS LOS RECUERDOS HERMOSOS QUE QUEDARAN GRABADOS EN MI MENTE, POR COMPARTIR MÍS AÑOS DE ESCUELA A SU LADO.

## Índice de Contenido

Contenido	Página
Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Índice de contenido	iii
Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
Resumen	viii
<b>1.0. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.01. Objetivos</b>	<b>2</b>
1.01.1. Objetivo general	3
1.01.2. Objetivo particular	3
<b>1.02. Hipótesis</b>	<b>3</b>
<b>2.0. Revisión de Literatura.</b>	<b>4</b>
<b>2.01.</b> Fijación simbiótica de nitrógeno	4
<b>2.02.</b> Genética de la fijación simbiótica de nitrógeno	5
<b>2.03.0.</b> Nodulación	7
2.03.1. Señales de intercambio entre el <i>Rhizobium</i> y la planta huésped	10
2.03.2 Control de genes de expresión <i>nod</i>	11
2.03.3. Estructura de la señal <i>nod</i> y especificidad al huésped	12
<b>2.04.0.</b> Percepción y traducción de la señal Nod	14
2.04.1. Percepción de la señal Nod	15
2.04.2. El flujo de iones que induce al factor Nod	18
2.04.3. Genes de la planta asociados con la nodulación	20

<b>2.05.0.</b> Control del desarrollo del nódulo	22
2.05.1. Aprovechamientos genéticos	24
2.05.2. Control fisiológico de la nodulación y la función de los reguladores de crecimiento	25
2.05.3. Evitando los mecanismos de defensa de la planta	26
<b>3.0. Materiales y Métodos.</b>	
3.01. Sitios de muestreo	28
3.02. Análisis de suelos	28
..... <b>3.01.0.</b> Obtención de muestras de plantas	29
3.01.1. Peso fresco	29
3.01.2. Conteo de nódulos por planta	29
3.01.3. Peso seco	29
<b>3.02.0.</b> Ensayo en Invernadero	29
3.02.1. Dilución del suelo para la obtención de inóculos	30
3.02.2. Métodos de esterilización de las semillas y el establecimiento de macetas al azar en el invernadero	30
3.02.3. conteo de nódulos por planta obtenidos en el ensayo del invernadero	31
<b>4.01.1.</b> Obtención de aislados de <i>Rhizobium spp</i>	32
<b>5.0. Resultados y Discusión</b>	32
5.01. Análisis de suelo	32
5.02. Peso fresco y seco	33
5.03. Nodulación de plantas en campo	34
5.04. Nodulación del ensayo en invernadero.	36

<b>6.0. Conclusiones</b>	40
<b>7.0. Recomendaciones</b>	41
<b>8.0. Literatura citada</b>	42
<b>9.0. Apéndice</b>	48
9.01. Análisis de varianza de las muestras de campo con un diseño Completamente al azar	48
9.02. Análisis de varianza de las muestras del ensayo del invemadero con un diseño bifactorial Completamente al azar	48



## Indice de figuras

### Contenido.

Figura 1. Vista microscópica de la bacteria <i>Rhizobium</i> .	4
Figura 2. Los rhizobios agrupados en la superficie de la raíz	8
Figura 3. rhizobios adheridos al pelo de raíz comenzando a invadir la raíz	9
Figura 4. Esquema representativo de algunas señales activadas en factores Nod en los pelos de la raíz en una etapa temprana de la simbiosis	19
Figura 5. Etapas del desarrollo del nódulo	23
Figura 6. Resultados del peso fresco y seco	33
Figura 7. promedio de nodulación por planta de las ocho parcelas	36
Figura 8. Comportamiento de nodulación de los tres tratamientos en el invernadero	38

## Indice de Tablas

### Contenido.

Tabla 1. Inducción de genes en pelos radiculares en la simbiosis	14
Tabla 2. Biología y respuesta molecular de los pelos de la raíz de la legumbre ante el factores Nod	17
Tabla 3. Resultado de la muestra de la primera distribuido al azar de las macetas en el invernadero	31
Tabla 4. Resultado de la muestra de la segunda distribución al azar de las macetas en el invernadero	31
Tabla 5. Características fisicoquímicas de los suelos analizados en la localidad de Guadalupe Victoria Durango	33
Tabla 6. Temperatura mínimas y máxima de Dic-01-Ene-02	39
Tabla. 7. Análisis de varianza de las muestras de campo con un diseño Completamente al azar	48
Tabla. 8 Análisis de varianza de las muestras del ensayo del invernadero con un diseño bifactorial Completamente al azar	48

## RESUMEN

En este estudio se evaluó la supresión de la nodulación del frijol bajo condiciones de temporal en Guadalupe Victoria Durango, se llevo acabo en dos sitios experimentales, uno en el municipio de Guadalupe Victoria Dgo., en donde se seleccionaron ocho parcelas con la finalidad de valorar si existían diferencias significativas entre las labores culturales efectuadas con maquinaria y animales con un periodo comprendido de May-2001, Ene-2002, y un segundo sitio en el invernadero de las instalaciones de la UAAAN-U:L en donde se sometieron a estudio cinco variedades de frijol y tres tratamientos de suelo (por el método de dilución para inocular las semillas de frijol), con un periodo de duración de Dic-2001, Ene-2002.

En ambos objetos de estudio no se encontraron diferencias significativas.

## 1.0. Introducción

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una fuente de proteína, elemento esencial para la nutrición de las poblaciones de América latina y otros países en vías de desarrollo ya que como muchas leguminosas es capaz de establecer una asociación simbiótica la cual fija nitrógeno atmosférico (Martínez-Romero., Hernández-Lucas. et al. 1998).

La fijación de nitrógeno por la simbiosis entre leguminosas y bacterias provee beneficios como el nitrógeno a bajo costo para el insumo agrícola, mejora los rendimientos y la calidad de los cultivos. Además mejora la calidad de los forrajes, protege al suelo de la erosión y a los mantos freáticos de contaminación de fertilizantes nitrogenados (Contreras., Thamason. et al. 1994).

El *Rhizobium spp* es una bacteria Gram. negativa que fija nitrógeno en cultivos de frijol colonizando en las raíces donde forma una estructura llamada nódulo en donde el proceso de infección incurre un varios eventos como son; el encrespar el pelo de la raíz seguido de una división cortical de la celular a la cual le precede la formación del cordón de infección por el cual la rhizobia penetrara al pelo radicular y dará origen al nódulo. Para lograr el acontecimiento de la nodulación debe de existir una compatibilidad entre el *rhizobium* y el ordenador principal de la planta (Stacey. 1995).

Además de la incompatibilidad entre los socios simbióticos existen otros factores que limitan el proceso de nodulación que incurren de manera negativa en los procesos de producción. Los factores que impiden la nodulación se clasifican en dos tipos los controlables y los no controlables:

Los factores controlables son; la disponibilidad de alimento, los sistemas de cultivo (recurrir al monocultivo), etc. Los factores no controlables son; la temperatura, la humedad, etc. (Garet 1998).

Existen una serie de señales implicadas entre las leguminosas y las bacterias que son la expresión de los genes:

Los flavonoides son sustancias que excreta la planta para lograr la atención de las bacterias por lo tanto las plantas son las encargadas de activar la primer señal.

Una vez que los flavonoides logran la atención de la bacteria estas emiten una señal hacia la planta llamada factor Nod (segunda señal) activando así el procesos de nodulación. (Irving, Boukli et al. 2000).

Sin embargo existe una diferencian entre los genes comunes de nodulación *nodA*, *nodB*, *nodC* y en genes *nod* que son los encargados de definir si el hospedero es el correcto Además existe una regulación de los genes que fijan nitrógeno efectuado a base del gen *nodD*. El producto de este gen interactúa con las flavonoides características producidas por la planta, y la que es responsable de la especificidad de la simbiosis. Debido a la interacción con los flavonoides de la planta, la proteína NodD que es la que activa la transcripción de genes por su parte tiene una caja de nodulación. Esta se encuentra en la región promotora de los genes regulados por *nodD*. La expresión de estos genes es específica para la simbiosis (Stacey. 1995).



### **1.01 Objetivo General**

Determinar cuales son las principales causas que impiden una nodulación efectiva entre el *Rhizobium spp* y el frijol de temporal en Guadalupe Victoria Dgo.

#### **1.01.1 Objetivo Particular**

Determinar las condiciones que influyen en el proceso negativo de la nodulación e impiden una fijación de nitrógeno efectiva en el suelo.

#### **1.01.2 Hipótesis**

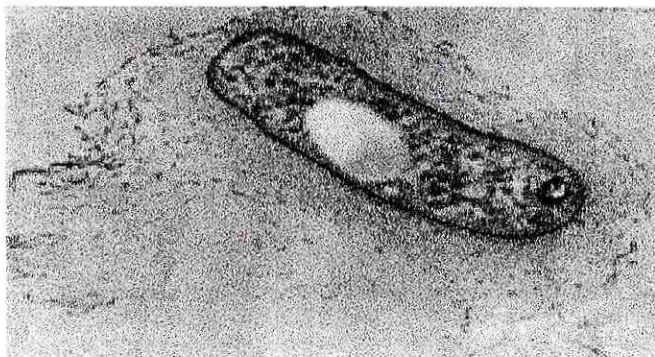
Existen efectos negativos por factores externos controlables (manejo de cultivos, contenidos nutricionales pobres, pH, etc) y factores no controlables (como lo son la sequía)

## 2.0. Revisión de Literatura.

### 2.01. Fijación simbiótica de nitrógeno

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es el segundo cultivo más importante en México y es la principal fuente proteica de la dieta de los (Hernández 2001).

En el suelo se encuentran microorganismos que son de vital importancia para una mejora física del suelo y de las cosechas. Generalmente se presentan bacterias del género *Rhizobium*, la cual induce la formación de nódulos y la fijación de nitrógeno en varias regiones de México y Sudamérica (Aguilar, López et al. 1998). El *Rhizobium* es una bacteria Gram.-negativa aerobia que dentro del proceso de la simbiosis se encuentra en la raíz de la planta en estructuras llamadas nódulos (Bauer. 2001)



**Fig.1.** *Rhizobium* en estado libre se encuentra rodeada de una cápsula compuesta por exopolisacáridos que evita su desecación.

La simbiosis entre el *Rhizobium* y las leguminosas es un proceso de interacción entre la planta y las bacterias en donde la bacteria invade la raíz e induce a la formación de estructuras llamadas nódulos en el cual se fija el nitrógeno atmosférico y lo transforma a amonio como suministro para la planta. Existen diferentes tipos de simbiosis fijadoras de nitrógeno entre plantas y bacterias pero la más estudiada debido a sus importancias en términos de fijación global de nitrógeno es sin duda leguminosas-*rhizobium* (Young and Johnston 1989).

Los sistemas sostenibles de cultivo se han convertido en el futuro para los países en vías de desarrollo. Una rotación de los cultivos en la que se incluyan la legumbre y el microsimbionte que generalmente son las bacterias: *Rhizobium*, *bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, y *Sinorhizobium*, es una alternativa para dichos sistemas. La fijación simbiótica del nitrógeno es una de las características más importantes a considerar en la producción de los países del tercer mundo, se puede realizar una comparación de la capacidad simbiótica de las bacterias relacionada con los fertilizantes comerciales en donde un ejemplo claro es el cultivo de la alfalfa que después de una cosecha logra fijar de 400 a 500 kg/ha. (Garet 1998).

Además de fijar nitrógeno el, *Rhizobium* es capaz de inhibir el crecimiento de algunos hongos patógenos que infectan a la planta a través del sistema radicular tanto en leguminosas como no leguminosas ya que, producen un antibiótico tóxico llamado rhizobiotóxina (composición no especificada aun) (Woo, Park et al. 1999).

La fijación simbiótica de nitrógeno entre leguminosas y bacterias provee beneficios como lo son: la obtención de nitrógeno a bajo costo, mejora la productividad, la calidad y la digestibilidad de los productos para consumo humano o para forrajes, protege al suelo de la erosión y de la contaminación de aguas subterráneas por fertilizantes de uso comercial nitrogenados (Contreras, Thamason et al. 1994).

