



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DE LA COLONIZACIÓN DE ROCAS POR *Mammillaria fraileana* (Britt. y Rose) Boed. [Cactaceae] Y EVALUACIÓN DE LA ASOCIACIÓN CON BACTERIAS ENDÓFITAS EN EL CRECIMIENTO VEGETAL Y SOBRE LA INTEMPERIZACIÓN DE ROCAS

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología)

Presenta

Blanca Estela Romero López

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2009

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 10 horas del día 12 del mes de Junio del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis, avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. a liberar la Tesis de Grado titulada:

Estudio de la colonización de rocas por *Mammillaria fraileana* (Britt. & Rose) Boed. [Cactaceae] y evaluación de la asociación con bacterias endófitas en el crecimiento vegetal y sobre la intemperización de rocas.

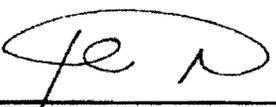
Presentada por la alumna:

Blanca Estela Romero López

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Ecología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su APROBACION DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

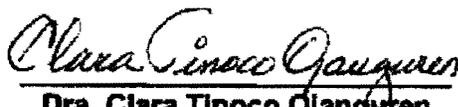
LA COMISIÓN REVISORA



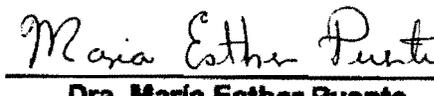
Dr. Yoav Bashan
Co-Director de tesis



Dr. Macario Bacilio Jiménez
Co-Director de tesis



Dra. Clara Tinoco Ojanguren
Co-Tutora



Dra. Maria Esther Puente
Co-Tutora



Ph. D. Bernard T. Bormann
Co-Tutor



Vo. Bo. Dra. Elisa Serviere Zaragoza
Directora de Estudios de Posgrado

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Yoav Bashan (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste)
Co-Director de Tesis

Dr. Macario Bacilio Jiménez (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste)
Co-Director de Tesis

Dra. Clara Tinoco Ojanguren (Universidad Nacional Autónoma de México)
Co-Tutora

Dra. María Esther Puente (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste)
Co-Tutora

Ph. D. Bernard Bormann (Oregon State University)
Co-Tutor

COMITÉ REVISOR

Dr. Yoav Bashan
Co-Director de Tesis

Dr. Macario Bacilio Jiménez
Co-Director de Tesis

Dra. Clara Tinoco Ojanguren
Co-Tutora

Dra. María Esther Puente
Co-Tutora

Ph. D. Bernard Bormann
Co-Tutor

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Yoav Bashan
Dr. Macario Bacilio Jiménez
Dra. Clara Tinoco Ojanguren
Dra. María Esther Puente
Dr. José Luis León de la Luz

SUPLENTE:

Dra. Sara C. Díaz Castro

RESUMEN

Entre las relaciones asociativas de plantas y microorganismos el endofitismo representa una interacción sinergista con beneficio para ambos organismos. En la actualidad se presume la presencia ubicua en los vegetales superiores de las bacterias endófitas y se van encontrando evidencias de la participación de estos microorganismos en procesos que se creía eran llevados a cabo exclusivamente por las plantas. Se hipotetizó que las bacterias endófitas pueden representar un papel importante en el establecimiento de plantas en rocas a través de la promoción del crecimiento vegetal y la intemperización de rocas. El presente estudio abordó desde enfoques de ecología vegetal, microbiología y fisiología vegetal, la importancia de algunas especies colonizadoras de rocas, el aislamiento, la identificación y caracterización parcial de la microflora endofítica así como el efecto de su inoculación en la fisiología de *Mammillaria fraileana*, endémica de la Península de Baja California.

El estudio ecológico de la abundancia de especies saxícolas resaltó la importancia de *M. fraileana* como colonizadora de rocas e indicó que las variaciones locales de su abundancia se asociaron con el tipo de roca, proporción de minerales, susceptibilidad a la intemperización y proporción de elementos en las rocas. Sitios con baja abundancia de plantas fueron caracterizados por la presencia de brecha volcánica ricas en Ca, Fe, Mg, Ti, Al y Mn, contenidos en minerales moderadamente intemperizables como plagioclasa y piroxenos. Sitios con alta abundancia de plantas presentaron roca tipo riodacitas-andesitas ricas en minerales más fácilmente intemperizables y elementos como Si, K y Na. Se sugiere que la interacción entre elementos, más que el efecto aislado de alguno de ellos puede ser la explicación más viable para explicar variaciones locales de la abundancia de *M. fraileana*.

En el enfoque microbiológico se confirmó la presencia de bacterias endófitas de *M. fraileana* a través de métodos cultivo-dependientes y cultivo-independientes. Se probaron diversos esquemas de desinfección y medios de cultivo sin obtener bacterias cultivables en semillas, frutos y plántulas. Sin embargo, utilizando técnicas cultivo-independientes como amplificación del gen 16S rDNA, hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y tinción de bacterias viables (FDA) se confirmó la presencia de bacterias endófitas en semillas. Las evidencias cualitativas por microscopía electrónica de barrido también indicaron la presencia de bacterias en el interior de semillas. También se detectaron bacterias endófitas cultivables en tallo y raíz.

De raíz se aislaron 14 morfotipos bacterianos, identificándose por secuenciación total del gen 16S rRNA a las cepas *Azotobacter vinelandii* M2Per, *Bacillus megaterium* M1PCa, *Pseudomonas putida* M5TSA y *Enterobacter sakazakii* M2PFe. En pruebas *in vitro* se observó que *A. vinelandii* M2Per fue la única cepa fijadora de nitrógeno. La capacidad para solubilizar fosfatos inorgánicos fue comprobada para *P. putida* M5TSA, *E. sakazakii* M2PFe y *B. megaterium* M1PCa mientras que *A. vinelandii* M2Per, *P. putida* M5TSA y *B. megaterium* M2PCa degradaron rocas riodacitas a través de la reducción del tamaño de las partículas de rocas y cambios notables en el pH del medio.

A los 3.5 meses de la inoculación con bacterias endófitas de raíz en plántulas de *M. fraileana* se observaron colonización y establecimiento exitosos a nivel intracelular del tejido vegetal. La inmunolocalización fluorescente y microscopía electrónica de barrido indicaron que la mayor densidad bacteriana ocurre en la raíz y disminuye en sentido acropétalo. Se demostró que la intemperización de rocas puede acelerarse a través del aumento en la movilización de elementos minerales hacia plantas inoculadas con bacterias endófitas. Las cepas más eficientes en la movilización de elementos fueron *B. megaterium*, *P. putida* y *E. sakazakii*. El aumento en la movilización de elementos minerales bajo la acción de las bacterias endófitas no produjo, en apariencia, algún efecto por toxicidad en las plantas. En las interacciones entre inóculos

y variantes de sustrato se observaron diversas combinaciones de elementos en proporciones variables, sugiriendo que la movilización es un proceso complejo que, entre otros factores, depende de la composición química de las rocas, la proporción relativa y la disponibilidad de los elementos minerales. Los patrones de movilización de elementos mostraron un grado de asociación con la abundancia de *M. fraileana* colonizando rocas, siendo el Na y P notablemente más movilizados de las rocas donde *M. fraileana* crece en abundancia, mientras que el Fe fue mayormente movilizado de las rocas con muy baja abundancia. Dada la amplia gama de respuestas que presentan las cactáceas ante diferentes condiciones de nutrientes en el sustrato se recomiendan estudios específicos para definir la función de cationes como el Si, Na y para explicar la tolerancia de las cactáceas a elementos como el Cu y Zn que resultan tóxicos para otras plantas.

El crecimiento de las plantas crecidas en sustrato rocoso fue intensificado por la inoculación con bacterias endófitas. La inoculación con *E. sakazakii* M2PFe produjo mayor biomasa seca en las plantas mientras que la inoculación con *P. putida* M5TSA incrementó significativamente el nitrógeno total en las plantas. Por otro lado *P. putida* y *A. vinelandii* M2Per incrementaron la actividad fotosintética vía metabolismo ácido crasuláceo (CAM). Se propone que el metabolismo CAM puede participar activamente en la disolución de minerales mediante la producción y liberación de ácidos orgánicos como el malato.

Palabras clave: Bacterias endófitas, cactáceas, colonización de rocas, intemperización de rocas, bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB).

ABSTRACT

Among associative interactions between plants and microorganisms, endophytism represents a synergistic interaction benefitting both organisms. Endophytic bacteria occur in most plants and evidence is accumulating that endophytes participate in processes formerly believed to be carried out exclusively by plants. It is hypothesized that endophytic bacteria play an important role in plant establishment through promoting plant growth and weathering rock. This study explored approaches in plant ecology, microbiology, and plant physiology to document the importance of rock-colonizing plants, its endophytic microflora, and the effect of inoculation with endophytic bacteria on plant physiology. We used the small cactus *Mammillaria fraileana*, an endemic of the Baja California Peninsula, as a model.

The ecological survey of saxicolous (rock-dwelling) plants highlighted the importance of *M. fraileana* as a rock-colonizing plant and showed that local variations in abundance were associated with the type of bedrock, minerals, weathering characteristics, and the proportion of elements. Sites with few plants contain volcanic breccias containing high amounts of Ca, Fe, Mg, Ti, Al, and Mn in moderately weatherable minerals, such as plagioclase and pyroxene. Sites with rocks of rhyodacite, rhyolite, and andesite are rich in more weatherable minerals, such as volcanic glass and minerals containing Si, K, and Na. These results suggest that interactions of elements, rather than the isolated effect of specific elements, could be the most reliable explanation for local variations in the abundance and dominance of *M. fraileana*.

The microbiological approach confirmed that endophytic bacteria are present in *M. fraileana* by using cultivation-dependent methods and cultivation-independent methods. Several techniques of disinfection and culture media were tested and no culturable bacteria were isolated from seeds, fruits, and seedlings. The occurrence of endophytic non-culturable bacteria in seeds was demonstrated by amplification of 16S rDNA, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), and vital fluorescent staining (FDA). Evidence from electron scanning microscopy (SEM) also indicated natural occurrence of endophytic bacteria in seeds.

Culturable endophytic bacteria were detected in stems and roots. Among 14 strains isolated from roots, *Azotobacter vinelandii* M2Per, *Bacillus megaterium* M1PCa, *Pseudomonas putida* M5TSA, and *Enterobacter sakazakii* M2PFe were identified by full sequencing of 16S rRNA. *In vitro* tests showed that only *A. vinelandii* M2Per is a nitrogen fixer. Solubilization of inorganic phosphate was exhibited in *P. putida* M5TSA, *E. sakazakii* M2PFe, and *B. megaterium* M1PCa, while *A. vinelandii* M2Per, *P. putida* M5TSA, and *B. megaterium* M1PCa degraded rhyodacite by reducing the size of rock particles and by extensively changing the pH of the liquid media.

After 3.5 months of inoculation with endophytic bacteria of seedlings of *M. fraileana*, intracellular colonization and establishment was observed. Fluorescent immuno-localization and SEM showed that densities of bacterial populations decreased from the root and stem toward the apical zones.

Results demonstrated that rock weathering is accelerated by increasing mobilization of elements to the plants inoculated with endophytic bacteria. The most efficient strains in mobilizing elements to plants were *B. megaterium* M1PCa, *P. putida* M5TSA, and *E. sakazakii* M2PFe. Increased mobilization did not seem to produce toxic effects in plants inoculated with endophytic bacteria. Among interactions between inoculants and rock substrates, there were several combinations of elements mobilized to plants at variable proportions that suggested that mobilization is a complex process that depends on chemical composition of rocks and availability of elements and their relative proportion. Patterns of element mobilization showed association to the abundance of *M. fraileana* in the wild. Na and P were more mobilized from rocks where low abundance of plants occurred while Fe was higher in plants grown on rock substrate with low

abundance of plants. Given the wide range of responses of cacti to different nutrient conditions of substrates, specific studies intended to define the role of cations, such as Si and Na and to explain the tolerance of cacti to elements, such as Cu and Zn, that are toxic for most plants should be preformed.

Inoculation with *E. sakazakii* M2PFe increased the dry weight of plants, while *P. putida* M5TSA increased total nitrogen of plants. *P. putida* M5TSA and *A. vinelandii* M2Per enhanced photosynthetic activity through crassulacean acid metabolism (CAM). We suggest that organic acids, such as malate, produced during CAM may actively participate in dissolving minerals.

Key words: Endophytic bacteria, cacti, colonization of rock, weathering of rock, plant growth-promoting bacteria (PGPB).

DEDICATORIA

Al Dr. C.Y. Li

Por el invaluable apoyo que me brindó después de su retiro como investigador

Por su ejemplar calidad humana

* * * * *

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca con registro 166334 y por el apoyo de la beca para formación de doctores (periodo 2006).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las facilidades otorgadas.

Al financiamiento de los proyectos, CONACYT-2002-C01-39520 “Reforestación del Desierto: El rol de los microorganismos del suelo y roca y de las islas de recursos en el establecimiento de plantas para la restauración de áreas perturbadas”, CONACyT 50052-Z “Phytostabilization of mine in northwestern México: The role of plant soil microbe interactions” y CONACYT U43069-Z “Mitigación del estrés salino en plantas de Chile utilizando bacterias promotoras del crecimiento vegetal y composta”.

A mi comité tutorial, Dr. Yoav Bashan y Dr. Macario Bacilio Jiménez (co-directores), Dra. Clara Tinoco Ojanguren, Dra. María Esther Puente y Dr. Bernard Bormann (tutores).

Al Dr. Yoav Bashan, por compartirme su amplia visión como investigador, por brindarme la oportunidad de vencer retos.

Al Dr. Macario Bacilio Jiménez por ser constante guía y apoyo durante la realización de esta tesis, por su apoyo en campo y laboratorio. Por su preocupación constante en mi desempeño académico y humano.

A la Dra. Clara Tinoco Ojanguren por su amable disposición para despejar cualquier duda, por dar orden a mis ideas.

A la Dra. Ma. Esther Puente, por compartirme su experiencia en el tema de bacterias endófitas y su participación en el proceso de intemperización, por su cordial entusiasmo y apoyo para la culminación de esta tesis.

Al Dr. Bernard Bormann por su apoyo para la realización de la estancia de investigación en la Universidad Estatal de Oregon- USDA, Estación del Noroeste del año 2006 al año 2007.

Al Dr. Li, por brindarme apoyo logístico y asesoría durante el desarrollo estancia de investigación en la Universidad Estatal de Oregon (OSU)-USDA durante el año 2006 al 2007.

A la Dra. Zsuzsanna Balogh-Brunstad (Universidad Estatal de Washington, USA) por su desinteresada participación en la realización de los análisis mineralógicos y microanálisis de rocas por fluorescencia de Rayos-X.

A técnico Al Soeldner de la Universidad por su asesoría y entrenamiento técnico para el uso del microscopio electrónico de barrido.

Al Dr. Michael Holmes por su entrenamiento en la realización de la tinción fluorescente para bacterias viables.

A Kathy Cook del Departamento de Botánica y Fitopatología (OSU), por su invaluable apoyo durante la ejecución técnicas histológicas, por su confianza y simpatía.

A la Dra. Lynda Ciuffetti del Departamento de Botánica y Fitopatología (OSU) por las facilidades para el uso del microscopio epifluorescente.

A Viola Manning del Departamento de Botánica y Fitopatología (OSU) por valiosa guía en la ejecución de la inmunotinción de cortes histológicos de plántulas.

Al técnico Brett Morrisette por su apoyo logístico durante la realización de la estancia de investigación en la Universidad Estatal de Oregon- USDA.

A la Dra. Teresa Terrazas del Colegio de Posgraduados por brindarme las facilidades durante la realización de la estancia en el mencionado instituto y por el entrenamiento técnico para la realización de cortes histológicos en parafina y plástico.

A la Dra. Luz Estela de Bashan por su valiosa ayuda en la extracción de DNA bacteriano de semillas, por su asesoría en la realización de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* y por sus comentarios al presente escrito.

Al Dr. Amaury Cordero Tapia, responsable del Bioterio del CIBNOR por su asesoría para la obtención de anticuerpos policlonales. Por su constante apoyo y amistad.

Al Técnico Ariel Villacorta, responsable del laboratorio de Microscopía Electrónica por su asistencia en la búsqueda de bacterias endófitas en semillas y plántulas. Por su paciente apoyo para la realización de microanálisis por Rayos-X.

Al Técnico Baudilio Acosta por su cordial apoyo en los análisis químicos por espectrofotometría de absorción atómica.

Al Técnico René Rebollar del laboratorio de Cromatografía por su apoyo en la determinación de reducción de acetileno

A la Técnico Sonia Rocha y personal del laboratorio de Bromatología por su apoyo en la determinación de Nitrógeno total en plantas.

Al Dr. Maeda y al técnico Armando Monge Q. del laboratorio de ecofisiología de organismos acuáticos por las facilidades otorgadas para la determinación de número de partículas de roca.

A la M. en C. Carmen Rodríguez responsable del laboratorio de histología del CIBNOR, por su guía para la obtención de cortes histológicos en parafina.

Al M. en C. Juan Pablo Hernández por su apoyo técnico y logístico durante el desarrollo de esta tesis.

A la técnico M. en C. Patricia Vázquez por su apoyo en campo para la recolección de semillas 2008 y por su colaboración en la cosecha de plántulas.

Al técnico Bernardo Salazar por su apoyo en campo para las mediciones de plantas en campo.

A Joel Hiraes del Departamento de Geología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S., México por su apoyo en la identificación de rocas.

A mis entrañables compañeras Aly y Chio por su apoyo en la minuciosa cosecha de plantas. A Chio, por su apoyo en campo.

A los compañeros que me asistieron durante sus estancias profesionales, Lirio, Emmanuel, Enrique y Liz.