## **2.02. Genética de la fijación simbiótica de nitrógeno.**

Una característica general de la simbiosis es que ninguna cepa bacteriana puede nodular a todas las leguminosas ya que cada cepa tiene un rango de hospedero definido (Young and Johnston 1989).

Muchos de los géneros bacterianos que se encuentran dentro de la subdivisión de *Proteobacteria* que infectan las raíces y los vástagos de las plantas leguminosas son los responsables de la formación de una nueva estructura denominada nódulo. Dentro de los nódulos las bacterias se distinguen por convertirse en bacteroides, los cuales realizan la fijación de nitrógeno y que



generalmente se alimentan del carbono como fuente de energía que les brinda el hospedero. Las bacterias que fijan nitrógeno han estado disponibles para la agricultura por más de 1000 años, sin embargo, existe una, amplia variación en la cantidad de nitrógeno que fijan, lo cual es atribuido a los fenotipos específicos y a las características simbióticas de poblaciones nativas, en las que se presentan problemas de competitividad la momento de establecerse la formación de nódulos (Robleto, Kmiecik et al. 1998).

Existen varios procesos moleculares para la regulación y asimilación del amonio y  $\text{CO}_2$  que se fija en la simbiosis de la leguminosa *Rhizobium*. El intercambio metabólico que se establece en la simbiosis entre el Carbono y el nitrógeno es de suma importancia, ya que, la planta provee al bacteroide de energía a través de esqueletos de carbono en los que se incluyen los ácidos dicarboxílicos y las sacarosas para la actividad de la nitrogenasa. En los nódulos las enzimas fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPc) y malato deshidrogenasa cataliza, y la degradación de sacarosa a oxaloacetato y malato a través de las reacciones de carboxilación, (reducción respectiva de la actividad de los PEPc que provee del 25 al 40% del carbono total a la simbiosis) en los nódulos, el nitrógeno fijado por los bacteroides es donado a la planta en forma de amonio e incorporado a moléculas orgánicas a través de la calización de las enzimas glutamino sintetasa (Gs) y glutamato sintasa (Hernández 2001).

En la biología de la fijación de nitrógeno del fríjol y su microsimbionte *R. etli*, dado que en el suelo existen grupos muy heterogéneos, se han identificado dos tipos de simbioses: el simbiote uno, caracterizado por un limitado rango de hospederos para lograr la nodulación, y el simbiote dos, que tiende a extender su rango de hospederos en donde las características genéticas de cada uno intervienen negativamente en el establecimiento de la nodulación (Moawad, Badr et al. 1998).

La fijación simbiótica del nitrógeno en las leguminosas depende principalmente de la compatibilidad y la eficacia de ambos socios simbióticos, los cuales son resultados de una variación de una leguminosa abundante en proteínas y una prospera cosecha (Garet 1998).

Genéticamente existen relaciones específicas plantas-bacterias para la que cada tipo de *Rhizobium* tengan un definido tipo de planta hospedadora con la que es capaz de formar nódulos como por ejemplo: *Bradyrhizobium japonicum* forma una simbiosis con *Glycine max*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* con *Pisum sativa* o *Vicia faba*, *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* con *Caulinodans* y *Susbania rostrata*, mientras que, *Azorhizobium caulinodas* es capaz de fijar nitrógeno fuera de sus plantas hospederas (Bauer. 2001).

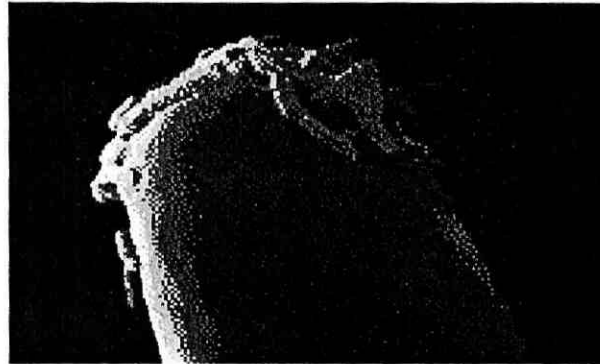
### **2.03. Nodulación.**

En cosechas de leguminosas pueden existir cepas inoculantes con el *Rhizobium* y dar como respuesta en la planta la reacción de la bacteria que se traduce en la formación de nódulos. La relación que existe entre la formación del nódulo y la bacteria se basa principalmente en la interacción del genotipo de planta que se considera hospeder, en el caso específico del frijol, debe ponerse atención en que para poder lograr una mejor y eficiente fijación simbiótica es un proceso largo y gradual. El sistema tiene que mostrar el potencial de las cepas al multiplicarse y mayor eficacia que las que normalmente se encuentran en el suelo (Kay, Coutinho et al. 1994).

Los pelos radiculares se localizan al final de la zona apical de las células epidérmicas donde se extienden su crecimiento colonizando el suelo en el que se forman asociaciones de microorganismos especialmente los fijadores de nitrógeno que proveen carbohidratos, en el suelo se localizan bacterias a las que se les nombran en conjunto rhizobia, la atracción que hay entre los microsimbiontes y los pelos radiculares es que estos secretan una variedad de sustancias entre las que se incluyen los flavonoides. Una vez que se inicia la nodulación en el interior del nódulo se localizan proteínas involucradas en la nodulación. Aunque no siempre se producen en las plantas los factores nodulantes también las hormonas provocan una deformación en la síntesis radicular e inducen a la división celular en el interior o exterior de la corteza celular de los pelos radiculares (Irving, Boukli et al. 2000).



El proceso de invasión de las bacterias en las leguminosas se lleva a cabo en los pelos radiculares, al estar en contacto con la planta y a través de la producción de los factores *nod* las bacterias penetran a través de canales de infección por los que se forman túneles transcelulares durante el proceso de penetración, en la simbiosis, las bacterias no quedan alojadas en el citoplasma de la planta sino en vesículas rodeados por una membrana citoplasmática de la célula vegetal (Bauer. 2001).



**Fig.2.** Los rhizobios están agrupados en la superficie de la raíz.

Las leguminosas pueden exudar a través de las raíces o a través de las semillas compuestos químicos llamados flavonoides, los cuales entran en contacto con las bacterias del suelo y son asimilados por las mismas logrando el desencadenamiento de una serie de procesos que determinan la producción de proteínas diferentes encargadas del rizado del pelo radicular (si el ingreso es a través de la raíz) o dan ordenes a las bacterias para que penetren por heridas o lenticelas radicales para producir el nódulo (Bellone. 2001).

Una vez que existen los nódulos las bacterias son convertidas en bacteroides (células más grandes que el *Rhizobium*) llevando a cabo la fijación de nitrógeno a través de las enzimas nitrogenasas la cual es la responsable de la conversión del nitrógeno molecular a amonio y la planta lo utiliza para sí misma, mientras que la bacteria utiliza moléculas orgánicas que le proporciona la planta. Los nódulos de color rojo presentan esa tonalidad a causa de una proteína llamada leghemoglobina, después de la etapa de fijación de nitrógeno se convierte en una tonalidad que llega a ser verde debido a la conversión de leghemoglobina en biliverdina (Bauer. 2001).



**Fig. 3.** Estos rhizobios están adheridos al pelo de la raíz comenzando a invadir la raíz, donde formarán una asociación simbiótica.

La compatibilidad planta-bacteria refleja la naturaleza del desarrollo del nódulo a través de las leguminosas, se han desarrollado estudios sobre los nódulos confinados a *Viciae*, *Trifolieae*, *Loteae* y *Phaseoleae* y *Parasponia*; en el caso particular de *Parasponia* se observan seudonódulos (nódulos que no fijan nitrógeno); a medida que faltan ciertas características comunes como la infección por pelos radiculares y desbloqueo de los genes bacterianos relacionado con la infección (Young and Johnston 1989).

Una parte importante entre la interacción planta-*Rhizobium* son sin duda los genes bacterianos como los responsables de llevar a cabo dicha interacción por lo que se les llama genes bacterianos de nodulación (*nod*, *nol*, *noe*) (Stacey 1995).

En la rizosfera, no hay una fuerza selectiva que mantenga la capacidad del *Rhizobium* para formar nódulos y fijar nitrógeno atmosférico con las leguminosas, ya que cada nódulo es iniciado por una sola bacteria, por lo tanto sí los nódulos mantienen una viabilidad bacteriana la población bacteriana seguirá siendo viable (Olivieri. and Frank 1994).

### **2.03.1. Señales de intercambio entre el *Rhizobium* y la planta**

#### **huésped.**

Dentro de la interacción simbiótica bacteria-leguminosas, existe una serie de señales implícitas donde se expresan genes. Por parte de la planta se encuentran las sustancias llamadas flavonoides y por parte de la bacteria los factores-Nod.

Las plantas extienden sus raíces aumentando la materia orgánica en suelo que es el soporte del desarrollo de los microorganismos (la rizosfera) los cuales usan el CO<sub>2</sub> al 19% liberando materia orgánica en las raíces combinada con flavonoides en donde la relación de sustancias fenólicas juegan un papel muy importante en la simbiosis, ya que los flavonoides producen fenil-propanoles y forman inducciones en los genes de la bacteria de nodulación (*nod*). Existen diferencias significativas en la composición de los flavonoides de las semillas, raíces y pelos radiculares ya que muchos flavonoides almacenan y liberan conjuntos de glucosidos en forma de agliconas que pueden también hidrolizar a las agliconas o activando genes de inducción *nod* (Irving, Boukli et al. 2000).

En la simbiosis existe el intercambio de señales entre ambos socios (genes *nod* por la rizobia, y los flavonoides por la planta) dado que los flavonoides son moléculas que están presentes en el exudado de la raíz e induce a los genes *nod* a que dirijan la síntesis de las moléculas de la señal *nod* a los factores-Nod de lipooligosacáridos que son los que intervienen en varios procesos que dan como resultado final la formación del nódulo. La capacidad de los flavonoides de activar genes del factor-Nod es una adaptación que permite que las bacterias expresen sus genes de nodulación solamente cuando hay perspectiva de una infección en la planta (Young and Johnston 1989).

Ciertos genes de nodulación codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de lipoquitina compuestos que sirven de medida específica para que la planta reciba la señal y sobre todo son las responsables de iniciar el acontecimiento de la nodulación (Stacey 1995).

En el caso particular de la soya, existen flavonoides compatibles los cuales permiten la utilización de bacterias de *Rhizobium* que forman una simbiosis en



alfalfa o en soya. Cualquier factor que intervenga en la producción de flavonoides impedirá la nodulación ya que los flavonoides comienzan a segregarse en el suelo donde hay una microflora asociada a la rizosfera que son los encargados de degradar, estos compuestos químicos, en esta microflora se incluye a los *Pseudomonas* y a los *Bacillus* haciendo que los flavonoides pierdan así su capacidad de entrar en contacto con la bacteria e introducirse. Una de la función de los flavonoides es el estimular a la natación de la bacteria en el suelo así como lograr el desarrollo de la cilios permitiendo el movimiento de las bacterias a la raíz para poder lograr la infección (Bellone. 2001).

Los genes bacterianos que son esenciales para la inducción de la respuesta de la planta se llaman genes de nodulación (*nod, nol, noe*). En *Bradyrhizobium japonicum* los genes esenciales para la simbiosis son los genes *nod* los cuales son genes esenciales para la fijación de nitrógeno (e.g *nif, fix*) ya que un número de genes de nodulación codifican enzimas en la biosíntesis en la sustitución de la molécula de lipo-quitina (Stacey 1995).

### **2.03.2. Control de genes de expresión *nod*.**

El cromosoma es el portador de los genes de operaciones del genoma bacteriano y esta constituido por el endogenoma (genes de la especie) y el exogenoma. El genoma esta constituido generalmente de un cromosoma, con un número variable de plasmidos grandes que pueden llegar a constituir hasta un 40% en relación con el genoma total. Los genes bacterianos requeridos para la simbiosis generalmente estan presentes en plasmidos grandes llamados plasmidos simbióticos (Sym) (Brom, Garcia de los Santos et al. 2000).