A mi familia, en especial a mi esposo Alfonso Medel por su solidario apoyo y motivación para culminar esta tesis. A mis padres Martha López y Fernando Romero por estar en mi vida. A mis hermanos Georgina y Alejandro, a mis cuñados y sobrinos, por apoyarme a la distancia. A la memoria de mi hermano David, por permanecer conmigo. A mis tíos y familia en general por estar al tanto de mi formación académica. A Luis por motivarme y estar siempre al tanto de mí.

A las personas que me apoyaron en diversas formas, a Lauren e Ian Courter por hacerme parte de su familia durante mi estancia en Corvallis, OR. A Claudia y Franciso por su apoyo.

En general al grupo de Microbiología ambiental.

A los que han compartido su conocimiento desinteresadamente.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| CAPÍTULO I | 3 |
| Plantas colonizadoras de rocas: Abundancia de <i>Mammillaria fraileana</i> (Britt. & Rose) Boed. [CACTACEAE] en relación con el tipo y composición de las rocas en el sur del Desierto Sonorense | 3 |
| 1.1. ANTECEDENTES | 3 |
| 1.2. JUSTIFICACIÓN | 5 |
| 1.3. OBJETIVOS | 5 |
| 1.3.1. Objetivo general | 5 |
| 1.3.2. Objetivos específicos | 5 |
| 1.4. HIPÓTESIS | 6 |
| 1.5. MÉTODOS | 6 |
| 1.5.1. Rasgos botánicos del viejito <i>M. fraielana</i> (Britt. & Rose) Boed. | 6 |
| 1.5.2. Área de estudio | 7 |
| 1.5.3. Aspectos geológicos y litológicos | 8 |
| 1.5.4. Vegetación | 9 |
| 1.5.5. Sitios de estudio | 10 |
| 1.5.6. Mediciones de abundancia | 10 |
| 1.5.7. Identificación de los tipos de rocas | 11 |
| 1.5.8. Análisis mineralógico | 11 |
| 1.5.9. Composición de elementos en las rocas | 12 |
| 1.5.10. Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de <i>M. fraileana</i> | 13 |
| 1.5.11. Análisis estadístico | 14 |
| 1) Importancia de las plantas colonizadoras de rocas | 14 |
| 2) Variación espacial de la abundancia | 14 |
| 3) Variación espacial de la composición química de rocas en los sitios de estudio | 15 |
| 4) Correlación de la abundancia de planta y la composición química del sustrato | 15 |
| 5) Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de <i>M. fraileana</i> | 15 |
| 1.6. RESULTADOS | 16 |
| 1.6.1. Importancia relativa de las plantas colonizadoras de rocas | 16 |
| 1.6.2. Variaciones espaciales en la abundancia de <i>M. fraileana</i> | 19 |
| 1.6.3. Litología y mineralogía | 20 |
| 1.6.4. Variación espacial de la composición química de rocas en los sitios de estudio | 23 |
| 1.6.5. Correlación entre la abundancia de <i>M. fraileana</i> y la composición química de las rocas | 29 |
| 1.6.6. Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de <i>M. fraileana</i> | 29 |
| 1.7. DISCUSIÓN | 31 |
| 1.8. CONCLUSIONES PARCIALES | 36 |
| CAPÍTULO II | 37 |
| Bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> : Inoculantes con capacidad para promover el crecimiento vegetal y/o degradar rocas | 37 |
| 2.1. ANTECEDENTES | 37 |
| 2.1.1. El término endófito | 37 |
| 2.1.2. Definición de bacterias endófitas | 38 |
| 2.1.3. Evolución de las relaciones endofíticas | 39 |
| 2.1.4. Las semillas como fuente de endófitas | 42 |
| 2.1.5. Vías de entrada y proceso de colonización de las bacterias endófitas | 42 |
| 2.1.6. Espectro bacterias endófitas y especies vegetales | 45 |
| 2.1.7. Niveles de abundancia de bacterias endófitas cultivables | 50 |
| 2.1.8. Procedimientos para la detección, aislamiento y cultivo de bacterias endófitas | 51 |

| | |
|--|----|
| 2.1.9. Técnicas de desinfección superficial para obtención de bacterias endófitas | 51 |
| 2.1.10. Cultivo del material vegetal en medio de cultivo | 53 |
| 2.1.11. Detección de bacterias endófitas por métodos cultivo-independientes | 54 |
| 2.1.12. Aplicaciones de las bacterias endófitas | 54 |
| 2.1.13. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGBP) y bacterias degradadoras de rocas | 56 |
| 2.2. JUSTIFICACIÓN | 58 |
| 2.3. OBJETIVOS | 59 |
| 2.3.1. Objetivo General | 59 |
| 2.3.2. Objetivos específicos | 59 |
| 2.4. HIPÓTESIS | 60 |
| 2.5. MÉTODOS | 61 |
| 2.5.1. Obtención de bancos de semilla | 61 |
| 2.5.2. Detección, cuantificación y aislamiento de bacterias endófitas de tallos, raíces, frutos y semillas de <i>M. fraileana</i> | 61 |
| 2.5.2.1. Endófitas cultivables de frutos y semillas | 61 |
| 2.5.2.2. Bacterias endófitas cultivables de frutos | 62 |
| 2.5.2.3. Bacterias endófitas cultivables de semillas | 62 |
| 2.5.2.4. Bacterias endófitas cultivables de plántulas | 63 |
| 2.5.2.5. Presencia natural de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de <i>M. fraileana</i> | 64 |
| 2.5.2.5.1. Bacterias endófitas no-cultivables de semillas | 64 |
| 2.5.2.5.2. Detección y cuantificación de bacterias viables en semilla por tinción fluorescente | 65 |
| 2.5.2.5.3. Detección de bacterias por Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) | 66 |
| 2.5.2.5.4. Detección de bacterias endófitas de semilla por Microscopía electrónica de barrido (MEB) | 69 |
| 2.5.2.5.5. Detección de bacterias endófitas de semilla por amplificación del 16 sDNA | 70 |
| 2.5.2.6. Bacterias endófitas cultivables de tallos de plantas adultas | 72 |
| 2.5.2.7. Bacterias endófitas cultivables de raíces de plantas adultas | 73 |
| 2.5.2.8. Higienización de raíces | 73 |
| 2.5.2.9. Identificación de las bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> | 75 |
| 2.5.2.10. Evaluación del potencial de las bacterias aisladas como PGPB (pruebas de solubilización de fosfatos de Calcio y fijación de Nitrógeno) | 75 |
| a) Aislamiento de cepas bacterianas de endófitas cultivables de <i>M. fraileana</i> con potencial para fijar nitrógeno | 75 |
| b) Reducción de acetileno por bacterias endófitas de raíz | 76 |
| c) Pruebas de remoción de fosfatos inorgánicos de calcio | 78 |
| c.1) Análisis estadístico | 78 |
| d) Degradación de rocas por bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> | 79 |
| d.1) Análisis estadístico | 81 |
| 2.6. RESULTADOS | 82 |
| 2.6.1. Detección, cuantificación y aislamiento de bacterias endófitas de tallos, raíces, frutos y semillas de <i>M. fraileana</i> | 82 |
| 2.6.1.1. Endófitas cultivables de frutos y semillas | 82 |
| 2.6.1.2. Bacterias endófitas cultivables de frutos | 82 |
| 2.6.1.3. Bacterias endófitas cultivables de semillas | 82 |
| 2.6.1.4. Bacterias endófitas cultivables de plántulas | 83 |
| 2.6.1.5. Presencia natural de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de <i>M. fraileana</i> | 83 |
| 2.6.1.5.1 Detección y cuantificación de bacterias viables en semilla por tinción fluorescente | 83 |
| 2.6.1.5.2. Detección de bacterias por Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (FISH) | 84 |
| 2.6.1.5.3. Detección de bacterias endófitas de semilla por Microscopía Electrónica de Barrido | 84 |
| 2.6.1.5.4. Detección de bacterias endófitas de semilla por amplificación del 16 sDNA | 85 |
| 2.6.1.6. Bacterias endófitas cultivables de tallos de plantas adultas | 86 |
| 2.6.1.7. Bacterias endófitas cultivables de raíces de plantas adultas | 86 |
| 2.6.1.8. Identificación de las bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> | 88 |
| 2.6.1.9. Evaluación del potencial de las bacterias aisladas como PGPB | 90 |

| | |
|--|-----|
| 2.6.1.9.1. Aislamiento de cepas bacterianas de endófitas cultivables de <i>M. fraileana</i> con potencial para fijar nitrógeno | 90 |
| 2.6.1.9.2. Reducción de acetileno por bacterias endófitas de raíz..... | 90 |
| 2.6.1.9.3. Remoción de fosfatos inorgánicos de calcio por bacterias endófitas de raíz | 91 |
| 2.6.1.9.4. Degradación de rocas por bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> | 93 |
| a) Efecto de la inoculación de bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> en el pH del medio conteniendo roca pulverizada en suspensión. | 93 |
| b) Dinámica poblacional de las poblaciones de endófitas de <i>M. fraileana</i> incubadas en medio líquido con roca pulverizada..... | 95 |
| c) Efecto de las bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> en el número de partículas de roca pulverizada en suspensión..... | 96 |
| 2.7. DISCUSIÓN | 100 |
| 2.7.1. Presencia natural de bacterias endófitas en la cactácea <i>M. fraileana</i> | 100 |
| 2.7.2. Bacterias endófitas cultivables de <i>M. fraileana</i> con potencial para fijar nitrógeno..... | 104 |
| 2.7.3. Degradación de rocas riodacita por bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> y solubilización de fosfatos inorgánicos..... | 105 |
| 2.8. CONCLUSIONES PARCIALES..... | 108 |
| 3. CAPÍTULO III..... | 110 |
| Efecto de la inoculación con bacterias endófitas en la intemperización de las rocas y en el crecimiento de <i>M. fraileana</i> | 110 |
| 3.1. ANTECEDENTES..... | 110 |
| 3.1.1. Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal | 110 |
| 3.1.2. Mecanismos biológicos participantes en la intemperización de rocas..... | 111 |
| 3.3. OBJETIVOS | 114 |
| 3.3.1. Objetivo general | 114 |
| 3.3.1. Objetivos particulares..... | 114 |
| 3.4. HIPÓTESIS..... | 115 |
| 3.5. MÉTODOS | 116 |
| 3.5.1. Efecto de las bacterias endófitas en la biomasa y en la movilización de elementos minerales hacia <i>M. fraileana</i> | 116 |
| 3.5.1.1. Diseño experimental | 116 |
| 3.5.1.2. Preparación del sustrato..... | 118 |
| 3.5.1.3. Obtención de plántulas | 119 |
| 3.5.1.4. Trasplante y aclimatación de las plantas al invernadero..... | 120 |
| 3.5.1.5. Inoculación | 120 |
| 3.5.1.6. Determinación de producción de biomasa de plantas de <i>M. fraileana</i> | 121 |
| 3.5.1.6.1. Análisis estadístico | 121 |
| 3.5.1.7. Determinación de la proporción relativa de elementos minerales en plantas | 122 |
| 3.5.1.7.1. Análisis estadístico | 122 |
| 3.5.2. Localización de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de <i>M. fraileana</i> y su distribución dentro de las plantas | 123 |
| 3.5.2.1. Desinfección superficial de plantas para detección de bacterias endófitas reintroducidas .. | 123 |
| 3.5.2.2. Capacidad de colonización y establecimiento de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de <i>M. fraileana</i> | 124 |
| 3.5.2.2.1. Conteo de bacterias endófitas reintroducidas en plántulas de <i>M. fraileana</i> | 124 |
| 3.5.3. Preparación de plantas para localización de bacterias endófitas por microscopía electrónica de barrido | 125 |
| 3.5.4. Purificación de anticuerpos para inmunolocalización de bacterias endófitas..... | 127 |
| 3.5.5. Preparación histológica de plantas para inmunolocalización fluorescente de bacterias endófitas reintroducidas en <i>M. fraileana</i> | 127 |
| 3.5.5.1. Inmunotinción fluorescente de secciones de plantas con bacterias endófitas..... | 129 |
| 3.5.5.2. Inmunolocalización de bacterias por microscopía confocal y microscopía epifluorescente | 130 |
| 3.5.6. Efecto de la interacción bacterias endófitas en el crecimiento de plantas de <i>M. fraileana</i> | 131 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.6.1. Diseño del experimento | 131 |
| 3.5.6.2. Preparación del sustrato y diseño de cámaras de crecimiento. | 131 |
| 3.5.6.3. Obtención de plántulas | 132 |
| 3.5.6.4. Inoculación | 133 |
| 3.5.7. Efecto de bacterias endófitas en la actividad fotosintética de plantas <i>M. fraileana</i> | 134 |
| 3.5.7.1. Determinación de la acidez titulable en tejido fresco de plantas de <i>M. fraileana</i> | 134 |
| 3.5.7.2. Análisis estadístico | 135 |
| 3.5.8. Efecto de la interacción bacterias endófitas en la producción de nitrógeno | 135 |
| 3.5.8.1. Análisis estadístico | 135 |
| 3.6. RESULTADOS..... | 136 |
| 3.6.1. Movilización de minerales hacia <i>M. fraileana</i> como resultado de su asociación con bacterias endófitas | 136 |
| 3.6.1.1. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en perlita y regadas con solución nutritiva | 143 |
| 3.6.1.2. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en condiciones deficientes de nutrientes | 148 |
| 3.6.1.3. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en roca riodacita..... | 149 |
| 3.6.1.4. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en roca de brecha volcánica | 151 |
| 3.6.2. Patrones de movilización de elementos minerales en sustratos donde varía la abundancia de <i>M. fraileana</i> en su hábitat natural..... | 152 |
| 3.6.3. Efecto de la inoculación de bacterias endófitas de raíz de <i>M. fraileana</i> en la producción de biomasa de plantas crecidas en sustrato con roca | 153 |
| 3.6.4. Localización de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de <i>M. fraileana</i> | 155 |
| 3.6.5. Capacidad de colonización y establecimiento de las bacterias endófitas inoculadas en plántulas de <i>M. fraileana</i> | 156 |
| 3.6.6. Efecto de bacterias endófitas en el crecimiento de <i>M. fraileana</i> | 157 |
| 3.6.6.1. Efecto en la actividad fotosintética de <i>M. fraileana</i> | 157 |
| 3.6.6.2. Efecto en la producción de nitrógeno total en plantas | 158 |
| 3.7. DISCUSIÓN | 160 |
| 3.7.1. Colonización y establecimiento de bacterias endófitas reintroducidas en <i>M. fraileana</i> | 160 |
| 3.7.2. Efecto de las bacterias endófitas como potenciales promotoras del crecimiento vegetal..... | 161 |
| 3.7.2.1. Efecto en la producción de biomasa | 161 |
| 3.7.2.2. Efecto en la actividad fotosintética..... | 162 |
| 3.7.2.3. Efecto en el nitrógeno total en plantas..... | 163 |
| 3.7.3. Efecto de la inoculación con bacterias endófitas en la movilización de elementos de rocas para la intemperización de rocas. | 164 |
| 3.7.4. Participación de los exudados radicales en la intemperización de rocas para la formación de suelos..... | 166 |
| CONCLUSIONES FINALES..... | 167 |
| LITERATURA CITADA | 170 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Fisonomía del viejito <i>Mammillaria fraileana</i> | 7 |
| Fig. 2. Ubicación de los sitios de estudio. Izquierda macrolocalización del área de estudio. Derecha, ubicación de los sitios A, B y C sobre laderas de cerros adyacentes. | 8 |
| Fig. 3 Índice de Valor de Importancia (IVI). El IVI es el resultado de la suma de la dominancia relativa y la frecuencia relativa, el máximo valor posible para una especie es 200. | 17 |
| Fig. 4 (a) Fisonomía de las plantas creciendo sobre rocas en el sitio A (las flechas indican conglomerados de <i>M. fraileana</i>), (b) <i>M. fraileana</i> creciendo sobre roca andesítica, (c) Raíces expuestas de <i>M. fraileana</i> las cuales pueden ser observadas después de la remoción de fragmentos de roca..... | 18 |
| Fig. 5 Rocas volcánicas características en los sitios de estudio. Las flechas indican a los individuos de <i>M. fraileana</i> . (a) Sitio A, compuesto por rocas Providencia Riodacita. (b) Sitio B compuesto por rocas Providencia Riodacita. (c) Sitio C compuesto primordialmente de brecha andesítica. RD=Providencia Riodacita, VB=Brecha Volcánica. | 21 |
| Fig. 6 Análisis de Componentes Principales. (a) Ordenación de sitios de estudio. Los ovalos representan patrones de agrupamiento denominados 1 y 2, A1 a A10, B1 a B10, o C1 a C10 indican unidades de muestreo (•) en el Sitio A, B, o C, respectivamente. (b) Ordenación de elementos basada en sus pesos (loadings) en cada Componente Principal..... | 25 |
| Fig. 7 Concentración de elementos en los Sitios A, B y C con comparaciones para: (a) Sílice, (b) aluminio, (c) fierro, (d) manganeso, (e) calcio y (f) magnesio. Las columnas marcadas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$) (comparación Tukey). Se presenta la media \pm ES (N=30)..... | 27 |
| Fig. 8 Concentración de elementos en los Sitios A, B y C con comparaciones para (a) Sodio, (b) Potasio, (c) Fósforo, (d) Titanio, (e) Valor acumulativo para los macronutrientes K+P, (f) Valor acumulativo para fierro+manganeso+calcio+magnesio y (g) Valor acumulativo para elementos tóxicos: aluminio+zinc+cobre+niquel. Las columnas marcadas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p<0.05$, comparación Tukey, N=30) Las barras indican error estándar (ES). Ausencia de barras indica que ES insignificante..... | 28 |
| Fig. 9 Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de <i>Mammillaria fraileana</i> . (a) Curvas de supervivencia, (b) Prueba de comparación de medias Tukey para las curvas de supervivencia al final del experimento (semana cuatro). Valores de supervivencia en cada semana (Fig. 9a) señalados con diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía y prueba Tukey ($p<0.05$). Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía y comparación Tukey ($p<0.05$). Barras indican Error Estándar (ES)..... | 30 |
| Fig. 10. Tinción de bacterias endófitas viables teñidas por el método de tinción fluorescente con diacetato de fluoresceína (FDA)..... | 83 |
| Fig. 11. Micrografía de epifluorescencia para la detección de bacterias endófitas de semillas de <i>M. fraileana</i> . Las semillas fueron desinfectadas superficialmente y se les retiró la testa. El tejido interno se presionó hasta formar una delgada capa y posteriormente se sometió a hibridación fluorescente <i>in situ</i> FISH utilizando la sonda EUB338 para el dominio Bacteria y el fluorocromo CY3. a) Tejido vascular (las flechas indican los cuerpos de las bacterias y la organización del tejido vascular) de la semilla previo a la germinación, b) Tejido del interior de la semilla a los 8 días de imbibición. Escala de referencia: 5 μ m..... | 84 |
| Fig. 12. Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido del interior de la semilla de <i>M. fraileana</i> . Las semillas fueron desinfectadas superficialmente y se les retiró la testa. El tejido interno se presionó hasta formar una delgada capa. a) Observación en fresco de semilla sin testa presionada mecánicamente hasta formar una delgada capa de tejido. La semilla con testa mide aproximadamente 0.5 mm, b) y d) Tejido del interior de la semilla (sin testa) a los 8 días de imbibición de la semilla. Se señalan bacterias en forma bacilar expuestas sobre una membrana que cubre internamente a la semilla. Esta muestra fue procesada previamente por FISH, c) Tejido interno de la semilla a los 8 días de imbibición de la semilla. Obsérvese la forma bacilar de la bacteria. Esta muestra fue procesada previamente por FISH. 85 | 85 |

| | |
|---|-----|
| Fig. 13. Imagen de un gel de agarosa al 2% en el que se muestra la presencia del 16S rDNA bacteriano. Carril 1=Marcador GeneRuler 100 bp DNA, carriles 2, 3, 4=Amplificado del 16S rDNA bacteriano utilizando los primers 518 F, 1070, 5= Blanco (H ₂ O)..... | 86 |
| Fig. 14. Solubilización de CaPO ₄ in vitro por bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> . ANOVA (F= 30.77; p<0.0001) y comparación Tukey para CaPO ₄ (mg·L ⁻¹) de medio líquido Pikoskaya después de 30 días de incubación. Columnas denotadas con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0.05) en el fósforo solubilizado por cultivo. Las barras indican Error estándar (SE), la ausencia de barra indica SE insignificante. El número arriba de cada columna expresa la eficiencia de solubilización de fósforo por unidad formadora de colonia (UFC) (mg de P ₂ O ₅ ·UFC). El eje secundario del eje Y indica el Log de UFC (unidades formadoras de colonia) asociadas al valor de solubilización por morfotipo. El valor de UFC para el tratamiento sin bacteria aparece graficado con valor 0 indicando ausencia de bacterias. | 92 |
| Fig. 15. Curvas de variación del pH del medio líquido con roca pulverizada e inoculado con diferentes endófitas de <i>M. fraileana</i> . * Tratamientos control. | 94 |
| Fig. 16. Variación del pH del medio líquido con roca pulverizada e inoculado con diferentes endófitas de <i>M. fraileana</i> . Los valores son el resultado de la diferencia entre el valor inicial y el final ponderado respecto al tratamiento sin bacteria. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos * Tratamientos control..... | 95 |
| Fig. 17. Variación de las poblaciones de endófitas de <i>M. fraileana</i> incubadas en medio líquido con roca pulverizada durante 32 días. Los tratamientos control se encuentran marcados con asterisco. El tratamiento sin bacterias no mostró crecimiento en el medio..... | 96 |
| Fig 18. Reducción del tamaño de partículas de roca en suspensión por bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> . Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (p≤0.05) entre el número de partículas del tiempo inicial y el tiempo final comparados mediante la prueba t-Student. Los valores arriba de cada columna indican el porcentaje bruto de aumento en el número de partículas respecto al tratamiento sin bacterias, por lo tanto valores negativos indican porcentajes menores que el tratamiento no inoculado. Las barras representan el error estándar (SE). Ausencia de barra representa SE insignificante..... | 99 |
| Fig. 19. Distribución vertical de partículas de sustrato en las macetas y diseño de microcámaras de crecimiento..... | 119 |
| Fig. 20. Obtención de plántulas superficialmente estériles y su trasplante a cámaras de crecimiento axénicas. a) Plántulas de un mes de edad creciendo en agar nutritivo al 1%, b) Plántulas transplantadas a perlita a los 2.5 meses de edad. | 120 |
| Fig. 21. Cámaras de crecimiento utilizadas para determinar el efecto de la interacción bacterias endófitas-plantas en el crecimiento de <i>M. fraileana</i> . a) Cajas Petri de poliestireno (23cm×23cm×1cm) constituyeron microcámaras de crecimiento. b) Visualización de las plantas en el interior de las cajas Petri. | 133 |
| Fig. 22. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia las plantas <i>M. fraileana</i> crecidas en perlita enriquecida con solución nutritiva Hoagland al 10%. ANOVA de una vía (p<0.05) y comparación de Tukey (α=0.05) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo..... | 139 |
| Fig. 23. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia las plantas de <i>M. fraileana</i> crecidas en riocacita + perlita. ANOVA de una vía (p<0.05) y comparación de Tukey (α=0.05) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. | 140 |
| Fig. 24. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia plantas de <i>M. fraileana</i> crecidas en brecha volcánica + perlita. ANOVA de una vía (p<0.05) y comparación de Tukey (α=0.05) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo..... | 141 |
| Fig. 25. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia plantas de <i>M. fraileana</i> crecidas en perlita. ANOVA de una vía (p<0.05) y comparación de Tukey (α=0.05) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. | 142 |

| | |
|--|-----|
| Fig. 26. Movilización de Al, K, Si y Mg hacia las plantas por efecto de la interacción de la endófito <i>Pseudomonas putida</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación de Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22..... | 144 |
| Fig. 27. Movilización de P hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Pseudomonas putida</i> o <i>Bacillus megaterium</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22..... | 145 |
| Fig. 28. Movilización de Cu hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Enterobacter sakazakii</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22..... | 145 |
| Fig. 29. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Bacillus megaterium</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación de Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22. | 146 |
| Fig. 30. Movilización de Ca hacia las plantas por efecto de la interacción de las bacterias <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i> ES4 y <i>Enterobacter sakazakii</i> con <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22. | 147 |
| Fig. 31. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Bacillus megaterium</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23. | 148 |
| Fig. 32. Movilización de Al, Cu, Na y Ca hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Bacillus megaterium</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre inoculantes. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23..... | 150 |
| Fig. 33. Movilización de Si hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Azotobacter vinelandii</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23..... | 151 |
| Fig. 34. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófito <i>Enterobacter sakazakii</i> y <i>M. fraileana</i> bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 24..... | 152 |
| Fig. 35. Efecto de la producción de biomasa de plantas de <i>M. fraileana</i> inoculadas con bacterias endófitas y crecidas en cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo..... | 154 |
| Fig. 36. Ejemplo de colonización endofítica de <i>Pseudomonas putida</i> en plantas de <i>M. fraileana</i> después de 3.5 meses de la inoculación. El patrón de distribución mostró una mayor densidad bacteriana en la base del tallo y raíz, a nivel intracelular en epidermis y primeras capas del clorénquima (tallo). a) Micrografía epifluorescente, b) y d) Micrografías obtenidas por Microscopía Confocal Fluorescente, c) Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido. El resto de las cepas inoculadas mostraron un patrón de distribución semejante..... | 155 |

- Fig. 37. Capacidad de colonización y establecimiento de bacterias endófitas después de 3.5 meses de inoculación en plantas de *M. fraileana* crecida en sustratos de roca. Los tratamientos control se indica con signo + para las cepas control positivo PGPB y con signo – para el control negativo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA a $p < 0.001$, Tukey a $\alpha = 0.05$). 156
- Fig. 38. Incremento de acidez nocturna (acidez nocturna menos acidez diurna) por efecto de la interacción bacterias endófitas y plantas de *M. fraileana* crecidas en roca riodacita. Los tratamientos control se indica con signo + para la cepa control positivo PGPB y con signo – para los controles negativos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía a $p = 0.0008$ y Tukey a $\alpha = 0.05$). 158
- Fig. 39. Nitrógeno total (%) por efecto de la interacción bacterias endófitas y plantas de *M. fraileana* crecidas en roca riodacita. Los tratamientos control se indica con signo + para la cepa control positivo PGPB y con signo – para los controles negativos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.04$, Tukey a $\alpha = 0.05$). 159

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1 Prueba no paramétrica de Dunn para comparaciones múltiples respecto al volumen de <i>M. fraileana</i> en tres sitios de estudio ($p \leq 0.05$)..... | 19 |
| Tabla 2 Composición mineral de las rocas en los tres sitios de estudio..... | 21 |
| Tabla 3 Concentración elemental de las rocas en los tres sitios de estudio, basado en análisis de Fluorescencia de Rayos X..... | 22 |
| Tabla 4 Coeficientes de correlación entre la abundancia de <i>M. fraileana</i> y la concentración de elementos en las rocas de tres sitios de estudio. Negritas indican correlaciones altamente significativas ($p < 0.001$)... | 29 |
| Tabla 5 Ejemplos de bacterias endófitas y las especies vegetales que las albergan..... | 47 |
| Tabla 6 Niveles de abundancia de las poblaciones de bacterias endófitas aisladas del cilindro vascular de raíz de <i>M. fraileana</i> | 87 |
| Tabla 7 Caracterización de algunas bacterias endófitas aisladas de raíz de <i>M. fraileana</i> | 88 |
| Tabla 8 Identidad taxonómica de las bacterias endófitas de <i>M. fraileana</i> aisladas de raíz..... | 89 |
| Tabla 9 Capacidad de fijación de nitrógeno de las bacterias endófitas de raíz medida por la reducción de acetileno <i>in vitro</i> | 91 |
| Tabla 10 Diseño experimental para evaluar el efecto bacterias endófitas-planta en la movilización de elementos minerales..... | 117 |
| Tabla 11 Concentración de los anticuerpos purificados..... | 127 |
| Tabla 12 Elementos minerales movilizados hacia plantas de <i>M. fraileana</i> por la interacción de bacterias endófitas-plantas..... | 138 |
| Tabla 13 Movilización de elementos minerales desde los sustratos de cultivo provenientes del ambiente natural hacia <i>M. fraileana</i> en condiciones de cultivo..... | 153 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

Entre las relaciones asociativas de plantas y microorganismos el endofitismo representa una interacción sinergista con beneficio para ambos organismos. Las bacterias endófitas se presentan de manera natural en el interior de diversos órganos vegetales sin ocasionar daños aparentes y por el contrario produciendo efectos benéficos en las plantas (*i. e.* promoción del crecimiento vegetal).

En la actualidad se presume la presencia ubicua de las bacterias endófitas y se van encontrando evidencias de la participación de estos microorganismos en procesos que se creía eran llevados a cabo exclusivamente por las plantas. Las aplicaciones de las bacterias endófitas van desde la búsqueda de inoculantes para la agricultura, la solución de problemas ambientales como la recuperación de suelos contaminados, hasta la producción de compuestos bioactivos con gran potencial en la medicina humana.

En plantas cultivadas se conoce con relativa profundidad el papel de las bacterias endófitas en el crecimiento vegetal y en la protección contra fitopatógenos. Sin embargo, se ha explorado poco el conocimiento de las bacterias endófitas de plantas silvestres y más aún de las especies que se establecen en ambientes difíciles como son las zonas áridas. En el CIBNOR, estudios pioneros acerca de bacterias del rizoplano y ciertas endófitas de plantas desérticas han mostrado su capacidad para disolver minerales y para incrementar el crecimiento de la planta. De esta manera se ha comenzado a elucidar, desde el punto de vista microbiológico, el papel de las bacterias endófitas en el establecimiento de algunas plantas en el desierto Sonorense.

El presente estudio utilizó como modelo a una población de la cactácea cespitosa *Mammillaria fraileana* (Britt. & Rose) Boedeker, endémica del estado de Baja California sur, México, con el objetivo de evaluar algunos mecanismos que permiten su establecimiento en sustrato rocoso.

En el primer capítulo se determina la importancia de *M. fraileana* como colonizadora de rocas y se exploran algunos aspectos ambientales relacionados con variaciones en la abundancia local de la especie.

A través del segundo capítulo se comprueba la presencia natural de bacterias endófitas en *M. fraileana* y se obtienen algunas de sus bacterias endófitas de raíz con potencial para promover crecimiento vegetal y/o degradador rocas *in vitro*.

En el tercer capítulo se evalúa el efecto de la interacción de algunas bacterias endófitas de *M. fraileana* en la movilización de elementos minerales para la intemperización de rocas y el efecto de las bacterias endófitas en el crecimiento vegetal. Los resultados se complementan con evidencias de la colonización endofíticas obtenidas mediante técnicas de microscopía.

La meta de este trabajo es obtener evidencias de la contribución de las endófitas en el éxito de *M. fraileana* como colonizadora de rocas y en la intemperización de rocas para la eventual formación de suelos en ambientes áridos.

CAPÍTULO I

Plantas colonizadoras de rocas: Abundancia de *Mammillaria fraileana*

(Britt. & Rose) Boed. [CACTACEAE] en relación con el tipo y

composición de las rocas en el sur del Desierto Sonorense

1.1. ANTECEDENTES

Los ambientes rocosos constituyen un ambiente ideal para el estudio de fenómenos ecológicos como la colonización (Ryti 1984), sucesión vegetal (Martínez 1999) y el intemperismo de rocas (Adams *et al.* 1992; Puente *et al.* 2004a). El proceso de colonización de rocas, ya sea primario (en sitios sin vegetación preexistente) o secundario (en sitios previamente cubiertos con vegetación) participa en el intemperismo de rocas por medio del establecimiento y persistencia de especies (Glenn-Lewin *et al.* 1992). A través de procesos físicos y bioquímicos el intemperismo de rocas conduce eventualmente a la formación de suelos (Barber 1995). Como producto del metabolismo de bacterias, cianobacterias, hongos, líquenes y plantas superiores se liberan ácidos orgánicos y compuestos quelantes que selectivamente o en su totalidad disuelven las rocas y permite a tales organismos extraer compuestos minerales para su beneficio (Belnap y Lange 2003, Hinsinger 1998; Schulze *et al.* 2005). En el caso de las plantas, el aumento en la tasa de formación de suelo se ha relacionado con cambios en el ambiente fisicoquímico de la rizosfera tales como aumento de la porosidad del sustrato (Gibbs y Reid 1988) y primordialmente con el aumento en la acidez de la rizosfera. Este último es el resultado de la liberación de

exudados y protones que modifican la concentración y disponibilidad de elementos aprovechables por plantas y microorganismos (Akter y Akagi 2005; Carrillo *et al.* 2002; Hinsinger 1998; Jones 1998).

Las plantas saxícolas, denominadas así por crecer en rocas, ocurren en ecosistemas, templados (Franklin y Dyrness 1973), semiáridos (Zwieniecki y Newton 1995) y desérticos (Bashan *et al.* 2002). En general, los ambientes rocosos limitan el establecimiento vegetal porque usualmente se encuentran expuestos a pendientes pronunciadas, con escasa o nula formación de suelo que se asocia a su vez con baja disponibilidad de agua y nutrientes (Martinez 1999; Nobel y Zutta 2007). La colonización de rocas en ambientes extremos como el Desierto Sonorense, constituye un reto adicional para el establecimiento vegetal debido a que se adiciona el efecto estresante de las altas temperaturas. No obstante, existen especies vegetales, entre las que destacan algunas cactáceas y suculentas que ocurren de manera común en sustratos rocosos de zonas áridas (Anderson 2001; Chadwick y Steinmetz 2006; Nobel y Loik 1999; Nobel y Zutta 2007; Turner *et al.* 1995).

Las plantas colonizadoras de rocas se establecen en roca prácticamente desnuda, es decir, sin el beneficio del soporte y nutrientes que un suelo desarrollado ofrece normalmente (Bashan *et al.* 2002 2006). Se ha propuesto que la clave del buen desempeño de algunas plantas en ambientes desérticos se debe a la asociación que existe entre microorganismos y plantas (Bashan *et al.* 2007; Puente *et al.* 2004 a, b).

El presente estudio utilizó como modelo a una población de la cactácea cespitosa *Mammillaria fraileana* (Britt. y Rose) Boedeker, endémica del estado de Baja California sur, México, con el objetivo de evaluar algunos mecanismos que permiten su

establecimiento en sustrato rocoso. Para esta evaluación se realizó trabajo de campo, análisis mineralógicos y químicos, un estudio de supervivencia de plantas.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Resulta sorprendente el establecimiento de las plantas en rocas de ambientes áridos, sin embargo, poco se conoce de los factores que determinan la ocurrencia y abundancia de las plantas en estos habitats. El discernimiento de los factores asociados al establecimiento de plantas en rocas permitirá conocer y valorar la complejidad de adaptaciones de plantas saxícolas en zonas áridas.

Este es el primer estudio específicamente dirigido al entendimiento de los patrones de abundancia de *Mammillaria fraileana* y su relación con factores ambientales relacionados con la composición del sustrato.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Determinar la importancia de *M. fraileana* como colonizadora de rocas y los factores fisicoquímicos relacionados con variaciones espaciales en la abundancia de la especie.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la importancia de *M. fraileana* respecto a otras especies que crecen sobre rocas.

- Evaluar variaciones espaciales en la abundancia de la especie y su relación con características fisicoquímicas de las rocas.