Los plasmidos desempeñan un papel importante en la determinación de la capacidad del *Rhizobium* para inducir nódulos y fijar nitrógeno, los plasmidos son grandes, con pesos moleculares mayores a  $10^8$  Dalton y han sido encontrados en diversas especies de *Rhizobium* con la perdida de un plasmido en *R. leguminosarum* puede estar asociada con la perdida de la capacidad nodulante (Hirsch, Montagu et al. 1980).

La regulación del gen *nod* indica que el producto del gen *nodD* está expresado y es parte esencial para la expresión de otro operón *nod* de *nodD* y este es miembro de una larga familia de proteínas reguladoras de la transcripción del gen *nod* que necesariamente requiere de presencia específica de flavonoides que son los compuestos que exuda la raíz (Stacey 1995).

Se conoce un proceso de autoinducción para la expresión diferenciada de genes en muchas bacterias Gram-negativas en donde el factor dominante de este sistema es la concentración de moléculas difusibles de tamaño pequeño llamados autoinductores, en la actividad biológica. Un ejemplo de los autoinductores, es A11 que son las lactonas, n-acílicas de homoserine (AHLs) que se sintetiza por el producto del gen homólogo LUXI que puede atar a una proteína que pertenece a la familia de LuxR del autoinductor-proteína que activa la expresión de genes o de conjuntos definidos de genes. Por lo cual el autoinductor permite que las bacterias vigilen su propia densidad demográfica entre la alta y la baja densidad de la célula o también se entiende como un sistema de señales independientes del gen que codifica una síntesis del autoinductor en *R. etli* CNPAF512 de RhiR del *rhizobium* (clasificada anteriormente como *phaseoli* CNPAF512 de *R. leguminosarum* bv.) que es capaz de formar nódulos y fijar nitrógeno (Rosemeyer, Michiels et al. 1997).

### **2.03.3. Estructura de la señal nod y especificidad al huésped.**

El factor de nodulación *nodD* se regula en respuesta a señales de la planta, la mayoría de las operaciones del factor-*nod* es que se transcribe en niveles bajos por el gen regulador *nodD* que es constitutivo de la proteína NodD de secuencias que proceden a otras sustancias del factor-*nod* que activan su transcripción cuando la rhizobia se expone a ciertos flavonoides. El fenotipo no-nodulación conmutaciones del *nodD* se puede corregir por los genes reproducidos del *nodD* cepas de diversos hospederos y en los genes de *R. meliloti* y *R. l. b.v. viciaea* el factor *nod* se puede inducir por el mismo flavonoide luteolin. Los genes *nodG* y *nodH* de importancia para la nodulación en *R. meliloti* parecen no tener ninguna



contra parte en otra rhizobia según datos de hibridación del DNA en cepas de *R. leguminosarum* *nod* A, B y C son suficientes para que los pelos radiculares formen el encallado en *R. meliloti*, un gen adicional *nodH* necesario para la deformación de los pelos radiculares de la alfalfa, el producto del *nodH* se requiere para la síntesis de compuestos que son necesarios para lograr el encallado en los pelos radiculares (Young and Johnston 1989).

La expresión de genes *nod* requiere la presencia de flavonoides por parte del hospedero de la planta, obligando al sitio NodD5 del operon *nod* del fríjol el cual fue identificado en el DNA (de la bacteria) y se ha denominado la caja de nodulación Nod de la secuencia general conservada en el operon *nod* para todas las especies de *Rhizobium*, *Azorhizobium*, y *Bradyrhizobium* analizadas (Stacey 1995).

Se han diferenciado genes de nodulación *nodA*, *nodB*, y *nodC* en genes *nod* que son parte fundamental para la especificidad, existe una regulación en donde el producto de este gen interactúa con los flavonoides producidos por la planta hospedadora siendo las responsables de la especificidad de la simbiosis debido a la interacción de flavonoides con la proteína NodD que activa la transcripción de genes en la región promotora de los genes regulados por NodD en donde la expresión de estos genes son parte fundamental para la simbiosis. En el sistema FixJ, NifA y RpoN en *Sinorhizobium meliloti* existe un sistema de regulación de la expresión de los genes en relación con la concentración de oxígeno. Las proteínas FixL y FixJ tienen un papel importante en la regulación de los genes en donde el FixL se autofosforiliza y es capaz de transferir el fosfato a FixJ. En el caso de una baja concentración de oxígeno este provoca el aumento de oxígeno aumentando la concentración del FixJ fosforilizado dentro de la célula la proteína FixJ fosforilizada activa los genes *nifA* y otros genes NifA que es un regulador positivo de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno en donde un factor sigma es necesario para la transcripción eficaz de muchos genes simbióticos es el RpoN (Bauer. 2001).

En América se conocen dos grupos de *Rhizobium* clasificados como tipo I y tipo II identificados de aislados de rhizobia en América. En el frijol en donde la cepa I, tiene un rango reducido de hospedero a *Phaseolus spp* donde su DNA posee copias del gen *nifH* que en comparación con la cepa II, está posee un mayor rango de hospederos y es capaz de nodular en *Leucauna spp* en donde la cepa también tiene copias del gen *nifH* dando como resultado final que no todos los genes bacterianos responden a los flavonoides (Aguilar, López et al. 1998).

**Tabla .1.** Inducción de Genes en Pelos Radiculares en la Simbiosis.

Gen	Función/homologa	Sitio de expresión	Especie
enod5	Arabino-galactosa son componentes de la infección del filamento,	Infectando células de la zona de invasión.	<i>Pisum</i>
enod12	Secreción hidroxiprolina-ricos en glicoproteína.  Infección en la formación del filamento	Pelos radiculares , células corticales conteniendo la infección en el pelo radicular . Filamentos preparados para la infección	<i>Pisum</i> <i>Medicago sativa</i> <i>M.truculata</i>
CHS	Chalcone synthase	Pelos radiculares	<i>M. sativa</i> <i>Vigna</i>
LTP	Transferencia de lipo-proteínas	Pelos radiculares	<i>Vigna</i>

#### 2.04.0. Percepción y traducción de la señal Nod.

Los factores-Nod son importantes en la simbiosis ya que provoca la reacción de muchas plantas, pero estas, son características de la bacteria en donde los pelos radiculares son los primeros conectores, pero también, la ligadura de los flavonoides a las proteína Nod que son las responsable de activar a los genes *nod*, logrando la unión de la secuencia de la región promotora de muchos genes *nod* en donde regularmente la NodD complica la transcripción de los genes involucrados en la síntesis de lipo-oligosacaridos llamados factores Nod. Algunos factores Nod que se han identificado son el N-acilados oligameros de  $\beta$ , N-acetil,



D-glucosamida con varios sustitutos en el azúcar, los factores Nod son señales necesarias para provocar la entrada rhizobial a la raíz (Irving, Boukli et al. 2000).

Las proteínas Nod son las encargadas de rizar el pelo radicular o de dar la orden a la bacteria para que penetre por las heridas o lenticelas para producir la formación del cordón de infección y comenzar con la formación del nódulo (Bellone. 2001).

Existe una comparación entre *R.tropici* y *R.etli* en su competitividad para formar nódulos y por la producción de factores Nod ya, que dicho factor es el que inicia el proceso de nodulación, de manera que los lipo-oligosacáridos con diferentes sustitutos químicos están relacionados con la nodulación (Martínez-Romero, Hernández-Lucas et al. 1998).

Las bacterias poseen dos componentes llamados sistemas reguladores de la transducción la que consiste en una proteína sensora que está junto a una proteína reguladora (e.g CheA y NtrB). Las proteínas sensoras tienen una región de transmembrana y se piensa que son perfeccionadas de manera que en el ambiente se perciban una porción de nitrógeno, haciendo uso de este elemento las proteínas sensoras terminales lo traducen a señales para que los utilicen las proteínas reguladoras. La proteína *nodW* actúa como una proteína sensora mientras que la proteína *NodW* actúa como una proteína reguladora transcripcional (Stacey 1995).

#### **2.04.1 Percepción de la señal Nod.**

Los factores Nod inducen la deformación de los pelos radiculares cuando se aplica al crecimiento en un cierto punto en la raíz en respuesta al factor Nod en donde las raíces dan lugar al crecimiento y redirección de la extremidad en la zona competente de nodulación en la región de elongación. Las señales del factor Nod son mecanismos moleculares subyacentes a cambios fisiológicos en los pelos de la raíz en donde probablemente el factor Nod siga un proceso de transducción por receptores específicos en la raíz, una señal receptora del factor Nod puede responder a un factor Nod en una concentración por abajo de un medio específico

capaz de transferir estas señales ligadas a otros componentes cromosomales como es el caso de *Medicago spp* NFBSI (cepa bacteriana identificada). El NFBSI es un pobre competidor porque el factor Nod se encuentra ligado a proteínas en un sitio homólogo en contraste con NFBS2 que fue aislado de una fracción enriquecida del plasma-membrana de células culturales en una suspensión de *M. varia* que son requerimientos del factor NodR en donde el non-reduce el azúcar por la actividad ligada a un grupo sulfato en todas las actividades biológicas en *Medicago* no están discriminando NFBS2 siendo aparentemente un receptor específico el factor NodRm. El factor Nod induce a la alcalización citosólica o a la despolarización de la membrana en la raíz en donde el factor NodRml<sub>(s)</sub> en *M. sativa* induce a la despolarización de la membrana a la rápida alcalinización intracelular en la raíz en contraste con el factor Nod no-sulfatado que provoca cambios intracelulares en ausencia de la despolarización de la membrana indicándola la existencia de una baja afinidad de la señal receptora que es semejante a la deformación de la raíz y una alta afinidad receptora necesaria para acelerar la invasión rizobial. (Irving, Boukli et al. 2000).

Existe un locus que induce a los isoflavonoides a la derecha del *nodIA* en *B. Japonicum* que es el operón del cromosoma a la derecha del NodD<sub>1</sub> y NodW similar a los operones del *nodD*<sub>1</sub> y el *nodABC*; sin embargo, este operón no muestra la expresión del gen *nod* por lo tanto la regulación del NodD<sub>1</sub> que alteradamente es regulado por el NodW con un efecto negativo el cual puede actuar para prevenir la inducción significativa del *noY2* en ausencia de NodD o de NodW, en donde muchos genes *nod*, codifican enzimas implicadas en la regulación del crecimiento de la planta que induce a encrespar el pelo de la raíz y a la división cortical de la célula. El primer compuesto aislado (NodRm-1) de *R. meliloti* que se identificó como N-acyl tri N-acetilo β-14-Dglucosamine tetrasacarido con el enlaces de un grupo sulfato en C-6 de la reducción del azúcar

La disponibilidad de una molécula de la señal Nod de la lipo-quitina hace que el sistema de nodulación sea más atractivo entre la célula de planta que marca el proceso de nodulación en donde la prioridad esencial es identificar un receptor(s) de la señal Nod (Stacey 1995).



**Tabla. 2.** Biología y respuesta Molecular de los Pelos de la Raíz de las Leguminosas Ante Factores Nod

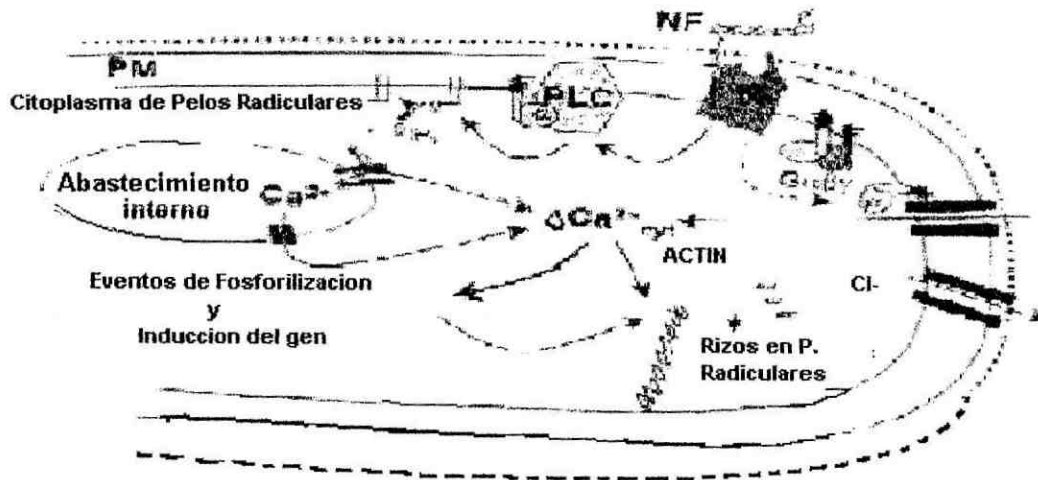
<b>Respuesta</b>	<b>Factores Nod</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Plantas</b>
Acumulación de flavonoides	NodRII(Ac)	10 <sup>-9</sup> M	<i>Vicia</i>
	NodNGR(Oh o Ac) NodBj		<i>Glycine</i>
Incremento de (Ca <sup>2+</sup> ).	NodNGR(Ac,S), NodRmIV(S)	10 <sup>-9</sup> M	<i>Vigna</i>
Dipolarización de los pelos radicales	NodRm(s)	10 <sup>-9</sup> M	<i>Medicago</i>
Calcio spiking en pelos de la raíz	NodRmIV(Ac,S)		<i>Medicago</i>
			<i>Medicago</i>
Pelos radiculares deformados	NodRmIV(S)	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-12</sup> M	<i>Medicago</i> <i>Melilotus</i>
	NodRIv,NodRm	10 <sup>-9</sup> – 10 <sup>-12</sup> M	<i>Vicia</i>
	NodNGR(S)	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-13</sup> M	<i>Vigna</i>
	NodNGR(Ac)	10 <sup>-8</sup> – 10 <sup>-11</sup> M	<i>Macroptilium</i>
	NodNGR(s)	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-10</sup> M	<i>Medicago</i>
Rizos en pelos radiculares	NodNG12		<i>Macroptilium</i>
			<i>Vigna</i>
Penetración de la bacteria	NodNGR(s)	10 <sup>-7</sup> – 10 <sup>-10</sup> M	<i>Calopogonium</i>
			<i>Glycine, Vigna</i>
			<i>Vicia</i>
Inducción de pre-infección de los filamentos	NodRIv(Ac)		<i>Vicia</i>
Inducción de nódulos meristemos	NodRLv(Ac)		<i>Vicia</i>
	NodRm(S)		<i>Medicago</i>
	NodBe		<i>Glycine</i>
Inducción de genes Nodulinas	NodRIv(Ac)	10 <sup>-12</sup> – 10 <sup>-13</sup> M	<i>Pisum</i> <i>Medicago</i>
Inducción de otros genes	NodGR(Ac,S)	10 <sup>-6</sup> – 10 <sup>-7</sup> M	<i>Vigna</i>

### 2.04.2. El flujo de iones que inducen al factor Nod

Una de las características que destaca de las leguminosas es la capacidad de fijar nitrógeno del suelo a través de la simbiosis del *Rhizobium*-leguminosas sin embargo dicha asociación se pueden ver afectada por el estado nutricional de la planta así como el nivel de los nutrientes del suelo. Los macroelementos N, P, K poseen importantes funciones las cuales están ligadas de manera directa o indirecta en la nodulación, el P es un componente que abastece de energía a la simbiosis en la relación raíces-bacteria y el N constituye un factor esencial para las proteínas y otros compuestos esenciales para la planta (Raz, Clavero et al. 1995).

El fósforo es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo del *Rhizobium spp* puesto que son las concentraciones del fósforo en la mayoría de los suelos es menor 1µM. El *Rhizobium* que tienen una baja tolerancia a los ambientes deficientes del fósforo y pueden presentar dificultades en la nodulación (Leung and Bottomley 1987).

La secuencia de los cambios observada en los pelos radicales responde a factores Nod que están presentes en el uso de un ion selectivo de microelectrones en el factor Nod sensibles en *M. sativa* en la raíz a medida que el ion extracelular en el que detecta una influencia del  $Ca^{2+}$  provocado por factores Nod entrando por vía  $Ca^{2+}$  seguido por un clefflex de las raíces y acompañado por una despolarización de la membrana de los pelos radicales haciendo pensar que el Cl ion efflux es disparado por la despolarización de la membrana en donde los factores Nod inducen a la alcalinización intracelular en los pelos radicales (Irving, Boukli et al. 2000).



**Fig.4.** El esquema representa algunas de las señales activadas del factores Nod en los pelos de la raíz en una etapa temprana de la simbiosis. Este modelo esta basado en señales de transducción análogas factores Nod (NF), ligadura del plasma-membrana (PM), localización receptora (R) que activa una heterométrica G-proteína (Gαβγ) esta cascada estimula los cambios del calcio y la enzima fosfolipido C (PLC), una relación trifosfato inositol (IP<sub>3</sub>).

Los pelos radicales son las células más accesibles en la raíz para medir flujo iónico, y esto nos permite analizar algunos eventos tempranos en la traducción de señales Nod. Los pelos radicales responden a factores Nod con una rápida despolarización de la membrana plasmática transitoria con la entrada de Ca<sup>2+</sup> y Cl<sup>-</sup> y salida de K<sup>+</sup>. El primer evento que ocurre en unos pocos segundos después de la adición de los factores Nod es la entrada de Ca<sup>2+</sup> y este es requerido para la subsecuente salida de Cl<sup>-</sup>. La salida de Cl<sup>-</sup> despolariza la membrana, lo cual es entonces balanceado por la salida de iones K. Las medidas de flujo de calcio por diferentes métodos demuestran resultados ligeramente diferentes. Con un retardo de 10 minutos, los pelos radicales de la alfalfa responden a los factores Nod, con una adición regular en la concentración de calcio libre intracelular en el área que rodea el núcleo, medido por inyección de un indicador, el dextran verde de calcio.



Los cambios de  $\text{Ca}^{2+}$  tienen un efecto profundo sobre el crecimiento en las puntas de las raíces y tubos del polen. Este proceso es acompañado por dinámicos citoesqueletos. El  $\text{Ca}^{2+}$  induce la fragmentación de filamentos de actina en los tubos de polen. Igualmente, los filamentos de actina descomponen la infección de *Rhizobium* y tratamiento con factor Nod. El calcio puede causar exocitosis para depositar nuevo material de la pared celular en la punta de la raíz. Los cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular probablemente disparen una cascada de señales de traducción que terminará en la expresión de genes específicos involucrados en el programa simbiótico que llevará al desarrollo del nódulo. Diversos genes de nodulinas tempranas son inducidos por los factores Nod; sin embargo, la relación entre la respuesta rápida y la expresión de genes espera ser elucidada. La importancia del calcio fue demostrada por la consideración de que la carga de calcio esta ausente en los mutantes de alfalfa exhibiendo tanto deformación del pelo radical o formación de nódulo en inoculación con *Rhizobium*. (Schultze and Kondorosi 1998).

### **2.04.3 Genes de la planta asociados con la nodulación.**

Los nódulos en las raíces implican una expresión diferenciada de una serie de genes nódulo-específico de las plantas, los genes de la planta asociados a la nodulación son las llamadas nodulinas que se transcribe únicamente en nódulos. Estos genes se dividen en tempranos y últimos, las nodulinas tempranas son aquellas que se expresan en el lanzamiento del desarrollo del nódulo en la raíz antes del inicio de la fijación de nitrógeno las cuales estan implicadas en organogenesis que es una especialización fisiológica de los nódulos.y las nodulinas tardías que contribuyen en la asimilación del nitrógeno a través de las plantas por la asimilación de amonio por la Glutamina sintetasa (Gs) y el Glumato sintetasa (GOGAT) a través de enzimas e isoenzimas Las nodulinas tiene funciones relacionadas con la estructura y metabolismo las cuales son deducidas principalmente de las moléculas como la sintetasa del nódulo específico como lo



son las hemoglobinas (Hbs) y las Leghemoglobinas (Lbs) (Ceccatto, Gomes. J. E. et al. 1988).

Las hemoglobinas (Hbs) son hemo proteínas que unen reversiblemente al oxígeno y a otras moléculas gaseosas. En las plantas existen dos clases de Hbs; las Hbs simbióticas y las no simbióticas. Las Hbs o leghemoglobinas (lbs) aisladas de especies leguminosas se sintetizan exclusivamente en los nódulos durante la fijación de nitrógeno y su función es facilita la difusión de oxígeno a los bacteroides, en donde tentativamente se cree que el oxígeno es un factor que regula la expresión de genes involucrados en la fijación simbiótica (Hernández 2001).

Las Hbs no simbióticas son las proteínas ubicas detectados en diferentes órganos de las plantas mono y dicotiledóneas creciendo en condiciones normales o bajo estrés, aun se desconoce su función.

Las leghemoglobinas son proteínas que contienen una porción hemo formada por las plantas y una subunidad hemina formada por las bacterias en donde la leghemoglobina es la responsable del color rojo de los nódulos activos limitando la concentración del oxígeno dentro del nódulo de esta forma los bacteroides reciben suficiente oxígeno para sobrevivir y se evita que la nitrogenasa pueda ser inactivada por el oxígeno (Bauer. 2001).

El nitrógeno es vital el cual se introduce y se asimila por aminoácidos como la son el glutamino, glutamato, asparragina y aspartato portadores importantes del nitrogeno a las plantas, en donde la síntesis de estos componentes es efectuada por isoenzimas múltiples para cada una de las enzimas que son codificadas por una familia de genes por parte de la planta en donde los miembros individuales codifican isoenzimas diferentes que son reguladas por el ambiente, por el control metabólico, por desarrollo y por la especificidad del tejido/tipo celular.

Las asimilación de nitrógeno sobre los esqueletos de carbono han marcado efectos sobre la productividad de la cosecha y la biomasa, la deficiencia del nitrógeno en las plantas se ha mostrado en la disminución de los niveles estructurales fotosintéticos como la carboxilasa del bifosfato de la clorofila y del ribulose (rubisco) con reducciones en la eficacia de la capacidad de la

carboxilación Las enzimas en las asimilación de la forma orgánica del nitrógeno en plantas son cruciales para el crecimiento vegetal (Lam, Coschigano K.T. et al. 1996).