1.4. HIPÓTESIS

La población de *M. fraileana* en el sitio de estudio es la más frecuente y abundante como colonizadora de rocas. Las posibles variaciones en la abundancia de *M. fraileana* pueden explicarse por la proporción de minerales y por la composición química de las rocas, específicamente por la abundancia de elementos que sirven como nutrientes para las plantas.

1.5. MÉTODOS

1.5.1. Rasgos botánicos del viejito *M. fraileana* (Britt. & Rose) Boed.

La cactácea *M. fraileana* es una de las 28 especies de “viejos” que se distribuyen en la Península de Baja California, constituyendo un endemismo peninsular. Habita en sustratos rocosos sobre islas, a lo largo de la costa Este de la Península desde Isla Catalina hasta las cercanías de La Paz. Se caracteriza por presentar tubérculos con savia no lechosa y semillas negras; los tubérculos poseen de 10 a 20 espinas radiales, algunas pubescencias o tricomas (menos de 10) en las axilas de los tubérculos; posee dos o más espinas centrales, las espinas radiales están fuertemente entrelazadas de manera que opacan los tubérculos. Los segmentos internos del perianto son lanceolados a lanceo-ovada de color rosáceo, filamentos rosáceos; lóbulos del estigma rojos o naranja, frutos marcadamente clavados,

rosáceos, segmentos externos del perianto café-púrpura, los márgenes pálidos (Anderson 2001; Wiggins 1980). Su hábito de crecimiento es cespitoso con longitud promedio de tallos de 15 cm y 3 cm de ancho, semillas de aprox. 0.5 mm (Fig. 1). Se conocen dos periodos de floración, uno en invierno-primavera y el otro en verano, manteniendo brotes florales todo el año, la floración se presenta formando una corona en la zona apical del tallo. Es probable la ocurrencia de floración cuando se presentan precipitaciones pluviales excepcionales.

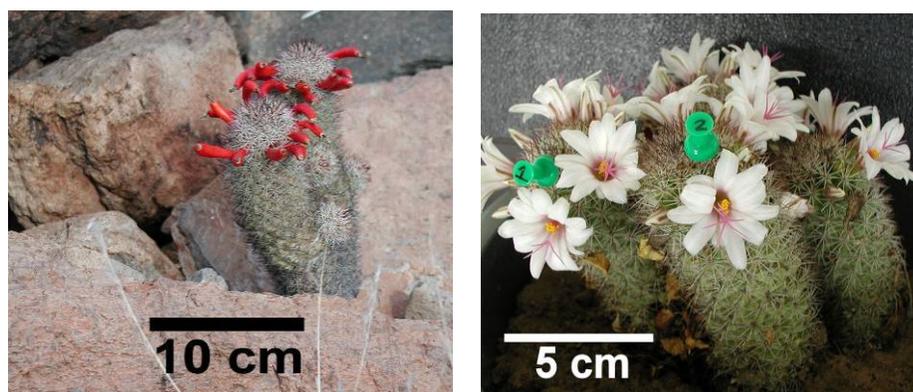


Fig. 1. Fisonomía del viejito *Mammillaria fraileana*.

1.5.2. Área de estudio

Se localiza en las coordenadas 24°11'15"N, 110°17'50"W, a dos kilómetros al norte de la ciudad de la Paz, Baja California Sur, México (Fig. 2). El clima predominante es cálido-seco. El promedio de la precipitación pluvial es de 180 mm oscilando desde 35 mm hasta 424 mm. Las lluvias se asocian generalmente con huracanes y tormentas tropicales provenientes del Pacífico-Este. En invierno, las lluvias son probables pero poco comunes y

normalmente aportan el 10% de la precipitación anual. De acuerdo con información de la estación meteorológica del CIBNOR, en un periodo de retorno de 16 años la temperatura promedio mensual varía desde 14.8°C en la temporada fría, mientras que las temperaturas más cálidas se presentan de agosto a octubre con temperaturas máximas que promedian 32.4°C y temperaturas extremas de 38–42°C durante algunas horas del día. La insolación durante el periodo más cálido alcanza niveles de 2300 a 2500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

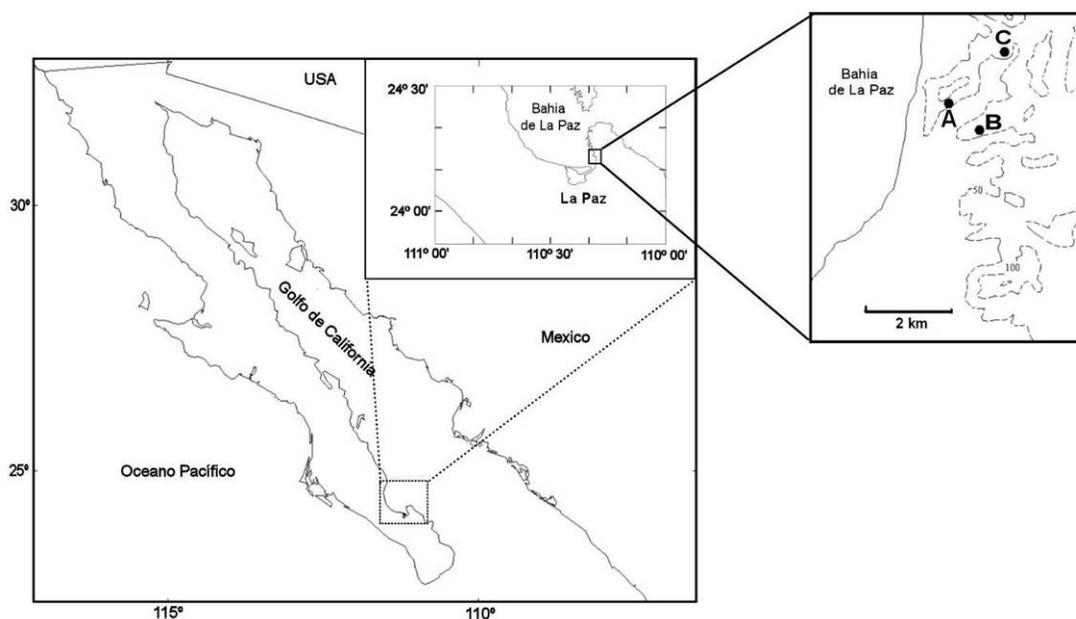


Fig. 2. Ubicación de los sitios de estudio. Izquierda macrolocalización del área de estudio. Derecha, ubicación de los sitios A, B y C sobre laderas de cerros adyacentes.

1.5.3. Aspectos geológicos y litológicos

En la zona domina un relieve producido por la actividad volcánica y la erosión pluvial (Aranda-Gómez y Pérez-Venzor 1987). La Sierra tiene las cimas planas en donde afloran derrames de “Riodacita Providencia”, un material altamente resistente a la erosión

que se identifica fácilmente en campo por su color café oscuro, de apariencia afanítica, merocristalina, microporfirídica, con foliación notable debida al flujo acentuado por desvitrificación (Hausback 1983). La Riodacita Providencia es la roca volcánica más reciente en el área pues se estima que tiene una edad de 19 ma. (Hausback 1984). Otra roca afín es la riolita (Hirales com. pers.). También se presentan brechas volcánicas que contienen rocas ígneas extrusivas de composición predominantemente basáltica y por cantidades subordinadas de clastos andesíticos y fragmentos de color rojizo oscuro que contiene cristales abundantes en plagioclasa y piroxenos a las que se les considera como basaltos fuertemente oxidados (Aranda-Gómez y Pérez-Venzor 1987).

1.5.4. Vegetación

La vegetación del área de estudio está constituida por un matorral sarcocaulé dominado por especies arbustivas como matacora *Jatropha cuneata* Wigg. & Rollis, palo Adán *Fouquieria burragei* Rose (J.L. Leon de la Luz obs. pers.), torote *Bursera microphylla* A. Gray, copal *Bursera epinnata* (Rose) Engler, mezcal *Agave sobria* Brandegee, sambo *Aeschynome vigil* Brandegee y la cactácea columnar *Pachycereus pringlei* (S. Wats.) Britt. & Rose. El estrato inferior está conformado principalmente por dos cactáceas, el viejito *Mammillaria fraileana* (Britt. & Rose) Boedeker y *Echinocereus brandegeii* (J.M. Coulter) K. Schumann. Entre las herbáceas, únicamente la golondrina *Euphorbia leucophylla* Benth es relativamente común.

1.5.5. Sitios de estudio

Se analizaron tres sitios ubicados en cerros adyacentes que conforman la primera cadena montañosa sobre la costa. Los sitios de estudio fueron seleccionados por presentar diferencias aparentes en el tipo de rocas, en la abundancia de las plantas creciendo sobre rocas y porque la vegetación no parece perturbada.

El muestreo se realizó únicamente sobre las caras sur de los cerros para evitar influencia costera por aspersion salina, dirección del viento y/o gradiente de humedad en dirección Este-Oeste. El área de muestreo en cada sitio fue de 1000 m² aproximadamente y se ubicó en el intervalo de 50 a 100 msnm. En los sitios denominados A y B, la unidad de muestreo consistió en una roca individual mientras que en el sitio C se muestrearon superficies de roca sedimentaria masiva (con bloques angulares o sub-angulares de diámetro mayor a 2 mm). Cada sitio de estudio consistió en 10 unidades de muestreo las cuales oscilaron entre 0.1 a 19 m².

1.5.6. Mediciones de abundancia

Para medir la abundancia de las especies vegetales presentes en cada unidad de muestreo (roca) se obtuvo la frecuencia, la ocurrencia y el volumen de cada especie. En cada unidad de muestreo se registraron las especies vegetales, su altura, número de tallos y su diámetro. Debido a que la gran mayoría de especies no presentaron hojas en el momento del muestreo se consideró como parámetro de abundancia al volumen de las especies, el cual es una medida compuesta de abundancia que resulta del producto de la cobertura vegetal y la altura de cada individuo. Este atributo se considera un indicador adecuado del crecimiento y capacidad de sobrevivencia de plantas en el medio silvestre, en particular es

útil para formas de crecimiento como las cactáceas las cuales que no expresan el componente foliar típico de otras especies (Gibson y Nobel 1986; Bashan *et al.* 1999). En el caso de plantas herbáceas o leñosas el volumen refiere a los tallos y ramas sin hojas; en el caso de cactáceas se refiere al volumen de tallos y ramas mientras que para agaves se refiere al volumen de las pencas. El volumen de tallos de cactáceas fue estimado a partir de la fórmula para el cálculo de volumen de un cilindro mientras que para hojas arrosetadas en el caso de agaves se utilizó la fórmula de volumen para cuerpos piramidales.

1.5.7. Identificación de los tipos de rocas

Se obtuvieron muestras compuestas de cada roca, algunos fragmentos fueron tomados de la vecindad de las plantas pero sin suelo. Muestras de roca representativas de cada sitio fueron identificadas en el Departamento de Geología de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B.C.S., México.

1.5.8. Análisis mineralógico

La composición relativa de los minerales en las muestras de roca fue analizada mediante el método de secciones delgadas de Murphy (1986). Esta técnica, usualmente aplicada en suelos y sedimentos, fue adaptada para fragmentos de roca del tamaño de gravas. Los análisis fueron llevados a cabo en el Laboratorio Geoanalítico de La Universidad del estado de Washington, Pullman, WA. Los fragmentos de roca se unieron utilizando como adherente una mezcla de resina epoxi (Epon 815C, Hexion Specialty Chemicals, Columbus, OH) y diez partes de trietilentetramina (Sigma-Aldrich, #13,209-8). Los fragmentos de roca adheridos se montaron en un portamuestras de aluminio de 5 cm de

diámetro y se dejaron secar por dos días a temperatura ambiente. La cara aplanada de la muestra solidificada fue pulida con arena de sílice de diferente diámetro, iniciando con tamaño de grano de 90, 78, 21 hasta 9 μm para pulido fino. Se cortaron secciones de aproximadamente 100 μm las cuales fueron pulidas repetidas veces hasta lograr superficies muy lisas utilizando arena de 4 μm de diámetro de partícula. Las secciones ya pulidas fueron analizadas bajo microscopio petrográfico (Nikon, Japan) para determinar la proporción relativa de los minerales presentes en diferentes puntos de cada sección.

1.5.9. Composición de elementos en las rocas

Para determinar la composición de rocas se utilizaron muestras de roca pulverizada. El pulverizado de rocas se llevó a cabo en el Instituto de Geología de la UNAM, Hermosillo, Son. Se procesaron 250 g de muestra por roca utilizando una trituradora Braun Chipmunk de 4 placas, Pulverizador Bico tipo UA de discos verticales y molino Herzog con contenedor de porcelana. Los equipos después de cada muestra fueron desarmados y limpiados usando cuarzo, agua, jabón, acetona y aire comprimido. La muestra se trituró menor a un cuarto de pulgada, se dividió la muestra en tres partes, una parte se usó para contaminar el equipo, otra se pulverizó y la otra se almacenó, las muestras pulverizadas alcanzaron un diámetro de partícula de 74 μm o malla 200.

Las muestras de roca fueron analizadas en el Laboratorio de Geoanalítica de la Universidad del estado de Washington. Se determinaron elementos mayores y elementos traza mediante Fluorescencia de Rayos-X (XRF) siguiendo el método de fusión propuesto por Johnson et al (1999). Brevemente, el método consiste en la dilución de la muestra agregando $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$, fusión de la muestra a 1000°C , triturado y nuevamente fusión para

finalmente analizar las muestras por Fluorescencia de Rayos X. Se utilizó un espectrómetro de fluorescencia de Rayos-X (XRF; ThermoARL Advant'XP+ sequential X-ray, Thermo Fisher Scientific, Lausanne, Switzerland) provisto con estándares del Servicio de Geología USGS de Estados Unidos. La concentración elemental se expresa como porcentaje en peso, libre de volátiles, con el Hierro expresado como FeO.

1.5.10. Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de *M. fraileana*

Debido a que el sodio fue abundante en todos los sitios de estudio y a que éste es referido como tóxico para las plantas, se evaluó el efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas. Se probaron concentraciones de sodio semejantes a las que se reportaron para los sitios de estudio. Grupos de 100 semillas fueron enjuagadas con agua desionizada y posteriormente colocadas en vasos de plástico (5 cm de diámetro×3 cm de altura) conteniendo 6 g de perlita (Supreme Perlite, Portland, OR) y 4 g de arena de cuarzo grado analítico con tamaño de partícula de 0.2 mm de diámetro. El sustrato fue mantenido a humedad constante agregando 9 ml de agua desionizada hasta que se alcanzó 80% de germinación (aproximadamente a los 5 días). Se probaron cuatro niveles de salinidad por sodio (NaCl grado analítico), 0, 1.5%, 2.5%, 3% peso/volumen. Cada tratamiento tuvo cuatro réplicas y cada réplica consistió de 50 plántulas. Plántulas de 20 días fueron regadas con 10 ml del tratamiento de salinidad correspondiente y después regadas diariamente con 4 ml de agua desionizada para mantener un nivel de humedad constante. El experimento fue mantenido en incubadora (modelo 815, Precision Scientific, Chicago, IL) bajo condiciones de crecimiento establecidas en experimentos previos, $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $31\pm 2\ \mu\text{mol}$

foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con periodos de luz de 8 h dia^{-1} . Se registró la supervivencia de plántulas cada semana durante un mes.

1.5.11. Análisis estadístico

1) Importancia de las plantas colonizadoras de rocas

La importancia de las plantas como colonizadoras de rocas fue evaluada a través del Índice de valor de importancia (IVI). El IVI expresa la contribución de las especies dentro una comunidad (Barbour *et al.* 1999), en este caso se refiere a la comunidad vegetal creciendo sobre rocas. El IVI se calcula como la suma de los valores relativos de densidad, frecuencia y dominancia, aunque es ampliamente aceptado su cálculo a partir de dos de los componentes mencionados (Mueller-Dumbois y Ellenberg 1974). En este estudio se calculó el IVI como la suma del volumen relativo (como un parámetro de la dominancia relativa) y la frecuencia relativa, de manera que el máximo valor probable es de 200. La frecuencia relativa expresa el porcentaje de aparición de una especie respecto al total de especies (Barbour *et al.* 1999). La densidad no se consideró en el cálculo del IVI debido a la dificultad para diferenciar plantas individuales dentro de los conglomerados que forman típicamente las plantas con crecimiento cespitoso. Para mejor comprensión de los resultados de volumen se estimó la densidad de plantas por metro cuadrado y por sitio.

2) Variación espacial de la abundancia

Las diferencias entre sitios fueron analizadas con la prueba por rangos de Kruskal-Wallis debido a que el volumen de *M. fraileana* no mostró distribución normal. Las

comparaciones entre sitios fueron realizadas mediante la prueba de Dunn la cual compara la suma de rangos de dos grupos contra la diferencia promedio esperada (Zar 1999).

3) Variación espacial de la composición química de rocas en los sitios de estudio

Para explorar la variación de los elementos en los sitios de estudio se aplicó Análisis de Componentes Principales (ACP) a la matriz de correlación de los datos de concentración de elementos determinados por Fluorescencia de Rayos-X. La matriz de datos fue estandarizada y centrada con el fin de reducir variaciones extremas de los datos. Los ACP fueron realizados con el paquete estadístico Multivariate Statistical Package (MVSP 3.1, Kovach 1998). Del ACP, los elementos a los cuales se asociaron diferencias entre sitios fueron sometidos a análisis de varianza de una vía ANOVA y comparaciones Tukey ($p < 0.05$). Los análisis de varianza y pruebas de comparación de medias fueron realizadas con el programa JMP v. 5.1.2 (SAS Institute 1989).

4) Correlación de la abundancia de planta y la composición química del sustrato

Los elementos que contribuyeron a explicar diferencias significativas entre sitios fueron analizados para determinar correlaciones entre la concentración de elementos y la abundancia de las plantas expresada mediante el volumen. La matriz de correlación fue construida con los datos estandarizados de concentración de elementos y \ln del volumen.

5) Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de *M. fraileana*

La supervivencia de las plantas se calcula como la proporción de individuos vivos en un tiempo t respecto al total inicial (Barbour *et al.* 1999). La supervivencia se calculó para intervalos de tiempo de una semana. Los valores de supervivencia para cada

tratamiento de salinidad fueron analizados por ANOVA de una vía y la comparación Tukey utilizando el programa JMP v. 5.1.2 (SAS Institute 1989).

1.6. RESULTADOS

1.6.1. Importancia relativa de las plantas colonizadoras de rocas

La riqueza de plantas saxícolas fue relativamente baja. De las ocho especies registradas cinco fueron suculentas, entre éstas un *Agave* sp. y cuatro cactáceas *Mammillaria fraileana*, *M. brandegeei*, *Echinocereus brandegeei*, *Pachyereus pringlei*. De las especies restantes únicamente *Fouquieria burragei* es del tipo arbustivo-leñoso y solo dos fueron herbáceas, *Euphorbia leucophylla* y *Comelina* sp. La importancia relativa de las especies, medida por el índice de valor de importancia IVI (Fig. 3), se calculó como la suma del volumen relativo y la frecuencia relativa, por lo tanto el valor máximo de este índice puede ser de 200, indicando comunidades altamente dominadas.

En la comunidad saxícola de estudio, el IVI de *M. fraileana* fue de 159.70, la segunda especie en orden de importancia fue otra cactácea, *E.brandegeei* con IVI=17.46, sin embargo esta especie fue registrada únicamente en el sitio A. Aunque todas las especies registradas en el muestreo de rocas ocurren frecuentemente en la vegetación circundante su presencia sobre rocas no fue igualmente abundante. Aproximadamente el 63% del total de especies se registraron una sola vez (*F.burragei* IVI=2.64, *Agave* sp. IVI=2.57, y *P. pringlei* IVI=2.48), mientras que *M. fraileana* fue la única que se observó en el 100% de las rocas muestreadas, por tanto la comunidad se considera ampliamente dominada por esta

última especie (Fig. 4). La población de *M. fraileana* aparenta un estado saludable, las tallas de los individuos observados van desde plántulas de 5 mm de altura hasta adultos que alcanzan tallas de 15 cm y 5 cm de diámetro del tallo. Las plantas crecen normalmente sobre hendiduras o fisuras en donde el sistema radicular penetra profundamente (Fig. 3c). Las plántulas de tamaño menor a 5 mm de altura fueron observadas más frecuentemente en fisuras profundas, formando microambientes en donde disminuye ampliamente la radiación solar directa y/o reflejada.

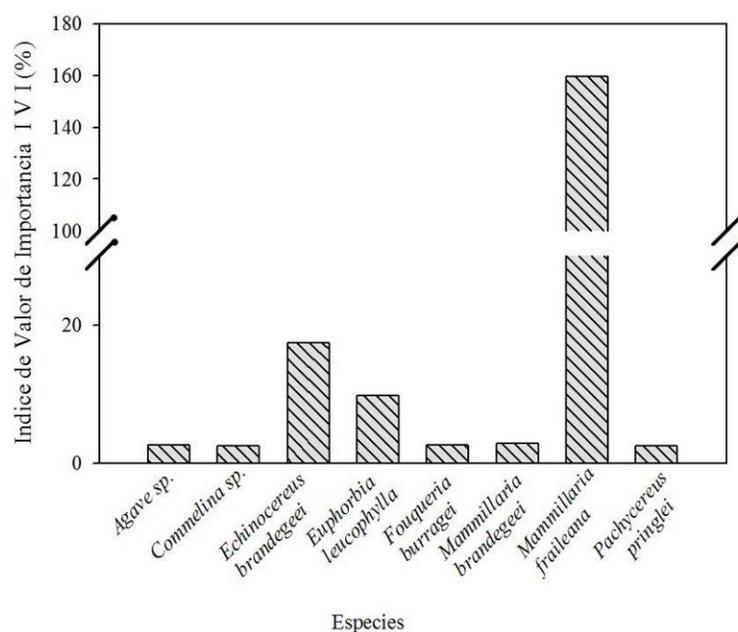


Fig. 3 Índice de Valor de Importancia (IVI). El IVI es el resultado de la suma de la dominancia relativa y la frecuencia relativa, el máximo valor posible para una especie es 200.



Fig. 4 (a) Fisonomía de de *M. fraileana* creciendo cespitosamente sobre rocas del sitio A, (b) Raíces expuestas que pueden ser observadas después de la remoción de fragmentos de roca, (c) *M. fraileana* creciendo sobre roca andesítica.

1.6.2. Variaciones espaciales en la abundancia de *M. fraileana*

Se observaron variaciones respecto al volumen de *M. fraileana* entre los sitios de estudio. El máximo valor ocurrió en el Sitio B ($744.3 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$) y el mínimo ($5.6 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$) en el Sitio C. Aunque los datos de volumen no se ajustaron a una distribución normal, para un mejor entendimiento se calculó el valor promedio del volumen y su correspondiente valor de densidad. En orden ascendente, el sitio C tuvo $19.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$ ($\sim 0.38 \text{ plantas} \cdot \text{m}^{-2}$), el Sitio A tuvo $110.7 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$ ($\sim 4.17 \text{ plantas} \cdot \text{m}^{-2}$), y el Sitio B tuvo $350.3 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2}$ ($\sim 9.91 \text{ plantas} \cdot \text{m}^{-2}$). La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el volumen de *M. fraileana* entre los sitios de estudio ($H=18.56$, $p \leq 0.0001$). La prueba de Dunn mostró diferencias significativas entre los sitios A y C ($Q=2.936$; $p \leq 0.05$) y entre los sitios C y B ($Q=4.165$; $p \leq 0.05$) pero no así entre los sitios A y B ($Q=1.397$; $p \leq 0.05$). Por lo tanto, el grupo Sitios A-B se caracterizó por tener los más altos valores de volumen respecto al Sitio C que presentó el menor valor de volumen de plantas por metro cuadrado (Tabla 1).

Tabla 1 Prueba no paramétrica de Dunn para comparaciones múltiples respecto al volumen de *M. fraileana* en tres sitios de estudio ($p \leq 0.05$).

| Comparaciones entre sitios | Diferencia entre rangos | Error Estándar | Q | $Q_{0.05, 3}$ | Conclusión relativa a la hipótesis ¹ |
|----------------------------|-------------------------|----------------|-------|---------------|---|
| B vs A | 5.45 | 3.902 | 1.397 | 2.394 | Se acepta la hipótesis |
| B vs C | 16.25 | 3.902 | 4.165 | 2.394 | Se rechaza la hipótesis |
| C vs A | 10.8 | 3.679 | 2.936 | 2.394 | Se rechaza la hipótesis |
| Agrupamiento de sitios | | | | | |
| A | a | | | | |
| B | a | | | | |
| C | b | | | | |

$Q_{0.05, 3}$ = Hipótesis de una cola, 3 grados de libertad. ¹Hipótesis nula: El volumen de *M. fraileana* es el mismo entre los sitios comparados.

1.6.3. Litología y mineralogía

Las rocas de los tres sitios corresponden con la descripción para la Formación Comondú realizada por Hausback (1984). Los sitios A y B (Fig. 5a, b) fueron rocas volcánicas o flujos de lava laminados que se denominan riolacita Providencia, los cuales varían en composición desde riolacitas a riolitas y andesitas, son de color gris y presentan fisuras horizontales y fracturas verticales. El sitio C se compuso básicamente de brechas riolíticas cuya composición es masiva, con mucho menor densidad de fisuras y fracturas (Fig. 5c). Según las observaciones de campo, las numerosas hendiduras en las rocas de los sitios A y B proveen de anclaje a las raíces, las cuales crecen en íntima asociación a las superficies de las paredes de fisuras o penetrando profundamente las fracturas de la brecha volcánica del Sitio C. Sin embargo, no se tomaron datos de densidad de fracturas en las rocas.

A nivel microscópico, la proporción de plagioclasa, piroxeno y vidrio volcánico fue determinada para los tres sitios de estudio. Se observó una marcada diferencia (aunque no demostradas estadísticamente) entre la proporción de minerales de los sitios A y B respecto al Sitio C. En los Sitios A y B fue más baja la proporción de plagioclasa (fórmula general $(\text{Na}, \text{Ca})[\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_8]$) y piroxeno (fórmula general $(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Fe}, \text{Al}, \text{Na})_2[\text{Al}, \text{Si}]_2\text{O}_6$) pero más alta la proporción de vidrio volcánico (composición amorfa). Inversamente, el Sitio C tuvo menor proporción de vidrio volcánico y el porcentaje más alto de plagioclasa y piroxeno (Tabla 2).

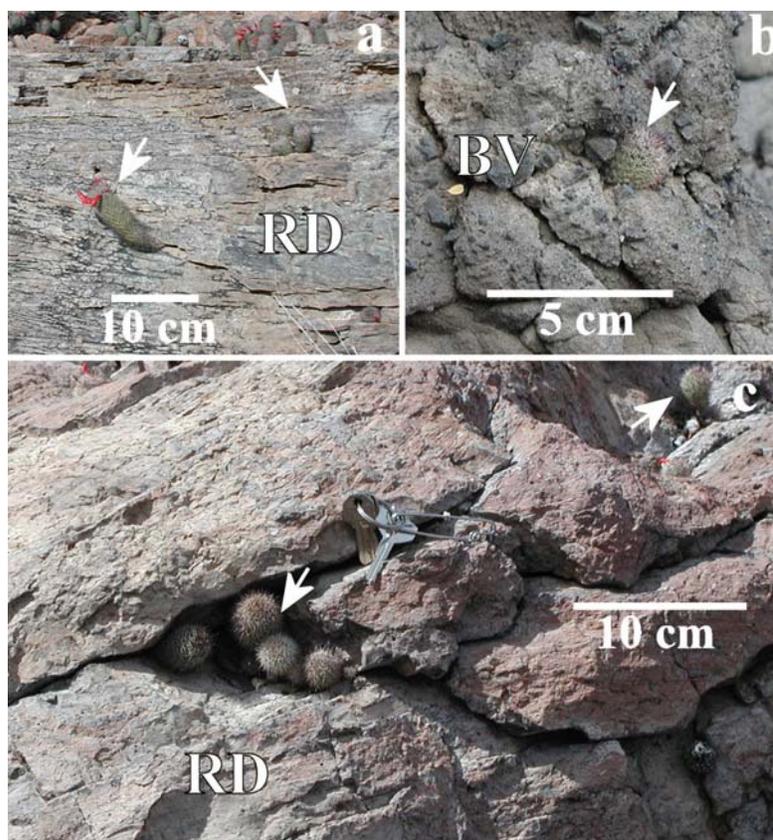


Fig. 5 Rocas volcánicas características en los sitios de estudio. Las flechas indican a los individuos de *Mammillaria fraileana*. (a) Sitio A compuesto por rocas Providencia Riodacita. (b) Sitio C compuesto primordialmente de brecha andesítica. RD=Providencia Riodacita, VB=Brecha Volcánica. (c) Sitio B compuesto por rocas Providencia Riodacita.

Tabla 2 Composición mineral de las rocas en los tres sitios de estudio.

| Minerales | Sitios | | |
|-------------------------------|------------|--|--|
| | A | B | C |
| Vidrio volcánico ¹ | ~96% | ~90% | ~60% |
| Plagioclasa | 1-2% | 5-8% | 25-40% |
| Piroxeno | 1-2% | 2-5% | ~5% |
| Otros | Hornblenda | <1% magnetita, Trazas de calcita, Hornblenda intemperizada | ~2% magnetita, 2% olivino intemperizado |

¹Combinación de diversos minerales, principalmente aquellos relacionados con riolita, dacita y andesita.

Las rocas de los tres sitios presentaron minerales félsicos, es decir, altas cantidades de Sílice, Oxígeno, Aluminio y Potasio. El Sitio C, por su parte tuvo una composición más bien máfica, es decir, rica en magnesio y fierro, notablemente con menos Sílice pero manteniéndose su carácter félsico. En general, el área de estudio presentó niveles muy bajos (casi al límite de detección) de fósforo y azufre. De manera semejante, el cloro se presentó en niveles insignificantes (Tabla 3).

Tabla 3 Concentración elemental de las rocas en los tres sitios de estudio, basado en analisis de Fluorescencia de Rayos X.

| Elemento | Sitio | | |
|---|---------------|----------------|---------------|
| | A | B | C |
| Elementos mayores (mg elemento g roca ⁻¹ ± SE) | | | |
| Al | 137.6 ± 0.7 | 135.1 ± 3.1 | 180.8 ± 1.9 |
| Ca | 9.1 ± 0.2 | 10.7 ± 1.0 | 69.8 ± 1.4 |
| Fe | 25.3 ± 0.2 | 23.8 ± 0.8 | 70.4 ± 1.1 |
| K | 45.5 ± 0.2 | 48.2 ± 1.0 | 14.3 ± 0.5 |
| Mg | 1.9 ± 0.1 | 2.7 ± 0.3 | 30.5 ± 0.9 |
| Mn | 0.5 ± 0.0 | 0.5 ± 0.0 | 1.3 ± 0.0 |
| Na | 37.6 ± 0.5 | 36.9 ± 0.7 | 29.4 ± 0.5 |
| P | 0.9 ± 0.1 | 1.6 ± 0.3 | 2.3 ± 0.2 |
| S | 0.1 ± 0.0 | 0.3 ± 0.2 | 0.4 ± 0.2 |
| Si | 704.6 ± 1.2 | 707.4 ± 5.7 | 566.1 ± 4.1 |
| Ti | 4.5 ± 0.0 | 3.8 ± 0.3 | 9.0 ± 0.2 |
| Elementos traza (mg kg-rock ⁻¹) | | | |
| As | 16.0 ± 1.0 | 16.2 ± 3.4 | 3.0 ± 1.0 |
| Ba | 1700.7 ± 67.6 | 1330.4 ± 158.1 | 946.6 ± 138.8 |
| Ce | 94.8 ± 3.0 | 126.2 ± 9.3 | 44.9 ± 1.7 |
| Cr | 2.6 ± 0.3 | 4.0 ± 0.6 | 17.7 ± 1.8 |
| Cs | 4.3 ± 0.4 | 10.1 ± 1.1 | 5.4 ± 0.6 |
| Cu | 5.8 ± 0.3 | 8.8 ± 1.2 | 12.1 ± 0.8 |
| Ga | 21.2 ± 0.2 | 22.8 ± 1.0 | 26.0 ± 0.4 |
| La | 45.9 ± 1.3 | 59.7 ± 3.3 | 20.9 ± 0.9 |
| Nb | 23.5 ± 0.3 | 34.6 ± 5.5 | 7.6 ± 0.3 |
| Nd | 44.1 ± 1.5 | 53.9 ± 4.5 | 23.1 ± 1.2 |

| | | | |
|----|-------------|--------------|-------------|
| Ni | 2.5 ± 0.4 | 4.4 ± 0.4 | 9.1 ± 0.7 |
| Pb | 24.4 ± 1.6 | 21.7 ± 0.8 | 8.2 ± 0.5 |
| Rb | 176.8 ± 0.8 | 238.2 ± 18.6 | 59.2 ± 3.5 |
| Sc | 12.4 ± 0.2 | 9.4 ± 0.8 | 31.1 ± 2.8 |
| Sr | 181.7 ± 3.4 | 210.6 ± 23.9 | 472.7 ± 9.8 |
| Th | 17.5 ± 0.3 | 31.2 ± 4.2 | 4.3 ± 0.3 |
| U | 5.4 ± 0.3 | 7.6 ± 1.0 | 1.2 ± 0.4 |
| V | 28.5 ± 1.2 | 49.7 ± 5.3 | 234.4 ± 9.5 |
| Y | 47.0 ± 1.8 | 53.8 ± 5.9 | 35.0 ± 1.3 |
| Zn | 72.0 ± 1.8 | 76.4 ± 8.4 | 108.9 ± 1.5 |
| Zr | 493.6 ± 2.9 | 534.9 ± 44.9 | 172.1 ± 3.2 |

Los datos fueron calculados por conversión de porcentaje en peso a unidades de peso de elemento/peso de muestra.

1.6.4. Variación espacial de la composición química de rocas en los sitios de estudio

Del ACP de elementos se observó que respecto al primer eje de variación CP 1 (70.66% la varianza total explicada) existe una clara separación de la composición elemental del Sitio C (Número 1 en el lado izquierdo de la Fig. 6a) respecto a los Sitios A y B (en el lado derecho de la Fig. 6a). En relación al segundo eje de variación CP2 (10.35% de varianza total explicada), los sitios A y B, que parecen separarse, son considerados como semejantes debido a que la varianza explicada en el CP2 es muy baja. Por lo tanto la distancia entre los Sitios A-B es despreciable comparada con la que guardan dichos sitios respecto al Sitio C. El sitio C se asoció con las concentraciones más altas de seis elementos mayores Ca, Fe, Mg, Ti, Al y Mn (pesos en el CP1= -0.209, -0.209, -0.208, -0.207, -0.206, y -0.202, respectivamente) y por la abundancia de cinco elementos traza: Sc, V, Sr, Cr y Ni (pesos en el CP1 -0.208, -0.204, -0.201, -0.189 y -0.174, respectivamente). Por

otro lado, los sitios A y B se asociaron principalmente con altas concentraciones de tres elementos mayores: Si, K y Na (Pesos en el CP1=0.209, 0.208 y 0.187, respectivamente) y elementos traza como el Zr, La, Pb, Rb, Ce, Nd, U, Nb y Th (pesos en el CP1=0.197, 0.193, 0.190, 0.188, 0.187, 0.181, 0.171, 0.165 y 0.160, respectivamente).