### **2.05.0. Control del desarrollo del nódulo**

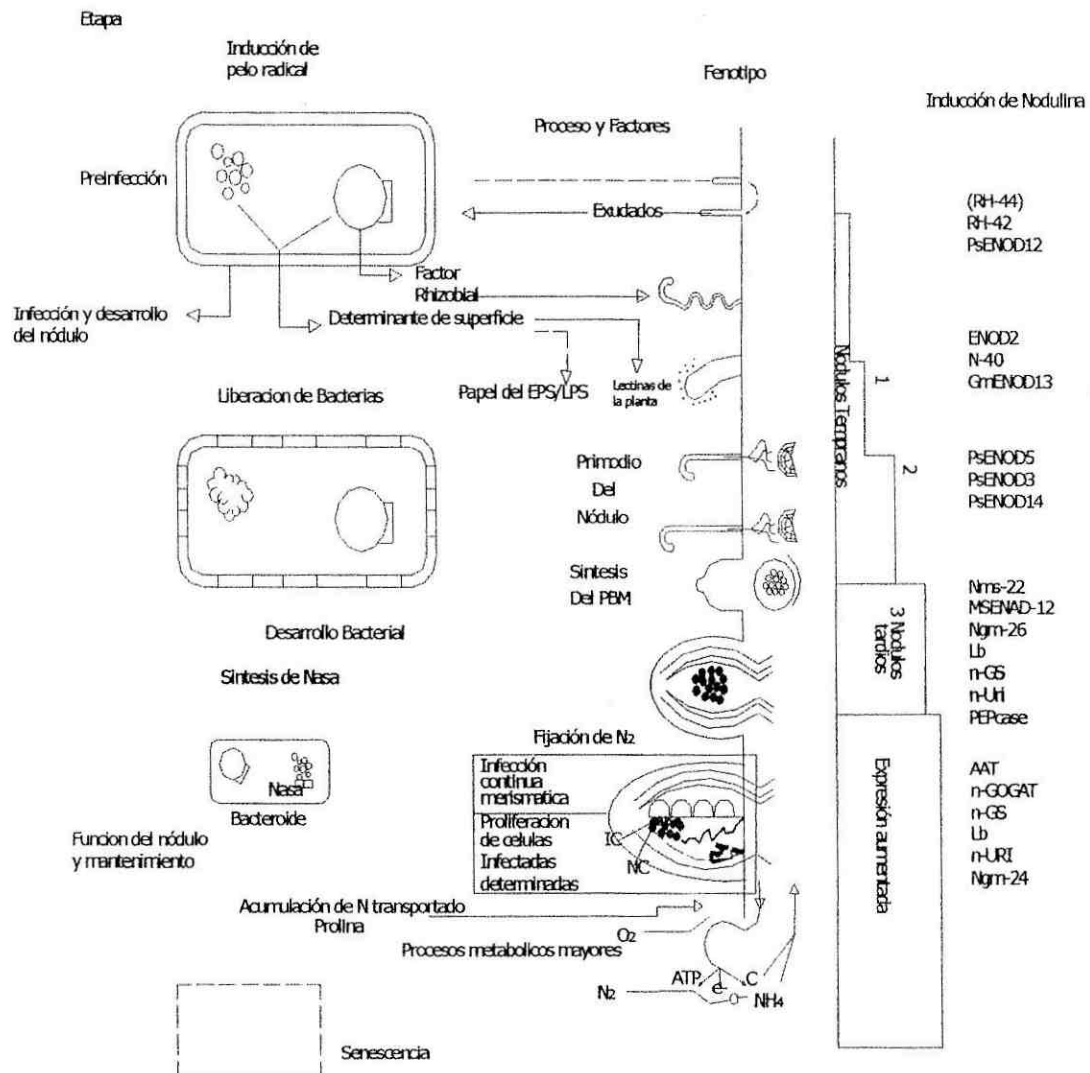
En los nódulos del frijol, se reconocen dos tipos de tejidos; el tejido periférico y el tejido central.

El tejido periférico consiste en células corticales grandes vacuoladas (corteza externa) una capa de pequeñas células de esclerulina (endodermis del nódulo) y varias capas de pequeñas células vacuoladas densamente empaquetadas (corteza externa) conteniendo los haces vasculares del nódulo. La endodermis esta localizada alrededor de un tejido central con excepción de una ventana generada por la penetración del cordón de infección. El tejido central consiste de grandes células invadidas, células sin invadir vacuoladas donde se observa un gradiente progresivo de células de tamaño reducido de células que proceden del sitio de penetración del cordón de infección de la periferia. Para el caso específico del frijol se observa la deposición del almidón exclusivamente en células sin invadir del tejido central en al menos 10 capas de células en la parte próxima de los nódulos. En nódulos maduros se observa omioplastos, y las células sin invadir se encuentran distribuidas entre algunas invadidas y se observan unas capas de células alrededor de la mayoría de las células invadidas periféricamente.

En nódulos maduros el patrón de acumulación de almidón puede correlacionarse con las etapas del desarrollo y la actividad de fijar nitrógeno de los bacteroides (Tate, Patriarca et al. 1994).

Un gen cromosómico es requerido para el desarrollo del nódulo en *Phaseolus vulgaris* el cual fue caracterizado en una cepa de *R. etli* TAL185 en la cepa MLC640 que es un mutante con una inserción de Tn5 que presenta una disminución de la movilidad en TY blando y defectuoso en el momento del desarrollo del nódulo. El sitio de la inserción de Tn5 en el mapeo de un fragmento cromosómico de 3.6 kb con EcoRI en. donde el fragmento 3.6 kb fue subclonado

de el cósmico pUHR80 en el cual complementa a MLC640 en donde posteriores subclonaciones y mutaciones del sitio dirigido localizo el gen para lograr el desarrollo del nódulo en una región de 1.7 kb en el fragmento de 3.6 kb de EcoRI la hibridación con el fragmento de EcoRI 3.6 kb del DNA geonómico de varias especies de *Rhizobium spp* indicaron que este gen es conservado en diferentes rizobias (Pooyan, M. L. C. G. et al. 1994).



**Figura 5.** Las etapas del desarrollo del nódulo



### 2.05.1. Aprovechamientos genéticos

Las leguminosas que se inoculan rutinariamente con rizobias en donde los blancos principales para lograr una buena nodulación son las capacidades nodulantes de las bacterias para fijar nitrógeno en las plantas y la capacidad competitiva de las bacterias con las bacterias nativas del suelo. Para lograr mejores cepas es necesario conocer el grado de divergencia de las secuencias del rRNA que refleja la historia evolutiva de los organismos por medio de la comparación de moléculas filogenéticas de las bacterias por medio de las etiquetas de plástico del gen 16s que permite la identificación rápida de oligonucleotidos sintetizados. La tecnología basada en rRNA permite la detección de ácidos nucleótidos de organismos microbianos, la identificación de células específicas individuales permiten la hibridación por DNA-DNA (Ludwing, Amann et al. 1998).

Para lograr una rápida identificación de las cepas se han utilizado las etiquetas de plástico entre los aislantes que han venido beneficiar así como también otros métodos como lo es la huella dactilar del DNA basados en el DNA poliformico amplificado al azar por PCR (RAPD PCR) de la reacción en cadena de la polimerasa de genomas bacterianos usando genes u operones ribosomales, desafortunadamente el alto grado de conservación molecular de los genes ribosomales son más utilizados o más apropiados a la filogenia o los estudios moleculares de la evolución bacteriana (Perret and Broughton 1998).

Las bacterias requieren de métodos específicos para marcar cepas y sus componentes y así poder determinar cuales cepas son mas eficaces para la fijación de nitrógeno para el caso de *Bradyrhizobium* se ha utilizado el sistema GUS que es una etiqueta de plástico en la cual se determina la competición bacteriana. Para este caso el gus A es un gen que codifica enzimas glucoronidase-glucoronidase (GUS) que se inserta en el interior del genoma receptor de la cepa de *Rhizobium* utilizando un trasposon, sistema que ha exaltado grandemente su aplicabilidad en la evolución de la fijación de nitrógeno bajo diversas condiciones ambientales (Anyango, Wilson et al. 1998).



Los aprovechamientos genéticos son de suma importancia ya que el caso específico de Argentina y Uruguay las zonas arables se acidificaron progresivamente durante 10 a 20 años en donde la producción de alfalfa (*Medicago sativa*) es de suma importancia para lo cual se ha establecido múltiples estudios para lograr cepas con alta resistencia a la acidez y se han logrado grandes avances (Del Papa, Balagué et al. 1999).

*Ruthenica* de *Medicago* (L Ledebour) que es una planta forrajera con un alto potencial y con una fuente de genes explotables para la mejora genética de la alfalfa (*Medicago sativa*) que crece en Siberia y Mongolia en laderas abiertas y se ha adaptado a condiciones secas con inviernos fríos donde su nodulación es limitada comparada con (*Medicago L sativa*). Para lo cual se elaboraron estudios sobre los simbiontes que fijan nitrógeno encontrando bacterias genéticamente diversas, cinco géneros de la rizobia sumados a 18 diversas especies caracterizadas para los simbiontes de (*Medicago sativa*) que son; *meliloti* de *Sinorhizobium* genéticamente diversas en donde se sugiere que *Medicago* de *Sinorhizobium* puede establecer simbiosis con el género *Medicago* de manera que los aprovechamientos genéticos son una herramienta indispensable para la agricultura (Berkum, Beyene et al. 1998).

### **2.05.2. Control fisiológico de la nodulación y la función de los reguladores de crecimiento**

La demanda continua en términos de elevar la productividad de la legumbre, la inoculación presenta problemas relacionados con la inhabilidad de formar nódulos en la raíz, así como lograr establecerse en el suelo que ya está ocupado por la rizobia nativa, así como también debe de ser tolerante a varios ambientes y al factor genético de la planta (Tas, Leinonen et al. 1995).

Un caso de inhibición total de la nodulación del frijol fue observada cuando el inoculo de *R. etli* de FCN42/pcAcM1a fue utilizado, se dio una simbiosis eficaz con una cepa de FCN2012/pcAcM1a mientras que una inhibición total de la inducción del gen *nodA* fue observada en el exudado de la raíz del frijol en la cepa

FCN42/pcAcMila donde el amonio en la cepa FCN2012/pcAcMla mostró una inducción óptima del gen *nodA* para la producción del factor *nod* y la nodulación se observó en *R. etli* habiendo de por medio una regulación de la expresión del gen *nod* y de la nodulación cuando el nitrógeno interno es acumulado por un GDH funcional y que el NtrC está implicado en tal regulación. Una inestabilidad del plasmido de la bacteria que alberga al gen *gdhA* fue observada durante la simbiosis indicando una selección fuerte contra las células que contenían un plasmido (Mendoza, Leijja et al. 1995).

No todas las cepas de *Rhizobium* son capaces de producir una fijación simbiótica efectiva en todas las leguminosas ya que puede haber diferentes habilidades para nodular cuando son inoculadas, entonces mientras mayor sea la producción de nódulos a través de esta simbiosis efectiva se hará un mayor uso del nitrógeno atmosférico presente en el suelo (Sanchez and Urdaneta 1997).

### **2.05.3. Evitando los mecanismos de defensa de la planta.**

El *Phaseolus vulgaris* L. es una fuente principal de proteínas en donde sus cultivos varían debido a factores que entorpecen la nodulación algunos son controlables pero otros no, así como también se involucran factores producidos por la planta algunos de los factores externos que son controlables son el pH, la disponibilidad de alimentos, los mismos sistemas de cultivo, y entre los que no son controlables se encuentran las temperaturas, la humedad etc. (Garet 1998). Otro factor que inhibe la simbiosis se presenta cuando la disponibilidad o exceso de nitrato o amonio existe en el suelo y no es necesario recurrir a la simbiosis (Bauer. 2001).

El etileno también juega diferentes roles contradictorios en la nodulación ya que puede iniciar la deformación del pelo radicular, mientras que por otra parte puede inhabilitar la nodulación. Un ejemplo es la incapacidad de un mutante exopolisacárido de *R. leguminosarum* bv *vicia* en donde el nódulo puede ser un anfitrión a menos que el etileno esté suprimiendo el desarrollo de la raíz en la planta. En una mutación del etileno en *Medicago truncatula* un porcentaje muy

amplio de infección se produce en la corteza e inicia un número superior de nódulos primordiales en el interior de la corteza de algunas plantas silvestres. La acumulación de reproducciones de 1-aminociclopropano (ACC) oxidante ( por lo tanto una posible producción de etileno) hacen que el nódulo primordial, predomine en los polos opuestos al proto-xilema en donde normalmente guiara a la división de la célula del nódulo primordial que normalmente es negativo por la producción del etileno (Irving, Boukli et al. 2000).



## **3.0. Materiales y Métodos**

### **3.0.1. Sitios de muestreo.**

Guadalupe victoria es una zona con un alto potencial en sembradíos de frijol, para lo cual fue dirigido nuestro estudio de donde se seleccionaron siete parcelas experimentales tomando en cuenta que en esos sitios se estableciera el monocultivo en la mayoría de ellos, que por lo general nunca su hubieran fertilizado, cinco muestras se obtuvieron en donde las labores culturales se efectuaban con tractor y dos empleando animales quedando de las siguiente manera la distribución: 1 con tractor (Micaela Herrera Triana, ), 2 con tractor (familia Cumplido Méndez, ), 3 con tractor (Manuel Cumplido Méndez, fertilizada un ciclo anterior al establecimiento del cultivo), 4 con tractor (Isabel Amaya Hernández , ), 5 con animales (Juan García Ataide, ), 6 con animales (Antonio Castañeda) 7 con tractor (propietario no registrado).

### **3.0.2. Análisis de suelos.**

Se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 30 cm de a las cuales se les realizaron los análisis siguientes:

Determinación de textura por el método del hidrómetro de boyoucos, extracción de Fe, Cu, Zn y Mn basado en el método de la solución extractora de ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), nitrógeno total por el método de kjeldahl, determinación de materia orgánica por el método de walkley y black modificado, densidad aparente (parafina), capacidad de intercambio cationico (CIC), pH, C.E, Ca, Mg y Na por el método del extracto de pasta; de acuerdo con las normas y especificaciones de los manuales de procedimientos de Laboratorio de suelos de la UAAAN-Unidad Laguna.

### **.....3.01.0. Obtención de muestras de plantas.**

Una vez establecido el cultivo se regreso a cada uno de las parcelas para toma 10 plantas como muestra representativa en un transecto de 50 m de manera perpendicular al surcado, tomando una planta cada 3 o 5 m al azar .

#### **3.01.1. Peso fresco.**

A cada una de los muestras se les estimo el peso en fresco a los dos días de la extracción de las muestra, para que no perdieran la humedad se les conservo en el refrigerador a una temperatura estable de 4°C.

#### **3.01.2. Conteo de nódulos por planta.**

Una vez obtenido el peso fresco se procedió a contabilizar y a extraer los nódulos de las plantas de cada tratamiento. Una vez extraídos los nódulos se colocaron en un tubo de ensaye con un desecante cual el evita su degradación y conservar el nódulo en buen estado para posteriormente ser estudiados

#### **3.01.3. Peso seco.**

A cada una de las plantas se les coloco en una bolsa de papel canela con orificios para posteriormente colocarse en una estufa a una temperatura estable de 68 °C, por tres días.

### **3.02.0. Ensayo en Invernadero.**

Para evaluar la capacidad nodulante se prepararon tres inóculos de las muestras de suelos obtenidas estableciéndose un ensayo en el invernadero de las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en las fechas comprendidas del 30 de noviembre del 2001 al de 19 de enero del 2002, empleando cinco variedades de frijol que normalmente son las que se establecen en Guadalupe victoria Dgo, como; cultivos trampa, utilizando macetas, de unicel de 4 L y arena, se sembraron cuatro semillas por maceta pero una vez germinadas se seleccionaron las dos mejores plantas. Los tratamientos fueron:

**T1** = corresponde al sitio de muestreo numero 6 (labor cultural efectuada con Animales, monocultivo), 50 macetas.

**T2** = corresponde al sitio de muestreo numero 2 (labor cultural efectuada con Tractor, monocultivo), 50 macetas.

**T3** = corresponde al sitio de muestreo numero 4 (labor cultural efectuada con Tractor, se siembra frijol y maíz), 50 macetas .

**TE** = corresponde al testigo sin inocular, 10 macetas.

### **3.02.1. Dilución del suelo para la obtención de inóculos.**

Se prepararon dos matraces con 270 mililitros de agua destilada al 0.85% de NaCl agregándoles 30 gramos de suelo a cada uno (para el tratamiento 1 y 2 les correspondieron a las muestras de suelo 7 y 2) obteniendo una mezcla para inocular 50 macetas cada una con diez repeticiones de cada variedad de semillas. Dos días después se preparó otro matraz con 250 mililitros de agua destilada al 0.85% al NaCl con 20 gramos de suelo para formar el tratamiento numero tres (corresponde a la muestra experimental numero 4) para inocular otras 50 macetas.

### **3.02.2. Métodos de esterilización de las semillas y establecimiento de macetas al azar en el invernadero.**

Para el caso del tratamiento uno y dos para lograr la esterilización de la semilla se trato con una solución de cloro (NaCl) al 10% por espacio de tres minutos, posteriormente con alcohol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) al 70% por espacio de tres minutos sembrando directamente en la arena.

Para el tratamiento tres la semilla se trato con cloro al 1% y alcohol al 70%, por el mismo espacio de tiempo pero se enjuagó con agua destilada estéril, con este mismo método fueron tratadas las semillas que se utilizarón como testigos.

La distribución al azar de las macetas fue hecha en dos pequeños bloques, y dado que siembra no realizo el mismo día, no se inocuo al mismo tiempo, las semillas fueron esterilizadas bajo dos tratamientos distintos por lo tanto se tomo la decisión de separarlo en dos quedando la distribución de la siguiente manera:



**Tabla 3.** Resultado de la muestra de la primera distribuido al azar de las macetas en el invernadero

T111	T121	T131	T141	T151	T211	T221	T231	T241	T251	TE11
TE12	T112	T122	T132	T142	T152	T212	T222	T232	T242	T252
T253	TE21	T113	T123	T133	T143	T153	T213	T223	T233	T243
T244	T254	TE22	T114	T124	T134	T144	T153	T214	T224	T234
T235	T245	T255	TE31	T115	T125	T135	T145	T155	T215	T225
T226	T236	T246	T256	TE52	T116	T126	T136	T146	T156	T216
T217	T227	T237	T247	T257	TE41	T117	T127	T137	T147	T157
T158	T218	T228	T238	T248	T258	TE42	T118	T128	T138	T148
T149	T159	T219	T229	T239	T249	T259	TE51	T119	T129	T139
T1310	T1410	T1510	T2110	T2210	T2310	T2410	T2510	TE52	T1110	T1210

**T1**= tratamiento

**TE** = testigo sin inocular

**1,2,3,4,5** = numero de variedad

**1 al 10** = numero de repetición

**30/11/01** = fecha de siembra

**03/12/01** = fecha de inoculación

**Tabla 4.** Resultado de la muestra de la segunda distribución al azar de las macetas en el invernadero

T311	T321	T331	T341	T351
T352	T312	T322	T332	T342
T343	T353	T313	T323	T333
T334	T344	T354	T314	T324
T325	T335	T345	T355	T315
T316	T326	T336	T346	T356
T357	T317	T327	T327	T347
T348	T358	T318	T328	T338
T339	T349	T359	T319	T329
T3210	T3310	T3410	T3510	T3110

**05/12/01** = fecha de siembra

**05/12/01** = fecha de inoculación.

#### **4.01.0. Conteo de nódulos por planta obtenidos del ensayo de invernadero.**

Las dos mejores plantas se seleccionaron y al brotar el primer trifolio de cada planta fueron extraídas de las macetas para llevar acabo el conteo de nódulos por plantas y determina que los testigos no estuvieran nodulados porque eran el indicativo de que la arena no contenía ninguna cepa rhizobiana en este caso especifico la bacteria del genero *Rhizobium spp.*

#### **4.01.1. Obtención de aislados de *Rhizobium spp***

Una vez obtenidos los nódulos procedentes del ensayo del invernadero se procedió a determinar si el causante de ese nódulo en realidad era *Rhizobium spp* para lo cual se procedió a esterilizar superficialmente al nódulo bajo el siguiente tratamiento se lava con tween 20 al 2% por espacio de 1 minuto, pasado este tiempo se sometió otro minuto más con alcohol al 70% y por último se enjuagó con agua destilada estéril. Una vez limpia la superficie del exterior del nódulo se procedió a “tronar” el nódulo y sembrar en el medio de cultivo PY, se incubaron y después se hicieron frotis bajo el método de tinción Gram. para la determinar si efectivamente se trataba de *Rhizobium spp* bacilo Gram. negativo.

## **5.0. Resultados y Discusión**

### **5.01. Análisis de suelo.**

Los resultados muestran claramente baja capacidad nutricional de las parcelas experimentales, como se muestra en el cuadro 5 que expresa varios resultados como es; N total que oscila en un rango de muy bajo a medio, materia orgánica de baja a media así como los microelementos para el caso del cobre sus rangos están de 0.6 a 0.78, el hierro de 4.12 a 11.06, cinc de 2.36 a 2.76, y manganeso de 6.1 a 11.36 partes por millón (ppm), contenidos muy pobres, el pH está en los rangos de 6.0 a 7.5 promedios adecuados para que la bacteria *Rhizobium* puede crecer satisfactoriamente.

**Tabla 5.** Características fisicoquímicas de los suelos analizados en la localidad de Guadalupe Victoria Dgo.

Parcela experimental	Análisis								
	C.I.C	N(%)	pH	C.E. m <sup>2</sup> /cm	Materia Orgánica %	Ca	Mg (ppm)	Na	Textura
1	12.0	0.007	6.79	0.350	2.68	1.48	0.56	0.48	Franco arenosa
2	6.0	0.049	7.52	0.666	2.67	4.14	1.64	0.48	Franco arenosa
3	5.0	0.059	7.37	0.944	1.80	6.59	4.02	0.90	Franco arenosa
5	6.0	0.063	6.67	0.398	0.73	1.48	0.82	0.76	Franco arenosa
7	5.0	0.110	7.16	0.646	1.08	4.10	1.14	0.76	Franco arenosa
8	2.5	0.078	7.28	0.559	1.26	3.54	0.9	0.56	Franco arenosa
10	12.5	0.074	6.00	0.485	1.47	2.44	1.54	0.90	Franco arenosa

### 5.02. Peso fresco y seco

En cuanto a peso fresco y seco se refiere la parcela tres presento un mayor contenido de materia vegetal en cuanto al promedio que se observa en la figura 6 en comparación con la parcela l número diez, esto también se puede deber al tipo de variedad que cultiva, sin duda, el contenido de follaje es importante en términos de incorporación de materia orgánica al suelo.



**Figura 6.** Resultados del peso fresco y seco de muestra de frijol tomadas en la localidad de Guadalupe Victoria Durango en ciclo P-V 2001



### **5.03. Nodulación de plantas en campo.**

En Guadalupe Victoria Durango, se ha observado el fenómeno de supresión de nodulación, fenómeno que se ha mantenido y persiste de acuerdo con los estudios de los últimos años. Al comparar siete sitios de cultivo en los que evaluaron si existen diferencias significativas entre parcela que lleva acabo sus practicas culturales tecnificadas (con el uso de maquinaria) y el empleo de animales (yunta), se pudo observar en la figura 7 que no existen diferencia entre uno y otro tratamiento de acuerdo con los análisis de varianza en donde el valor de  $F$  calculada fue 2.08 y el valor de  $F_{.05} = 2.25$  y basándose en la regla que dicen que si el valor de  $F$  calculada es menor que el valor de  $F_{.05}$ , entonces no existe diferencia significativa entre los tratamientos y se acepta la hipótesis de que estos son iguales, por lo tanto, la supresión de la nodulación no se debe a la practica cultural que se esta llevando acabo en estos sitios. Así mismo se destaca que el coeficiente de variación fue alto (203.69%), indicando una alta variabilidad en el campo; resultado que no es de sorprendernos, dado que en la naturaleza, encontramos una variabilidad manifiesta.

. El *Phaseolus vulgaris L* es una fuente importante de proteína en la dieta del mexicano y por lo general sus cultivos varían en rendimiento, debido a las causa climáticas como la sequía y la alta temperatura, las cuales influyen en la fijación simbiótica del nitrógeno, dado que la asimilación y el rendimiento es negativo, en donde del frijol solamente deriva un 30% de  $N_2$  fijado (Popescu. 1998) los parámetros de nodulación oscilan entre 120-140 bajo condiciones de invernadero, mientras que en el campo van de 96 a 251 nódulos por planta (Vazquez Arroyo 1996). Para este estudio, el mayor número de nódulos obtenidos por planta fue de 50 nódulos que representa un valor aproximado de 52 a 20 % de nodulación en comparación con los valores ya establecido, las condiciones climáticas no fueron desfavorables para que la supresión para que se provocará el fenómeno de la supresión de nodulación, además las temperaturas en el estado de Durango no son un problema no son un problema significativo.