Todos los elementos asociados con el patrón de ordenación descrito anteriormente fueron analizados por ANOVA y posteriormente comparados con la comparación de medias Tukey con la finalidad de confirmar las diferencias entre los sitios A-B respecto al Sitio C y a su vez determinar los elementos más importantes en la ordenación de sitios. Se encontraron diferencias altamente significativas entre sitios ($p < 0.001$, 2/26 *gl*) respecto a todos los elementos relacionados con el patrón de ordenación. La prueba Tukey ($p < 0.05$) mostró semejanzas entre los Sitios A y B respecto a siete elementos mayores: Si, Al, Fe, Mn, Ca, Mg, y Na (Fig. 7 a-f y Fig. 8a).

En cuanto a nutrientes esenciales para las plantas como K y P fueron significativamente diferentes entre sitios aunque no hubo una clara agrupación entre ellos (Fig. 8 b, c). Al considerar el valor acumulado de K+P, se observaron diferencias significativas entre sitios ($F=684.86$, $p < 0.0001$, 2/26 *gl*) y entonces el agrupamiento se hizo evidente, observándose un mayor valor acumulado de K + P en los sitios A y B (Fig. 8e). En general se observaron diferencias altamente significativas ($F=1475.22$, $p < 0.0001$, 2/26 *gl*) cuando se comparó el valor acumulado de Fe+Mn+Ca+Mg, siendo éste mayor en el sitio C, donde se registró menor densidad y volumen de plantas.

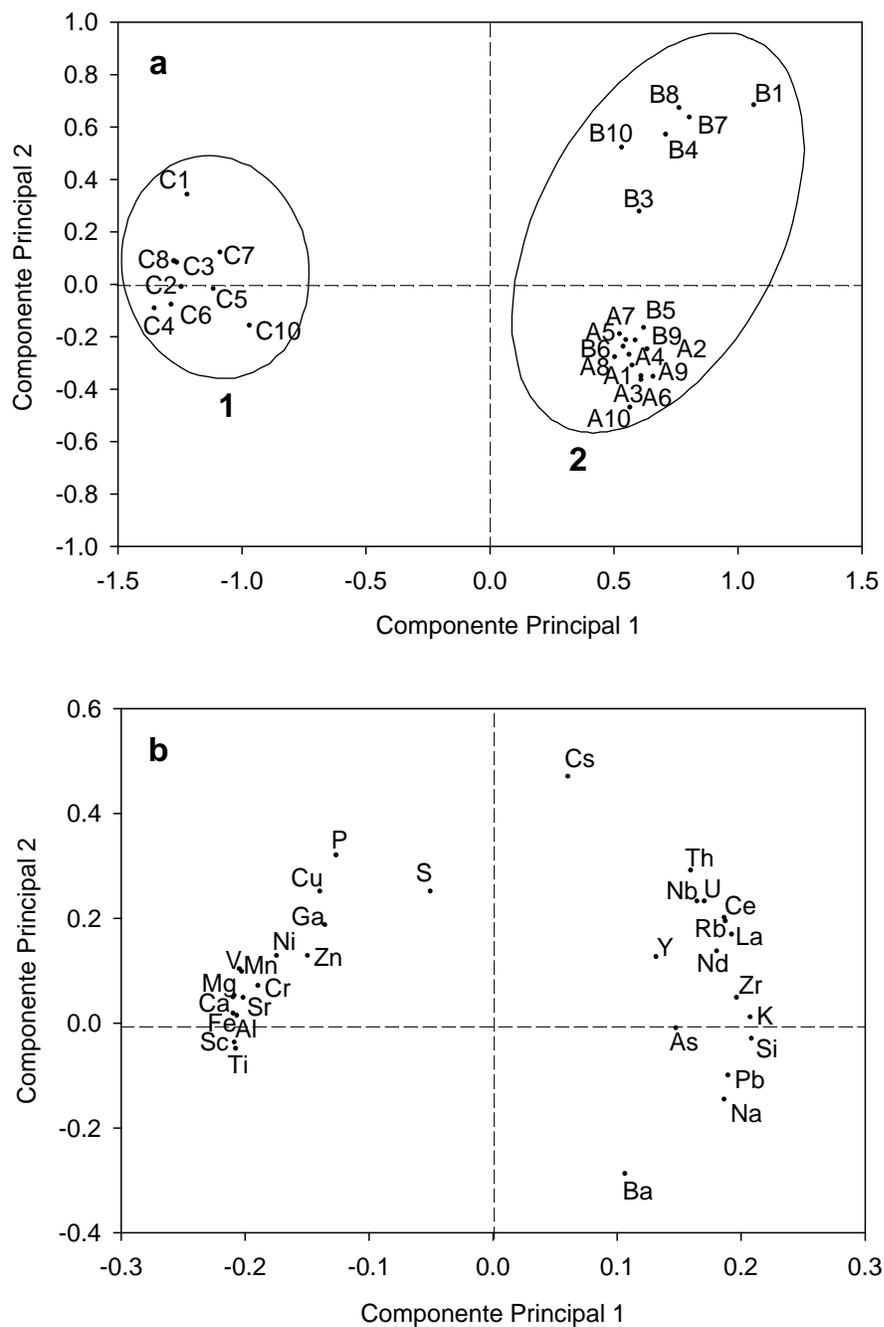


Fig. 6 Análisis de Componentes Principales. (a) Ordenación de sitios de estudio. Los ovals representan patrones de agrupamiento denominados 1 y 2, A1 a A10, B1 a B10, o C1 a C10 indican unidades de muestreo (•) en el Sitio A, B, o C, respectivamente. (b) Ordenación de elementos basada en sus pesos (loadings) en cada Componente Principal.

Respecto a elementos traza considerados como tóxicos (Taiz y Zeiger 2006), la concentración de Zn fue menor en los Sitios A y B ($F=18.65$, $p<0.0001$, 2/26 gl) y más alto en el Sitio C ($F=14.58$, $p<0.0001$, 2/26 gl), sin embargo el Cu y Ni no mostraron el mismo patrón ($F=14.67$, $p<0.0001$, 2/26 gl, y $F=40.47$, $p<0.0001$, 2/26 gl, respectivamente). Al compararse el valor acumulado de Al+Zn+Cu+Ni, se encontraron diferencias altamente significativas entre sitios ($F=182.24$, $p<0.0001$, 2/26 gl). Los Sitios A y B presentaron valores acumulados inferiores (Fig. 8g). Otro resultado relevante fue que la relación Na:K, fue menor en los Sitios A y B (Na:K=1:1), indicando que el Na y el K estuvieron presentes en proporciones semejantes en dichos sitios. El Sitio C por su parte estuvo reducido en K y por lo tanto, la relación Na:K fue casi de 2:1.

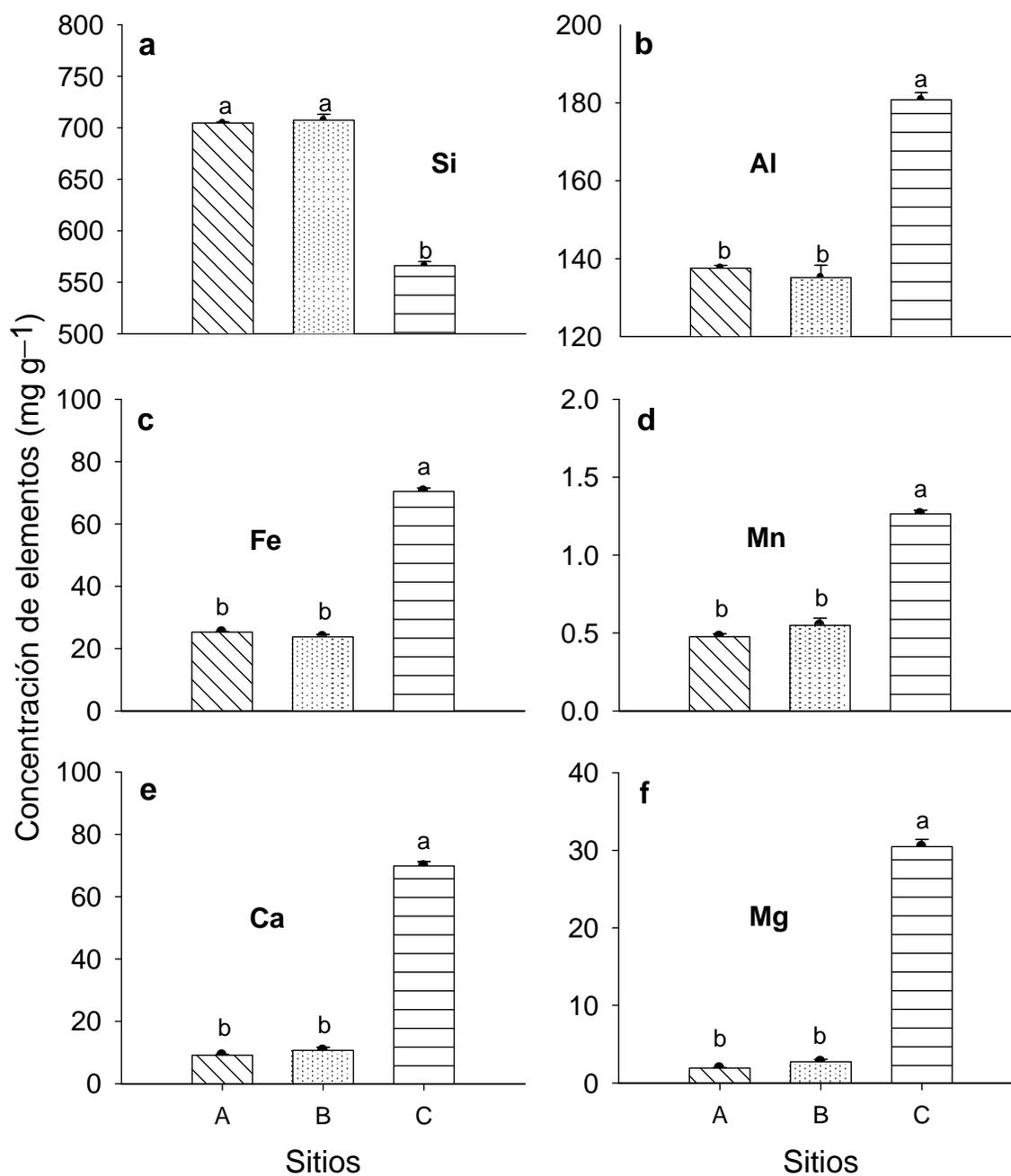


Fig. 7 Concentración de elementos en los Sitios A, B y C con comparaciones para: (a) Sílice, (b) aluminio, (c) hierro, (d) manganeso, (e) calcio y (f) magnesio. Las columnas marcadas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) (comparación Tukey). Se presenta la media \pm ES (N=30)

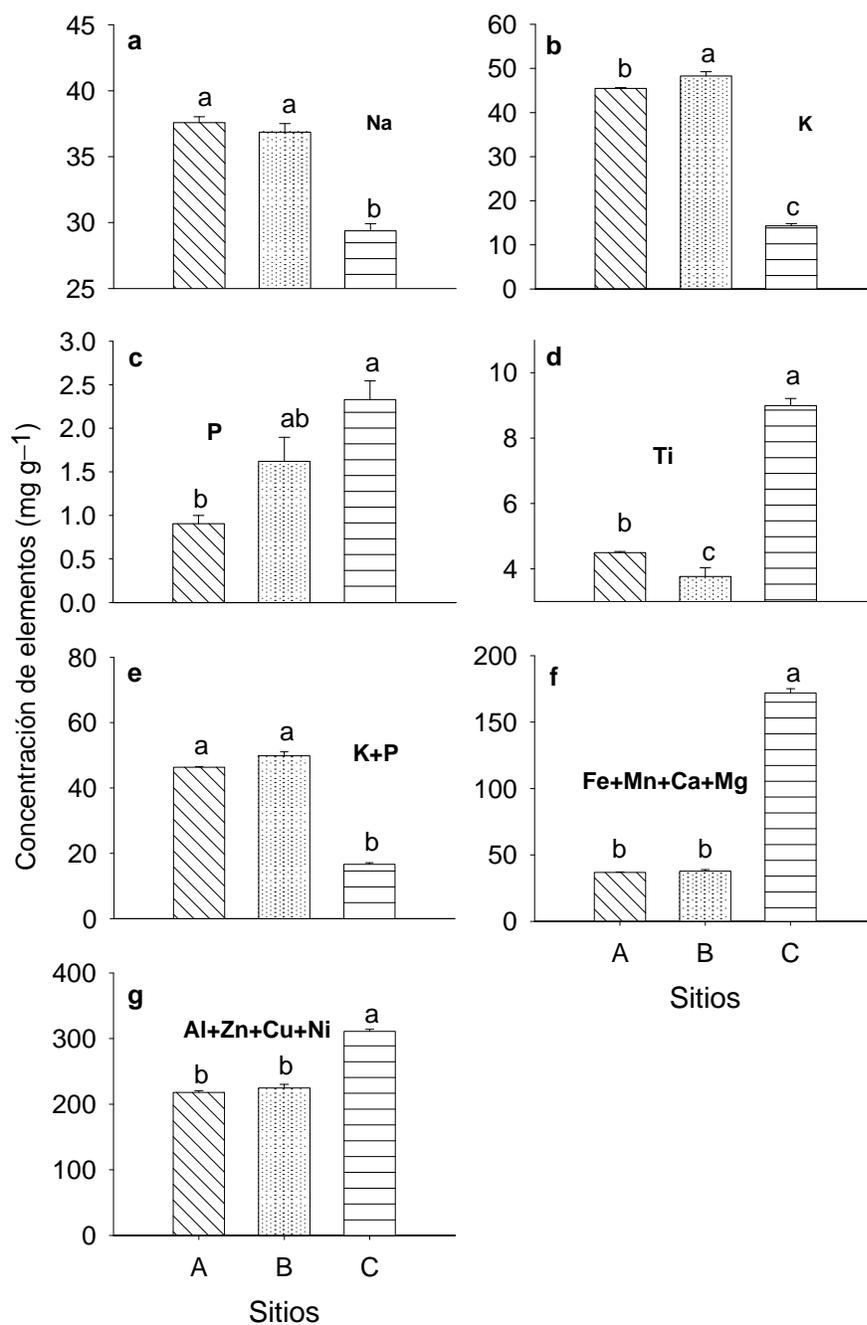


Fig. 8 Concentración de elementos en los Sitios A, B y C con comparaciones para (a) Sodio, (b) Potasio, (c) Fósforo, (d) Titanio, (e) Valor acumulativo para los macronutrientes K+P, (f) Valor acumulativo para hierro+manganeso+calcio+magnesio y (g) Valor acumulativo para elementos tóxicos: aluminio+zinc+cobre+níquel. Las columnas marcadas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$, comparación Tukey, $N=30$) Las barras indican error estándar (ES). Ausencia de barras indica que ES insignificante.

1.6.5. Correlacion entre la abundancia de *M. fraileana* y la composición química de las rocas

Aproximadamente el 70% de los elementos mayores se correlacionó fuertemente con la abundancia de *M. fraileana*, mientras que solo el 40 % de los elementos traza mostró correlaciones, principalmente positivas. Se encontraron correlaciones positivas ($p < 0.001$) únicamente para tres elementos mayores: K, Si, Na y siete elementos traza: Nd, La, Ce, Zr, Nb, Y y Rb. Las correlaciones negativas se presentaron para Al, Ca, Fe, Mn, Mg y Ti (Tabla 4).

Tabla 4 Coeficientes de Correlación entre la abundancia de *M. fraileana* y la concentración de elementos en las rocas de tres sitios de estudio. Negritas indican correlaciones altamente significativas ($p < 0.001$).

| Elementos mayores | | Elementos traza | |
|-------------------|--------------|-----------------|--------------|
| Al | -0.74 | As | 0.42 |
| Ca | -0.67 | Ba | 0.52 |
| Fe | -0.65 | Ce | 0.75 |
| K | 0.68 | Cr | 0.15 |
| Mg | -0.60 | Cs | 0.25 |
| Mn | -0.63 | Cu | -0.02 |
| Na | 0.62 | Ga | -0.31 |
| P | -0.25 | La | 0.76 |
| S | -0.16 | Nb | 0.64 |
| Si | 0.66 | Nd | 0.78 |
| Ti | -0.59 | Ni | 0.14 |
| | | Pb | 0.56 |
| | | Rb | 0.60 |
| | | Sc | -0.69 |
| | | Sr | -0.45 |
| | | Th | 0.49 |
| | | U | 0.53 |
| | | V | -0.63 |
| | | Y | 0.61 |
| | | Zn | -0.32 |
| | | Zr | 0.72 |

1.6.6. Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de *M. fraileana*

La tasa de supervivencia disminuyó a través del tiempo en todos los tratamientos. Incluso el tratamiento control regado con agua desionizada mostró disminución en el número de plántulas. La tasa de supervivencia disminuyó al incrementar la concentración

de NaCl (Fig. 9a). Se encontraron diferencias altamente significativas entre los tratamientos de salinidad ($p < 0.0001$, $F = 140.01$). Las comparaciones de Tukey ($p < 0.05$) indicaron que el efecto de la salinidad en la supervivencia es semejante al final del experimento en los tratamientos a 1.5% y 2.5% de NaCl (supervivencia = $19.77\% \pm 2.32$ y $19.3\% \pm 2.73$), pero diferente respecto al control, con 0% de NaCl (supervivencia $79.5\% \pm 4.11$) y al tratamiento de 3.0% NaCl $5.55\% \pm 1.19$) (Fig. 9b).

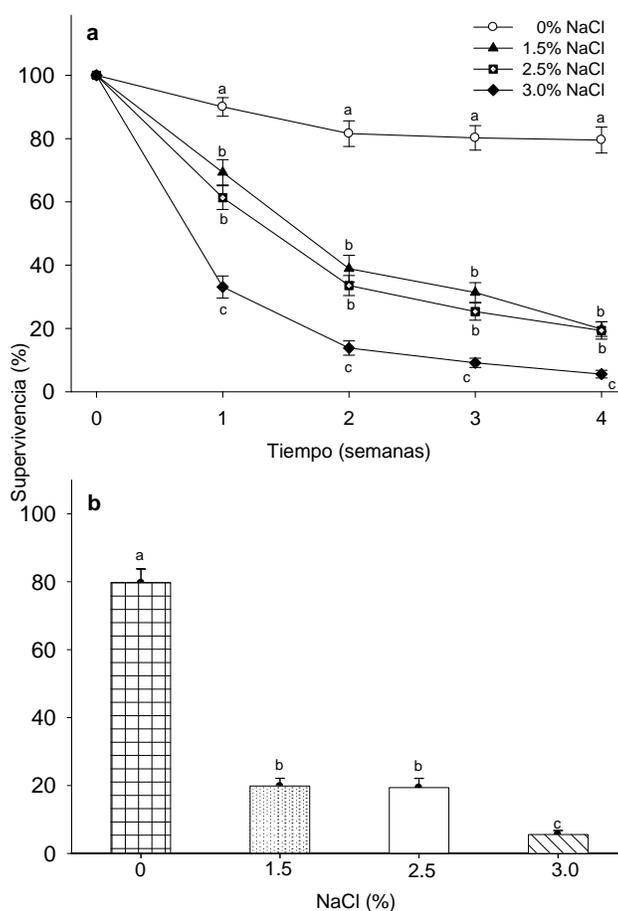


Fig. 9 Efecto del NaCl en la supervivencia de plántulas de *Mammillaria fraileana*. (a) Curvas de supervivencia, (b) Prueba de comparación Tukey para las curvas de supervivencia al final del experimento (semana cuatro). Valores de supervivencia en cada semana (Fig. 9a) señalados con diferentes letras minúsculas expresan diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía y prueba Tukey ($p < 0.05$). Columnas con letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas determinadas por ANOVA de una vía y prueba Tukey ($p < 0.05$). Barras indican Error Estándar (ES)

1.7. DISCUSIÓN

La colonización de rocas representa una ventaja ecológica para las plantas que son capaces de tolerar condiciones extremas (Bashan *et al.* 2002, 2006). En este estudio, la comunidad saxícola se compuso únicamente de ocho especies, principalmente cactáceas *M. fraileana*, *E. brandegeei*, *M. brandegeei*, y *P. pringeli*. Este resultado concuerda con otros estudios que describen la ocurrencia común de cactáceas en sustratos rocosos (Valverde *et al.* 2004; Bashan *et al.* 2002). Las cactáceas observadas en este estudio fueron observadas con frecuencia en la vegetación circundante, creciendo en parches de suelo entre las roca. Sin embargo, la colonización de rocas estuvo dominada casi exclusivamente por *M. fraileana*. Una alta dominancia y baja riqueza específica, como las observadas en este estudio, son características de comunidades poco diversas (Crawley 1986) en las que el ambiente es muy estresante. En este caso, el sustrato rocoso representa un hábitat sumamente limitante para el desarrollo y establecimiento de las plantas en el cual predominan altas temperaturas, alta radiación, baja disponibilidad de agua, sustrato difícil de penetrar por las raíces, volumen de suelo limitado y escasez de nutrientes (Nagy y Proctor 1997; Bashan *et al.* 2002, 2006).

El desarrollo de plantas saxícolas de zonas áridas se ha relacionado con factores físicos como la cantidad de luz reflejada, dureza de las rocas, porosidad, capacidad de retención de agua del sustrato (Martre *et al.* 2002; Nobel y Zutta 2007). Sin embargo se conoce muy poco acerca del control de dichos factores sobre la abundancia de plantas colonizadoras de rocas. En este estudio, *M. fraileana*, como otras plantas saxícolas utiliza como hábitat las fracturas y fisuras de rocas (Zwieniecki y Newton 1995; Bashan *et al.*

2002). De hecho, las numerosas fracturas y fisuras características de las riolitas (Hausback 1984) se asociaron con la abundancia de *M. fraileana* en los Sitos A y B, sin embargo, no se dispone de datos para comprobación estadística. Para estudios posteriores se sugiere medir la densidad de fracturas, su profundidad y otros factores microambientales que pueden conferir ventajas para el establecimiento y permanencia de *M. fraileana* en las rocas. De acuerdo con las observaciones de campo, se sugiere que las fracturas profundas brindan protección a las plántulas contra herbívoros y condiciones ambientales extremas como la radiación solar directa.

Además de los factores físicos se sabe que la presencia y concentración de ciertos minerales (Nobel y Zutta 2007), la tasa de intemperización de los minerales (Nagy y Proctor 1997) y la disponibilidad de nutrientes son factores que en distinto grado determinan la colonización de rocas por plantas. En este estudio se hipotetizó que dichos factores, especialmente la mineralogía y composición química de las rocas contribuyen al éxito de *M. fraileana* y probablemente controlan su distribución local. Los resultados de los tipos de rocas y su composición mineral coinciden con los estudios de Hausback (1984), en cuanto a que las rocas predominantes en el área de estudio son andesitas, riolitas y brechas volcánicas. Los resultados mineralógicos indicaron que los sitios con mayor abundancia de *M. fraileana* (Sitios A y B) estuvieron caracterizados por mayor proporción de vidrio volcánico. Este mineral es más fácil de intemperizar de acuerdo con la escala de susceptibilidad: vidrio volcánico > plagioclasa > piroxeno, propuesta por Colman (1982). Es probable que la alta proporción de minerales menos intemperizables (plagioclasa y piroxeno) en el Sitio C sea una de las explicaciones a la baja abundancia de plantas en dicho sitio.

Al analizar la composición de rocas en términos de los elementos presentes y su probable disponibilidad durante el proceso de intemperización, se encontró que los sitios con baja abundancia de plantas presentaron a su vez altas concentraciones de Ca, Fe, Mg, Ti, Al, y Mn, mientras que los sitios con alta abundancia fueron ricos en Si, K, y Na. Aunque el grado de intemperización de las rocas no fue medido, es sabido que el intemperismo de la andesita (roca predominante en los sitios de estudio) libera inicialmente Ca, Mg, K y Na, mientras que los metales (*i.e.* Al, Fe) son menos móviles (Mulyanto 1999). Dadas las correlaciones negativas de la abundancia de plantas con la concentración de Ca, Mg, Fe y Mn, es probable que estos cationes se encuentren disponibles a niveles limitantes para la ocurrencia de *M. fraileana*. No obstante habría que considerar en estudios posteriores el efecto combinado del intemperismo biológico pues algunas plantas con capaces de acelerar la disolución de Si, Mn, Al y Fe (Akter y Akagi 2005) modificando el patrón de liberación de elementos indicado previamente.

Contrario a lo que se esperaba, se encontraron correlaciones positivas entre la abundancia de *M. fraileana* y altas concentraciones de Na y Si, sin embargo éstos elementos no son considerados esenciales para las plantas (Raven 2003). El papel fisiológico del Si no es claro pero se le atribuyen cualidades para contrarrestar el efecto tóxico del Al y Mn y también se le ha adjudicado un papel estructural en las células en donde forma depósitos. El Na, por el contrario, es ampliamente conocido por su toxicidad a niveles moderado (Taiz y Zeiger 2006). De acuerdo con la secuencia de liberación de elementos durante la intemperización de las rocas que se describió anteriormente, la alta disponibilidad del Na en los sitios ricos en *M. fraileana* debería afectar la fisiología de las plantas, sin embargo, en campo es probable que éste elemento se disuelva fácilmente durante un evento lluvioso.

Para probar la hipótesis de que la resistencia o tolerancia al Na (en forma de NaCl) provee de ventajas a *M. fraileana* sobre otras plantas, se sometieron plántulas de *M. fraileana* a diversas concentraciones de NaCl (256 mM a 513mM), encontrándose que la supervivencia de plántulas disminuye conforme aumentan los niveles de NaCl. En general, el efecto negativo del NaCl podría estar asociado a la sensibilidad hacia Na y Cl que exhiben la mayoría de plantas terrestres. No obstante, las plántulas de *M. fraileana* mostraron mayor tolerancia a NaCl que plántulas de otras cactáceas, como *Ferocactus acanthodes*, *Trichocereus chilensis* y *Carnegie gigantea*, en las cuales se ha registrado supervivencia hasta concentraciones de 130 mM NaCl (Nobel 1983). La ocurrencia de mortalidad, incluso en el tratamiento sin NaCl, sugiere que probablemente *M. fraileana* requiere de Na^+ para su desarrollo, aunque quizá a niveles más bajos que los probados en este estudio. De hecho, el Na es considerado esencial para algunas plantas con metabolismo C4 o con metabolismo ácido crasuláceo (CAM; Winter y Ziegler 1992; Winter y Holtum 2005) el cual realizan las cactáceas. Sin embargo, la respuesta al Na en plantas CAM varía dependiendo de la edad de las plantas y condiciones ambientales, particularmente de sequía (Winter y Ziegler 1992; Winter y Holtum 2005).

Otra explicación al éxito de *M. fraileana* como colonizadora de rocas está relacionada con la cantidad de K y su proporción con otros elementos. Aunque se encontraron relativamente bajos niveles de K, la abundancia de las plantas estuvo positivamente correlacionada con las concentraciones más altas de este elemento. Al considerar el efecto de K+P, se encontró que los sitios con mayor abundancia de plantas presentaron también las más altas concentraciones de estos elementos. Por su parte, el K podría jugar un papel importante dado que puede contrarrestar el efecto tóxico del Na, por

lo que la relación K:Na podría ser indicador de balance de iones (Poole 1971; Cramer *et al.* 1987). Los resultados indicaron una proporción K:Na de 1:1 en los sitios (Sitios A y B) con mayor abundancia de *M. fraileana*, mientras que el sitio pobre en plantas (Sitio C) mantuvo una proporción de casi el doble de Na respecto al K (K:Na=1:2). Es probable que el desbalance en la proporción K:Na en las rocas se mantenga también durante la intemperización de las rocas, limitando la ocurrencia de *M. fraileana* en el sitio C.

Respecto a otros nutrientes para las plantas, la fuente de nitrógeno para *M. fraileana* no fue abordada en este estudio. Sin embargo, estudios previos han revelado que las raíces de plantas colonizadoras de rocas presentan comúnmente grandes poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno (Puente *et al.* 2004a; Puente *et al.* datos sin publicar), por lo tanto se acepta que dicho elemento se encuentra generalmente disponible a través de la fijación bacteriana de nitrógeno.

En relación a los factores biológicos que pueden representar ventajas para *M. fraileana*, se sugieren: 1) Factores inherentes de la especie, en este caso la versatilidad de las semillas para germinar dentro del fruto y en condiciones de luz u oscuridad (Fotoblastismo; Benitez *et al.* 2004), alta producción de semillas las cuales pueden mantenerse entre los tubérculos del tallo y ser liberadas durante lluvias ocasionales como las de invierno. Otra adaptación consiste en el desarrollo de un sistema radicular dual (Dawson y Pate, 1996) que consiste en un grupo de raíces superficiales (Nobel 1983) y otro de raíces profundas que operan diferencialmente dependiendo de la disponibilidad de agua (Zwieniecki y Newton 1995). Asimismo, la asociación con microorganismos benéficos como bacterias y hongos micorrícicos provee a las plantas de nitrógeno el cual es ausente en las rocas (Bashan *et al.* 2007; Puente *et al.* 2004b). 2) Factores ecológicos,

especialmente los que se refieren a mayores habilidades competitivas. Tales capacidades se pueden asociar con una alta habilidad de dispersión y de competencia interespecífica por polinizadores, nutrientes y espacio (Ryti 1984). Según las observaciones de campo realizadas durante el presente estudio, la diversidad de consumidores (aves, roedores, reptiles e insectos) favorece la dispersión de frutos y semillas de *M. fraileana*. Asimismo, la oportunidad de dispersión se incrementa al considerar el abundante banco de semillas que representa el alto número de plantas de *M. fraileana* que crecen en la vegetación circundante, sobre suelo ya formado.

1.8. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados aquí mostrados resaltan la importancia de *M. fraileana* como colonizadora de rocas e indican que las variaciones locales observadas en la abundancia de las plantas se pueden asociar con la composición mineral y química de las rocas. Los sitios con baja abundancia de plantas presentaron a su vez altas concentraciones de Ca, Fe, Mg, Ti, Al, y Mn, mientras que los sitios con alta abundancia fueron ricos en Si, K, y Na. Se analizó la supervivencia de plantas en sustrato con diferentes concentraciones de NaCl, encontrándose una relativa tolerancia a bajos niveles de salinidad por Na.

Se ha provisto evidencia de que existe correlación entre la composición mineral y elemental de las rocas con la abundancia de *M. fraileana* y se concluye además, que las variaciones en la abundancia observadas se pueden explicar por la interacción de varios elementos, más que por el efecto aislado de alguno de ellos. Se sugiere explorar otros factores físicos y biológicos, así como sus interrelaciones, lo cual ayudará a elucidar su contribución relativa en el éxito de la especie en sustratos rocosos de ambientes desérticos.

CAPÍTULO II

Bacterias endófitas de *M. fraileana*: Inoculantes con capacidad para promover el crecimiento vegetal y/o degradar rocas

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. El término endófito

El significado literal del término *endófito* es “dentro de la planta” (*endon* gr. = *dentro*, *phyton* = *planta*). El uso de éste término se aplica a bacterias (Kobayashi y Palumbo 2000), hongos (Stone *et al.* 2000), plantas (Marler *et al.* 1999) e insectos (Feller 1995) y algas (Petters 1991) que pueden colonizar cualquier órgano vegetal. El término endófito se aplica en el sentido más amplio al continuo de estrategias de vida que van desde la simbiosis pasando por formas saprófitas, parásitas y de explotación hasta mutualistas. Incluso, se utiliza para algas endófitas patogénicas (Boubarab *et al.* 1999), plantas endofitas parásitas (Marler *et al.* 1999), bacterias endófitas mutualistas (Chaway 1996); Adhikari *et al.* 2001; Bai *et al.* 2002), hongos (Sieber 2002; Schulze y Boyle 2005; Strobel 2007), bacterias patógenas y hongos en fases latentes (Sinclair y Cerkauskas 1996) y también para microorganismos que establecen simbiosis comensalistas (Sturz y Nowak 2000).

Entre los microorganismos, la definición más aceptada hace referencia a los hongos endófitos, que son aquellos organismos “cuya colonización interna en las plantas puede ser comprobada y cuyas infecciones son inconspicuas, de manera que los tejidos de la planta hospedera permanecen asintomáticos, al menos temporalmente” (Stone *et al.* 2000). Esta definición describe un estado momentáneo ya que engloba a un grupo de microorganismos

con diferentes historias de vida, entre ellos: organismos de vida libre que pasan a una fase endofítica en el momento en que colonizan saprofiticamente tejidos vegetales senescentes o muertos (Stone 1987), así como patógenos latentes y patógenos virulentos en etapas tempranas de infección (Kobayashi y Palumo 2000). Debido a que las plantas hospederas responden ocasionalmente a las infecciones con mecanismos de defensa (Narisawa *et al.* 2004), una característica adicional de las interacciones endofíticas es provista por Petrini (1991) quien establece que los microorganismos endófitos “**no causan daño aparente**” lo cual refiere presumiblemente a la ausencia de síntomas macroscópicamente visibles.

2.1.2. Definición de bacterias endófitas

En términos generales la definición de hongos endófitos es aplicable para las bacterias. Hallmann *et al.* (1997) establecen que las bacterias endófitas son aquellas que son obtenidas de tejidos desinfectados o extraídos de tejidos internos de las plantas y que no causan daños visibles a las plantas. Considerando que algunos estados quiescentes de las bacterias endófitas pueden convertirse en patógenas bajo ciertas condiciones (Misaghi y Donndelinger 1990), la definición se ha acotado a bacterias que residen dentro de las plantas sin producir daño sustantivo o que no obtienen otro beneficio de la planta más que residencia segura (Kado 1992). Entre las bacterias endófitas se incluyen aquellas que establecen relaciones simbióticas con las plantas (Quispel 1992).

No se ha precisado el término para alguna ubicación en particular dentro de la planta, aunque usualmente se consideran de distribución intercelular (Schulz y Boyle 2006). Sin embargo, Lodewyckx *et al.* (2002) sugieren que en congruencia con la definición de hongos endomicorrícicos, las bacterias de la corteza de la raíz son también

endófitas. De manera análoga, Kloepper *et al.* (1992) consideran endófitas a las bacterias que se encuentran en el interior de tejido epidérmico.

De manera congruente con Stone (2000), Reinhold-Hurek y Hurek (1998) sugieren que un criterio esencial para el reconocimiento de una verdadera endófita es que exista evidencia microscópica de dichas bacterias dentro de los tejidos vegetales, sin embargo no siempre se consigue este último criterio. Alternativamente se sugiere el uso del término “presumible endófita” *putative endophyte* para aquellos casos en que no se valida microscópicamente la presencia de las endófitas. Un último criterio se refiere a la capacidad de las endófitas para recolonizar tejidos de plantas previamente desinfectados (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

2.1.3. Evolución de las relaciones endofíticas

El amplio espectro de bacterias consideradas endófitas dificulta el establecimiento de un modelo único para la evolución de las relaciones endofíticas. Partiendo de los modelos de la evolución de formas patógenas descritos por Heath (1986) y Djordjevic *et al.* (1987), Kobayashi y Palumbo (2000) sugieren que las interacciones endofíticas pueden tener su origen en la saprotrofia.