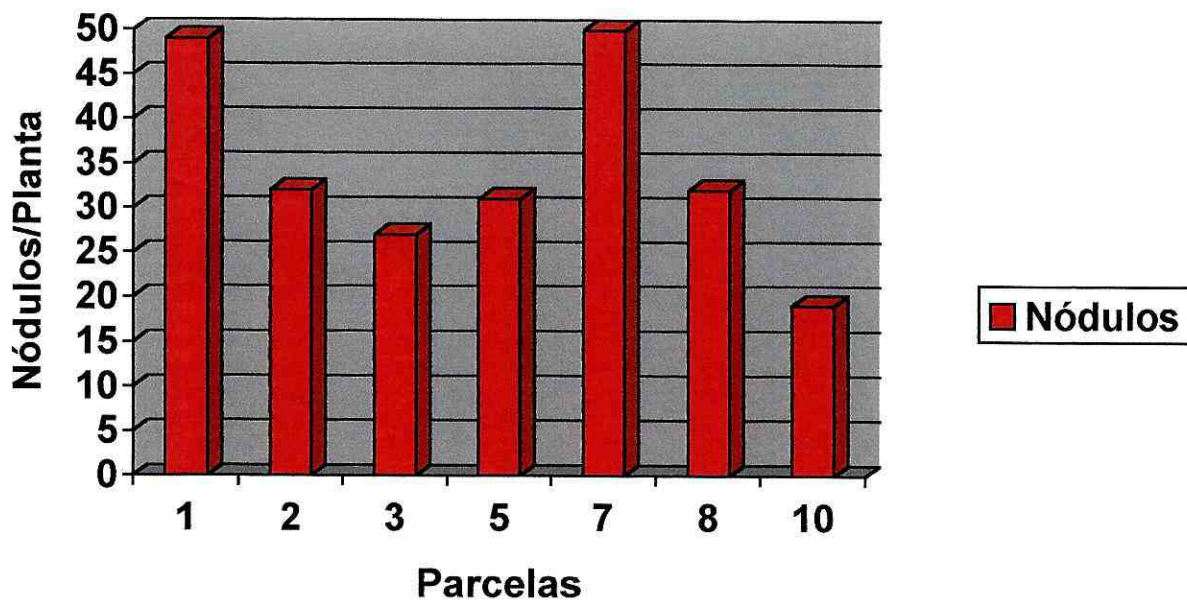
El pH del suelo y la disponibilidad de aguas controlan muchas de las respuestas a la nodulación. Altos niveles de fertilización puede inhibir

completamente este proceso (Weiser, Grefton et al. 1985). Por nuestros resultados y las condiciones de los cultivos, dichos fenómenos no se presentan y sin embargo, la nodulación se observa con un bajo número de nódulos.

Los nódulos en las raíces implica la expresión diferenciada de una serie de genes del nódulo que son específicos a las plantas y lograr así la fijación de nitrógeno (Ceccatto., Gomes. et al. 1988), la bacteria *Rhizobium* en relación con la interacción de la raíz de la leguminosa, conduce al desarrollo de la actividad simbiótica de fijar nitrógeno en la raíz del frijol (*Phaseolus vulgaris*) sin embargo, en contraste con otras leguminosas el frijol es considerado como un pobre fijador de nitrógeno y el proceso de nodulación es relativamente lento en cultivares de frijol con un ciclo corto de crecimiento y por lo tanto la fijación biológica de nitrógeno no contribuye significativamente a la nutrición de la planta (Burdman., Volpin. et al. 1996), quizás este fenómeno sea una de las causas de los niveles pobres de nitrógeno en el suelo, ya que sino es capaz de contribuir el *Rhizobium* con los contenidos nutricionales de la planta, los contenidos de nitrógeno en el suelo no se mejor (Bauer. 2001). Por resultados de los análisis de suelo, se puede constatar que el nitrógeno es pobre para lo cual las condiciones son adecuadas para que la bacteria pudiera efectuar sus interacción con la planta.

Muchos factores externos pueden afectar la eficacia de la fijación de nitrógeno algunos de ellos son controlables es decir el pH, la disponibilidad de nutrimentos, los sistemas de cultivo etc., y otros como son la T°, la humedad etc., (Garet 1998), los factores tienen gran participación en la supresión de nodulación ya que el nitrógeno fijado por el frijol será utilizado para una cosecha posterior por lo tanto el monocultivo posee una serie de inconvenientes en cuanto a la diversificación de condiciones del suelo y empobrecimiento de los mismos para la ineficiente participación de la fijación simbiótica de nitrógeno.





**Figura 7.** Promedio de nodulación por planta de ocho parcelas estudiadas en el ciclo P-V 2001

#### **5.04. Nodulación del ensayo en invernadero.**

Bajo condiciones de invernadero se estableció un ensayo experimental, con el propósito de evaluar la nodulación de cinco cultivares de frijol y conocer si la nodulación respondía de manera diferente en presencia de dichas variedades ya que como señalan diversos autores que en el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno en las leguminosas depende de la compatibilidad y la eficacia de ambas partes simbióticas y son los que marcan la diferencia en los resultados entre una de una leguminosa abundante en proteínas y una prospera cosecha (Garet 1998). La nodulación es un fenómeno común entre los miembros de las leguminosas; sin embargo, este evento no se lleva a cabo en todos los miembros de la familia, demostrándose que la nodulación y la fijación de nitrógeno es un factor frecuente, pero no obligatorio (Obaton. M. 1983). Sin embargo el frijol común (*P. Vulgaris* L.) es muy promiscuo para nodular a tal modo que se observa en los resultados reportados por Perret, Staehelin et al. (2000).



Por los resultados obtenidos, la nodulación no presento diferencias significativas estadísticas entre los tratamientos (variedad y tipo de suelo), (véase análisis de varianza en el apéndice), en donde persiste una marcada supresión de la nodulación en *Phaseolus vulgaris* L.; resultados que se comparan con resultados reportados por Vazquez Arroyo (1996) bajo condiciones de invernadero (120-410 nódulos/planta).

Los resultados encontrados nos conducen a suponer que la incapacidad para nodular se debe a que las cepas de *Rhizobium etli* que existen en el suelo; se ha perdido el plasmido sym y como se demuestra por los resultados reportados por Segobia, Piñero et al.(1991), quienes trabajaron con cepas no simbióticas y que al incorporarse a estas el plasmido, forman colonias que son indistinguibles a las que no tienen en plasmido. Esto se puede constatar por los resultados del invernadero, donde las condiciones ambientales adversas se controlaron, principalmente lo que es humedad y temperatura

La demanda continua en términos de elevar la productividad de la legumbre, la nodulación presenta problemas relacionados con la incapacidad de formar nódulos en la raíz, debe ser tolerante a varios ambientes y al factor genético de la planta. (Tas., Leinonen. et al. 1995) por lo que se deduce de nuestros resultados, el fríjol posee una baja capacidad para formar nódulos ya que las variedades evaluadas no presentaron diferencias significativas, por lo tanto importancia de una buena elección de tipo (variedad) la legumbres sera en el futuro, un primer indicador que se deberá de evaluar, para asegurar la simbiosis fríjol-*Rhizobium*.

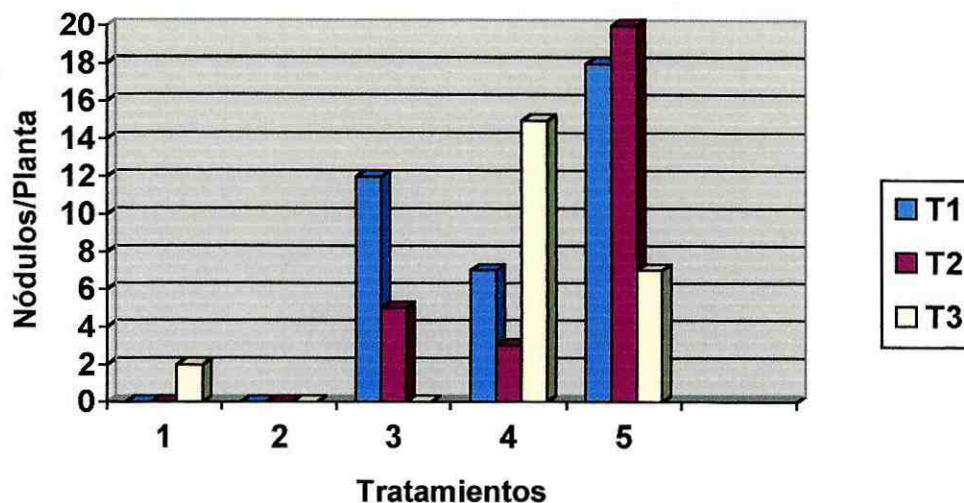


Figura 8. Comportamiento de nodulación de los tres tratamientos en el Invernadero

El comportamiento de supresión de la nodulación bajo condiciones de invernadero, indico que no existe una diferencia significativa entre tratamientos y las variedades de frijol utilizadas, dicho fenómeno pudiera atribuirse a los condiciones ambientales que prevalecieron, en periodo en que duro el experimento ( Dic-2001, Ene-2002) donde los registros de temperaturas fueron muy inestable y pudieron producir efectos negativos en la nodulación, como se muestra en cuadro seis de temperaturas mínimas y máximas que prevalecieron en esos meses datos obtenidos del Observatorio Meteorológico y Estación de Radio y Sondeo Torreón de la Comisión Nacional del Agua.

Será importante que para posteriores experimentos en esta área, se descarte que la supresión de nodulación no fue debida a los efectos de las temperaturas, ya que en estudios similares, las plantas de frijol de la región lagunera no nodulan bajo condiciones de campo, pero en ensayos de invernadero se demostro una nodulación significativa al inocularse con cepas de *Rhizobium etli* y *Rhizobium tropici* (Escaobar-Arreola 1992) y (Hernández-Mijarez 1992).

**Tabla 6.** Temperatura mínimas y máxima de Dic-01-Ene-02

Día	Diciembre 2001		Enero 2002	
	Máximas	Mínimas	Máximas	Mínimas
1	23.5	8.3	22.6	5.0
2	24.0	11.8	13.5	3.0
3	28.0	10.0	17.7	1.5
4	29.0	14.0	26.5	0.5
5	27.6	13.2	17.5	7.5
6	26.0	14.4	20.0	0.4
7	26.4	13.8	21.0	2.0
8	21.0	7.2	23.2	3.0
9	9.6	6.0	27.3	3.5
10	17.0	7.9	22.9	9.0
11	21.0	13.2	18.8	8.6
12	21.0	17.0	14.5	8.7
13	17.0	10.6	20.0	7.9
14	18.2	3.0	22.6	4.2
15	27.8	11.0	27.0	6.0
16	27.6	14.5	26.5	8.5
17	17.5	8.2	28.5	9.0
18	22.0	4.5	32.0	8.6
19	20.8	9.0	29.0	11.0
20	23.5	7.0	33.0	10.7
21	28.5	8.0	29.4	11.2
22	26.0	9.4	30.0	10.8
23	21.8	10.8	31.0	19.0
24	24.0	7.0	30.0	12.0
25	14.3	4.4	17.5	6.4
26	16.6	0.5	22.5	10.2
27	23.4	1.0	29.0	8.0
28	23.0	3.0	31.6	11.0
29	25.0	4.3	35.0	12.0
30	24.5	4.8	32.5	16.1
31	23.6	8.0	30.0	13.8

Finalmente, de acuerdo con los resultados encontrados, abre la posibilidad de estudios posteriores enfocados a considerar la presencia de poblaciones no nodulantes, así como el comprobar, las que se han considerado como de amplio rango de hospederos, como sería *R. tropici* (Moawad., Badr. et al. 1998), si tiene la capacidad para nodular los genotipos regionales de Guadalupe Victoria..Así mismo, se tendrá que trabajar para probar nuevas variedades potenciales para incrementar la producción de frijol, pero considerando la rotación de cultivos.



## **6.0. Conclusiones.**

1. Las comparaciones efectuadas entre las parcelas implicadas en el estudio nos permiten tener una visión de que el proceso de labores culturales llevado a cabo en la región de Guadalupe Victoria Dgo., no esta provocando la inhibición de la nodulación
2. El rango de hospederos de la planta es el responsable de inducir al juego de señales implicados en factor de nodulación por lo tanto una buena elección de la legumbre se traduce en una mayor nodulación ya que el frijol posee un bajo potencial de nodulación.
3. Los factores externos también pueden estar implicados en la supresión de nodulación como lo son la sequía, un mal manejo de los cultivos y el empobrecimiento del suelo.
4. El proceso de nodulación se puede ver interrumpido por varios factores pero en este estudio no se pudo constatar que la baja capacidad de nodulación se deba a un solo factor ya que en este proceso incurren varios aspectos que pueden estar suprimiendo la nodulación en esta zona.

## **7.0. Recomendaciones.**

Sin duda las principales fuentes en las que se debe tomar acción son los factores externos que se pueden controlar.

Los sistemas de agricultura sustentable es una buena opción para regular los bajos contenidos nutricionales de estos sitios experimentales para lo cual se deben implementar rotaciones efectivas de cultivos ya sean entre los cultivos plantados de un año a otro como medio de conservación del suelo. Es necesaria para evitar el empobrecimiento del suelo que produce el monocultivo. Existen algunas normas básicas para realizarla, como es la turna de cereales con leguminosas y plantas de raíces superficiales con plantas de raíces profundas; también es importante que los cultivos de un año requieran nutrientes diferentes que los del anterior. La rotación evita la persistencia de los parásitos asociados a una determinada especie vegetal ya que en estas zonas las condiciones son de temporal por lo tanto no existe una adición de nutriente como pueden ser compostas para lo cual es de suma importancia la nodulación para fijar nitrógeno al suelo.

Los sistemas de agricultura tradicionales son muy utilizados en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo, en gran medida debido a problemas económicos y a la falta de productos químicos. No obstante, cada vez son más ampliamente aceptados en los países desarrollados como reacción a los sistemas de explotación intensiva o industrial.

## 8.0. Literatura citada.

Aguilar, M.M., V. López, et al. (1998). "Prevalence of the *Rhizobium etli*-Like Allele in genes Coding for 16S rRNA Among the Indigenous Rhizobial Population Found Associated With Wild Beans from the Sothern Andes in Argentina." Environmental Microbiology **64**: 3520-3523.

Anyango, B.K., Wilson, et al. (1998). Competition in Kenyan soils between *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* strain Kim5 and *R. tropici* strain CIAT899 using the *gusA* marker. Molecular Microbiol Ecology or the Soil. G. Hardarson., W., J., Broughton. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 69-87.

Bauer, T. (2001). Microorganismos Fijadores de Nitrógeno,  
<http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html#/reconocimiento>.  
15 de febrero del 2002.

Bellone. D:C. (2001) Fijación Biológica del Nitrógeno Atmosférico en Leguminosas  
<http://www.microbiologia.com.ar/suelo/rhizobium.html#/reconocimiento>.  
15 de febrero del 2002.

Berkum, V.P., D. Beyene, et al. (1998). "*Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* (L.) Ledebour." Environ. microbio **48**: 13-22.

Burdman., S., H. Volpin., et al. (1996). "Promotion of nod Gene Inducers and Nodulation in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Roots Inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd." Environmental Microbiology **62**: 3030-3033.



- Brom, S., A. Garcia de los Santos, et al. (2000). "In *Rhizobium etli* symbiotic Plasmid Transfer Nodulation Competitivity and Cellular Growth Requiere Interaction Among Different Replicons." IDEAL **44**: 34-43.
- Ceccatto, V.M., Gomes. J. E., et al. (1988). effects of host plant origin on nodulin activities and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. Molecular Microbiol Ecology or the Soil. G. Hardarson., W.J., Broughton. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 78-87.
- Contreras, V.E., R.C., Thamason, et al. (1994). "Diferenciación Biometrica y Cuantificación de nitrógeno Simbioticamente Fijada en *Pisum sativa spp.* arvense (L.) *Poir* y *Vicia villosa* Roth como respuesta a la Inoculación y Fertilización Nitrogenada." Agronomia Tropical **43**: 189-207.
- Del Papa, M.F., J.L. Balagué, et al. (1999). "Isolation and Characterization of Alfalfa-Nodulatin Rhizobia Present in Acidic of Central Argentina and Uruguay." Invrionmental Microbiology **65**: 1420-1427.
- Escaobar-Arreola, S. (1992). Respuesta de los genotipos regionales de Fríjol "Lagunero 87" y "Pinto Americano-112" a la inoculación con cepas introducidas de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Torreón, coah., UAAAN-Unidad Laguna.
- Garet, J. (1998). Role of legumes in sustainable cropping systems. Molecular Microbiol Ecology of the Soil. G. W. J. B. Hardarson. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: xi-xix.
- Hernández., G. (2001). Biología Molecular de Planta,  
[htt://itzamna.inf.unam.mx/Plant\\_Molecular\\_Biology/plant\\_molecular\\_biology\\_es.htm](http://itzamna.inf.unam.mx/Plant_Molecular_Biology/plant_molecular_biology_es.htm). 15 de febrero 2002.

- Hernández-Mijarez, I. (1992). Respuesta del genotipo "Pinto Laguna-80" a la inoculación con cepas introducidas de *Rhizobium* bajo condiciones de invernadero. Tesis de Licenciatura. Torreón coah., UAAAN-Unidad Laguna
- Hirsch, P.R., M.V., Montagu, et al. (1980). "Physical Identification of Bacteriocinogenic, Nodulation and Other Plasmids in Strains OF *Rhizobium leguminosarum*." General Microbiology **120**: 403-412.
- Irving, R.H., M.N., Boukli, et al. (2000). Nod-factors in symbiotic development of root hairs. Root hairs. W. R. Ridge and A. M. C. Emons: 241-265.
- Kay, H.E., H.L.C., Coutinho, et al. (1994). "The identification of *Bradyrhizobium japonicum* strain isolated from Italian soils." Microbiology **140**: 233-2339.
- Lam, H.M., Coschigano K.T., et al. (1996). "The Molecular-Genetics of Nitrogen Assimilation Intro Amino Acids in Higher Plants." Plant Physiol Plant. Mol. Boil.: 570.
- Leung, K. and P. Bottomley (1987). "Influence of Phosphate on the Growth and Nodulation Characteristics of *Rhizobium trifolii*." Environmental Microbiology **53**: 2098-2105.
- Ludwing, W., R. Amann, et al. (1998). rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria. Molecular Microbiol Ecology of the Soil. G. W. J. B. Hardarson. Netherlands., Kluwer Academic Publishers: 1-19.

- Martínez-Romero, E., I. Hernández-Lucas, et al. (1998). Symbiotic performance of some modified *Rhizobium etli* strain in assays with *Phaseolus vulgaris* beans that have a high capacity to fix N<sub>2</sub>. Molecular Microbiol Ecology or the Soil. G. W. J. B. Hardarson. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 89-94.
- Mendoza, A., A. Leija, et al. (1995). "The Enhancement of Ammonium Assimilation in *Rhizobium etli* Prevents Nodulation of *Phaseolus vulgaris*." Phytopathological Society **8**: 584-592.
- Moawad, H., E.-D. Badr, S.M.S., et al. (1998). Improvement of biological nitrogen fixation in Egyptian winter legumes through better management of *Rhizobium*. Molecular Microbiol Ecology or the soil. G. W. J. B. Hardarson. Netherlands, Kluwe Academic Publisher: 95-106.
- Obaton. M. (1983). "Improving nitrogen fixation in legumes by plant breeding; the relevance of the host selection experiments in red clover (*Trifolium pratense* L.) and subterranean clover (*T. Subterraneum* L.)." Plant Soil. **82**: 285-301
- Olivieri. and S.A. Frank (1994). "The evolution of Nodulation in *Rhizobium*: Altruism in the Rhizosphere." Heredity **85**: 46-47.
- Perret, X. and W.J. Broughton (1998). Rapid identification of *Rhizobium* strain by targeted PCR fingerprinting. Molecular Microbiol Ecology of the Soil. G. Hardarson., W.,J., Broughton. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 21-34.
- Perret, X., C. Staehelin, et al. (2000). "Molecular basis of symbiotre promiscuity." Microb. Mol. Biol.Cell **64**: 180-201.



- Popescu, A. (1998). Contributions and limitations to symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Romania. Molecular Microbiol Ecology or the Soil. G. Hardarson., W., J., Broughton. Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 117-125.
- Pooyan, S., M.L.C.G., et al. (1994). "Characterización of a *Rhizobium etli* chromosomal gene required for nodule development on *Phaseolus vulgaris* L." World J. Microbial Biotech **10**: 583-589.
- Raz, R., T. Clavero, et al. (1995). "Efecto de la fertilización con N y P sobre la nodulación de 2 ecotipos de *Leucaena leucophala*." Fac. Agron **12**: 187-192.
- Robledo, E.A., K. Kmiecik, et al. (1998). "Trifolitoxin Production Increases Nodulation Competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under Agricultural Conditions." Environmental Microbiology **64**: 2630-2633.
- Rosemeyer, V., J. Michiels, et al. (1997). "luxI-and luxR-Homologous Genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 Contribute to Synthesis of Autoinducer Molecules and Nodulation of *Phaseolus vulgaris*." American Society for Microbiology **180**: 815-821.
- Sanchez, A. and J. Urdaneta (1997). "Evaluación de la Distribución Espacial de Nódulos en la *Leucaena leucecephala* (LAM) de Wit." Fac. Agron **14**: 457-463.
- Segobia, L., D. Piñero, et al. (1991). "Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*." Appl. Environ Microbiol. **57**: 426-433.

- Schultze, M. and A. Kondorosi (1998). "Regulation of symbiotic root nodule development." Annu. Rev. Genet., **32**: 33-57.
- Stacey, G. (1995). "*Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics." Microbiology Letters **127**: 1-9.
- Tas, E., P. Leinonen, et al. (1995). "Assessment of Competitiveness of Rhizobia Infecting *Galega orientalis* on the Basis of Plant Yield, Nodulation and Strain Identification by Antibiotic and PCR." Environmental Microbiology **62**: 529-535.
- Tate, R., E.J. Patriarca, et al. (1994). "Development of *phaseolus vulgaris* roots nodules." Molecular Plant Microbe Interactrons **7**: 582-589.
- Vázquez Arroyo, J. (1996). Fijación biológica de nitrógeno en frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas de *Rhizobium*. Subdirección de Estudios de Posgrado. Monterrey, N.L., Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas: 104
- Weiser, G. C., K. F. Grefton, et al. (1985). "Nodulation of dry beans by comercial and indigenous strains of *Rhizobium phaseoli*." Agron. J. **77**: 856-859.
- Woo, C., L. Park, et al. (1999). "*Rhizobium leguminosarum* como Organismo Controlador de la Interacción Hospedero-Patógeno Clavel (*Dianthus caryophyllus*) *Fusarium Oxysporum* F.sp.dianthi." Colombiana de Química **28**.
- Young, J.P.W. and A.W.B. Johnston (1989). "The evolution of specificity in the legume-*Rhizobium* symbiosis." Environ microbiol **4**: 341-348.

## 9.0. Apéndice.

Tabla. 7. Análisis de varianza de las muestras de campo con un diseño Completamente al azar.

<b>F.v</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Tratamientos	6	7,444.62	1,240.77	2.09	0.06
Error	62	36,739.92	592.57		
Total	68	44,184.54			

**C:V= 69.92%**

Tabla. 8 Análisis de varianza de las muestras del ensayo del invernadero con un diseño Bifactorial Completamente al azar

<b>F.v</b>	<b>G.L</b>	<b>S.C</b>	<b>C.M</b>	<b>F</b>	<b>P&gt;F</b>
Factor A	2	65.43	32	0.45	0.64
Factor B	4	1,301.30	325.32	4.48	0.00
Interacción	8	660.29	82.53	1.13	0.34
Error	135	9,787.09	72.49		
Total	149	11,814.13			

**C:V= 203.69%**