En estados iniciales de la evolución, el saprófito es un tipo de parásito que reside de manera ectotrófica y sobreviven a expensas de compuestos exudados por las plantas como sucede con algunas bacterias rizosféricas como *Pseudomonas fluorescens*. Formas más evolucionadas a las anteriores corresponden a las patógenas facultativas que pueden sobrevivir como saprófitas (*i. e. Erwinia carotovora*). Enseguida se ubicarían las patógenas obligadas (*i. e. Pseudomonas syringae*) y finalmente las formas más

evolucionadas estarían representadas por organismos que establecen relaciones mutualistas tales como las bacterias diazotróficas del género *Azotobacter*. Bajo el modelo descrito, las bacterias reportadas como endófitas podrían ubicarse en alguno(s) de los estados evolucionados, mientras que las bacterias propiamente saprófitas serían las menos evolucionadas.

Es necesario señalar que este modelo no tiene que ser unidireccional ya que de acuerdo a Kado (1992), las bacterias selectivamente evolucionan hacia su máxima adecuación, la cual no necesariamente implica la evolución hacia la interacción directa con el hospedero, por lo tanto las endófitas que tienen la capacidad de sobrevivir como saprófitas constituyen también otro estado en el desarrollo evolutivo de las endófitas.

Al parecer durante la evolución de las interacciones entre plantas y bacterias, la incidencia de las asociaciones endofíticas se intensifica. Germida y Siciliano (2001) compararon la diversidad de bacterias asociadas a raíz de trigo en cultivares antiguos y en cultivares modernos, encontrando que en cultivares antiguos las *Pseudomonas* dominaban entre las bacterias rizosféricas mientras que en cultivares modernos este mismo grupo dominaba en la comunidad endofítica, sugiriendo que el grado de domesticación favorece la colonización endofítica por parte de bacterias provenientes de la rizósfera.

En los niveles de asociación de plantas y bacterias, las bacterias endófitas corresponden a aquellos microorganismos que han perdido la habilidad para provocar síntomas indicativos de enfermedad (Rahme *et al.* 1991) pero que mantienen la habilidad para colonizar los tejidos en densidades poblacionales significativas (Kobayashi y Palumbo 2000).

Recientemente, secuencias genómicas de la cepa BH72 de *Azoarcus* (bacteria fijadora de nitrógeno) (Hurek y Reinhold-Hurek 2003; Krause *et al.* 2006) fueron comparadas con secuencias de diversas bacterias endófitas asociadas a las plantas encontrándose que el genoma de la cepa BH72 carecía de algunos genes que codifican para los sistemas de secreción tipo III y IV encargados de producción de toxinas, factores de nodulación, hidrolasas de pared celular y N-acil homoserin lactonas los cuales son encontrados en muchas bacterias asociadas a plantas y fitopatógenos (Rainey 1999; Preston *et al.* 2001; Buttner y Bonas, 2006). En otros estudios con la misma cepa BH72, se encontraron factores de asociación con el hospedero, entre ellos algunos de producción de polisacáridos de superficie, de la formación de pili, de sistemas de secreción de proteínas tipo I y II, flagelos y quimiotaxis, así como un gran número de sideroforos férricos encargados de la absorción de nutrientes. Por lo tanto, se sugiere que gran parte de los genes que codifican para la patogenicidad pueden encontrarse significativamente suprimidos en las bacterias endófitas de manera que los microorganismos pierden su capacidad para inducir síntomas visibles de enfermedad pero a su vez conserven la maquinaria para catabolizar nutrientes derivados de las plantas, logrando así el mantenimiento de sus poblaciones (Kobayashi y Palumbo 2000).

El hecho de que los organismos endófitos se establezcan dentro de las plantas sin causar daño aparente sugiere la existencia de un antagonismo en equilibrio en el que el organismo endófito es en realidad un patógeno latente. Mientras la virulencia del endófito y el sistema de defensa de la planta se mantengan equilibrados, la interacción permanece asintomática pero si la interacción planta microorganismo sufre un desequilibrio (*i. e.* por acción de factores ambientales) se activarán la patogenicidad de la bacteria y

simultáneamente el o los sistemas defensivos de la planta (Schulz *et al.* 1999; Schulz y Boyle 2005).

2.1.4. Las semillas como fuente de endófitas

Muchas semillas parecen acarrear una diversidad de bacterias endófitas (Coombs y Franco 2003). La presencia natural de endófitas en semillas ha sido reportada superficialmente en semillas de arroz (Mano *et al.* 2006), de algodón y maíz (McInroy y Kloepper 1995), en óvulos y semillas antes de la germinación (Mundt y Hinkle 1976), en varias especies del género *Eucalyptus* (Ferreira *et al.* 2008). Bacterias metilótrofas de semillas de soya forman parte de la comunidad natural de las endófitas de semillas (Holland y Polaco 1994). Se piensa que siendo de origen seminal, las endófitas aseguran su presencia en la siguiente generación (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

Aunque la transmisión vertical de endófitas no se ha estudiado extensivamente, estudios recientes reportan bacterias endófitas de semillas de *Eucalyptus* que son verticalmente transmitidas hacia plántulas (Ferreira *et al.* 2008) y que muestran potencial como bacterias benéficas para las plantas.

2.1.5. Vías de entrada y proceso de colonización de las bacterias endófitas

A excepción de las endófitas transmitidas por semilla, las potenciales endófitas deben colonizar inicialmente la superficie externa para después entrar a la planta (McInroy y Kloepper 1995). Se considera que las potenciales endófitas llegan hasta sus hospederos por quimiotaxis, electrotaxis o por encuentro casual (Lodewyckx *et al.* 2002). La motilidad de bacterias asociadas con la rizósfera se ha descrito para distintos géneros bacterianos

como *Alcaligenes faecalis*, *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas fluorescens* (Bashan 1986; You *et al.* 1985). En la adhesión de *Alcaligenes faecalis* a las raíces de arroz se pueden distinguir tres pasos: a) adsorción sobre la raíz de la planta, este es un proceso rápido pero con interacción débil entre la bacteria y el hospedero, b) anclaje sobre la superficie de la raíz lo cual se establece a través de una fuerte interacción bacteria-hospedero y c) colonización de la superficie radicular con algunas células penetrando a las raíces (You *et al.* 1995).

Las principales vías de entrada de las bacterias endófitas son las heridas que ocurren de manera natural como resultado del crecimiento de la planta o a través de pelos radicales y espacios intercelulares de la epidermis (Sprent y de Faria 1988). Dong *et al.* (2003), encontraron que células de *Klebsiella sp/strain Kp342* forma agregados y penetran a través de las uniones de raíces laterales de trigo y alfalfa. Además de constituir vías de acceso, las heridas son sitios de alta exudación que sirven como fuente de nutrientes para las bacterias (Gagné *et al.* 1987; Lodewyckx *et al.* 2002).

Algunas observaciones han mostrado la penetración activa de bacterias endófitas. La imbibición de las semillas también parece facilitar la penetración de endófitas (Quadt-Hallmann y Kloepper 1996) a través de la acción celulasas y pectinasas producidas por diversas bacterias endófitas, entre ellas *Azoarcus sp* (Hurek *et al.* 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas y Kaiser 1991) y *Pseudomonas fluorescens* (Duijff *et al.* 1997; Quadt-Hallmann *et al.* 1997). La degradación de las paredes celulares de las plantas por estas bacterias parece ser necesaria únicamente para acceder a la epidermis de las raíces pero no para colonizar los espacios intercelulares del tejido cortical. Esto sugiere que las bacterias

endófitas inducen la producción de celulasas y pectinasas específicamente para penetrar a la planta hospedera, sin embargo poco se sabe del origen y regulación de dichas enzimas.

Al parecer las endófitas que colonizan las raíces son reclutadas de las poblaciones rizosféricas. Germida *et al.* (1998) encontraron que las poblaciones endofíticas eran menos diversas que las poblaciones del rizoplaneo y que las endófitas parecían originarse de las últimas. De manera similar, Siciliano *et al.* (1998) encontraron que las poblaciones de bacterias endófitas de raíces aisladas de canola y trigo representaban un subconjunto de la comunidad rizosférica (Lodewyckx *et al.* 2002). Además de la estrecha relación entre las poblaciones endofíticas y las rizosféricas se observó que las bacterias endófitas pueden ser facultativas dado que pueden sobrevivir como bacterias rizosféricas (Lodewyckx *et al.* 2002).

Aunque la zona radicular ofrece el sitio más obvio para la entrada de las bacterias endófitas, la parte aérea ofrece también entradas naturales factibles de penetrar. Sharrock (1991) sugiere que algunas poblaciones endofíticas presentes en los frutos pueden haber penetrado inicialmente a través de las flores. También se cree que otras aberturas naturales como estomas y lenticelas son vías de entrada para las bacterias endófitas (Kluepfel 1993). Otra forma de penetración de endófitas muy distinta consiste en la transmisión de las bacterias a través de insectos vectores. En caña de azúcar, Ashbolt e Inkerman (1990) y Kluepfel (1993) reportan la entrada de bacterias endófitas a través de insectos chupadores (áfidos).

Una vez que las bacterias entran a las plantas se pueden mantener ubicadas en ciertos tejidos específicos (*i.e.* zona cortical de la raíz) o distribuirse de forma sistémica en toda la planta por transporte o migración activa a través de los elementos conductores del

apoplasto (Hurek *et al.* 1994; James *et al.* 1997; Quadt-Hallmann *et al.* 1997). Compant *et al.* (2005) encontraron que la distribución sistémica de una cepa endófitas de *Burkholderia* sp., hacia las partes aéreas de *Vitis vinifera* parece ser vía la corriente de transpiración.

También se sugiere que los mecanismos de distribución de las endófitas dentro de las plantas son el producto de las interacciones bacterianas o de la repartición del hábitat debida a las necesidades inherentes a las poblaciones bacterianas que les permiten hacer uso de diferentes hábitats, por ejemplo, tejidos o espacios intercelulares (Di Fiori y Del Gallo 1995). La colonización intracelular no es común en las bacterias endófitas sino que se considera más bien ocasional. Solo en el caso particular de *Rhizobium* spp. o *Alcaligenes faecalis* (You *et al.* 1989; 1991) las bacterias se encuentran envueltas en estructuras especializadas de la planta.

El hecho de que las bacterias tengan la capacidad de colonizar y establecerse en el interior de las plantas puede representar ventajas ecológicas respecto a las bacterias del rizoplano o filoplano. Se considera que el interior de los tejidos vegetales provee de un ambiente protector a las endófitas tanto de factores ambientales adversos como de la competencia con otros microorganismos o la depredación por protozoarios en el suelo. No obstante, existen otros factores que limitan el establecimiento de poblaciones de bacterias endófitas en el interior de los tejidos vegetales (Lodewyckx *et al.* 2002).

2.1.6. Espectro bacterias endófitas y especies vegetales

Hongos y bacterias son los microorganismos endófitos más comunes. Otras formas microbianas como micoplasmas, rickettsias y arqueobacterias también podrían presentarse como endófitos e incluso se sugiere que este último grupo de formas microbianas podrían

constituir una gran proporción de las comunidades endofíticas, sin embargo, no se han caracterizado debido en gran parte a que no se ha logrado su cultivo por técnicas convencionales (Strobel 2007). Hasta hace unos años el espectro de bacterias endófitas conocidas correspondía a formas cultivables pero actualmente el uso de técnicas cultivo-independientes ha enriquecido notablemente el conocimiento algunas especies y ha permitido realizar análisis de la composición y función de las comunidades endofíticas.

Las bacterias endófitas han sido aisladas de monocotiledóneas, dicotiledóneas, gimnospermas abarcando una amplia gama de plantas cultivadas (Sturz *et al.* 2000) y prácticamente en todos los órganos vegetales, en frutos, tallos, raíces (Fry y Milholland, 1990; Misaghi y Donndelinger 1990) y semillas (Mano *et al.* 2006; Mundt y Hinkle 1976). De lo anterior se ha establecido el carácter ubicuo de las bacterias endófitas (Lodewyckx *et al.* 2002). Información adicional de la omnipresencia de bacterias endófitas se ha obtenido de trabajos con plantas en cultivo de tejidos en donde la fuerte asociación endófitas-plantas suele dificultar la obtención de plantas libres de microorganismos (Ulrich *et al.* 2008). Se presume que en las excepciones la aparente ausencia de endófitas se debe a que tales microorganismos son de difícil aislamiento o cultivo (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

Los trabajos más extensos sobre los tipos de bacterias endófitas fueron realizados por Mundt y Hinkle (1976) y McInroy y Kloepper (1995). Los primeros autores encontraron un número significativo de morfotipos bacterianos (395) en óvulos y semillas de 27 especies vegetales. Por su parte, McInroy y Kloepper (1995) demostraron que tan solo dos especies vegetales pueden presentar una gama considerable de morfotipos bacterianos endófitos.

La mayoría de las bacterias endófitas han sido obtenidas de las raíces debido a que muchas de las bacterias provienen del ambiente rizosférico. Schultz y Boyle (2007) hizo una revisión de endófitas de raíz de plantas cultivadas y encontró cerca de 220 especies repartidas en 71 géneros entre los cuales dominaban los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*. Otro género frecuente es *Burkholderia* (Lodewyckx *et al.* 2002).

El espectro de bacterias endófitas es bastante amplio y la gran mayoría corresponden a bacterias no patógenas. En general, las especies Gram negativas predominan sobre las Gram positivas (Hallmann *et al.* 1997; Rosenblueth y Martínez-Romero 2006). La Tabla 5 enlista algunas endófitas y las especies vegetales de donde fueron aisladas.

Tabla 5 Ejemplos de bacterias endófitas y las especies vegetales que las albergan.

| Endófitas | Especie vegetal | Referencia |
|---|---|--|
| α Proteobacteria | | |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | Arroz | Engelhard <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | Plátano | Weber <i>et al.</i> 1999 |
| <i>Azospirillum amazonense</i> | Plátano, piña | Weber <i>et al.</i> 1999 |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | Arroz | Chantreuil <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | Caña de azúcar, café | Cavalcante y Döbereiner 1988; Jiménez-Salgado <i>et al.</i> 1997 |
| <i>Methylobacterium mesophilicum</i> | Cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Methylobacterium extorquens</i> | Pino Scot, cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2002; Pirttilä <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Arroz | Yanni <i>et al.</i> 1997 |
| <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium</i>) | Zanahoria, arroz | Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | Papa dulce | Reiter <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ^a | Arroz | Engelhard <i>et al.</i> 2000 |
| β Proteobacteria | | |
| <i>Azoarcus</i> sp. | Zacate Kallar, arroz | Engelhard <i>et al.</i> 2000; Reinhold-Hurek <i>et al.</i> 1993 |
| <i>Burkholderia pickettii</i> ^a | Maíz | McInroy y Kloepper 1995 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> ^b | Lotus amarillo, cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2001; Barac <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Burkholderia</i> sp. | Plátano, piña, arroz | Weber <i>et al.</i> 1999; Engelhard <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> ^a | Arroz | Phillips <i>et al.</i> 2000 |
| <i>Herbaspirillum seropedicae</i> | Caña de azúcar, arroz, maíz, sorgo, plátano | Olivares <i>et al.</i> 1996; Weber <i>et al.</i> 1999 |
| <i>Herbaspirillum rubrisulbalbicans</i> | Caña de azúcar | Olivares <i>et al.</i> 1996 |

Tabla 5 Continuación
 y **Proteobacteria**

| | | |
|--|---|---|
| <i>Citrobacter</i> sp. | Plátano | Martínez <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Enterobacter</i> spp. | Maíz | McInroy y Kloepper 1995 |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> ^a | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> ^a | Cítricos, maíz | Araujo <i>et al.</i> 2002; Hinton <i>et al.</i> 1995 |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> ^a | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | Papa dulce | Asis y Adachi 2003 |
| <i>Erwinia</i> sp. | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Escherichia coli</i> ^b | Lechuga | Ingham <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Klebsiella</i> sp. | Trigo, papa dulce, arroz | Engelhard <i>et al.</i> 2000; Iniguez <i>et al.</i> 2004; Reiter <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Klebsiella variicola</i> | Plátano, arroz, maíz, caña de azúcar | Rosenblueth <i>et al.</i> 2004. |
| <i>Klebsiella terrigena</i> | Zanahoria | Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> ^b | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Pantoea</i> sp. | Arroz, soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004; Verma <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Pantoea agglomerans</i> | Cítricos, papa dulce | Araujo <i>et al.</i> 2001, 2002; Asis y Adachi 2003 |
| <i>Pseudomonas chlororaphis</i> | <i>Tagetes</i> spp., zanahoria | Sturz y Kimpinski 2004; Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Pseudomonas putida</i> ^a | Zanahoria | Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Zanahoria | Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Pseudomonas citronellolis</i> | Soya | Kuklinsky-Sobral <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Pseudomonas synxantha</i> | Pino Scot | Prittilä <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Salmonella enterica</i> ^b | Alfalfa, zanahoria, rábano, tomate | Cooley <i>et al.</i> 2003; Guo <i>et al.</i> 2002; Islam <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Serratia</i> sp. | Arroz | Sandhiya <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Serratia marcescens</i> ^a | Arroz | Gyaneshwar <i>et al.</i> 2001 |
| <i>Stenotrophomonas</i> ^a | Pastos de dunas: <i>Ammophila arenaria</i> y <i>Elymus mollis</i> | Dalton <i>et al.</i> 2004 |
| Firmicutes | | |
| <i>Bacillus</i> spp. | Cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2001, 2002 |
| <i>Bacillus megaterium</i> | Maíz, zanahoria, cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2001; McInroy y Kloepper 1995; Surette <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Clostridium</i> | Pasto <i>Miscanthus sinensis</i> | Miyamoto <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Paenibacillus odorifer</i> | Papa dulce | Reiter <i>et al.</i> 2003 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^b | Zanahoria | Surette <i>et al.</i> 2003 |
| Bacteroidetes | | |
| <i>Sphingobacterium</i> sp. ^a | Arroz | Phillips <i>et al.</i> 2000 |
| Actinobacteria | | |
| <i>Arthrobacter globiformis</i> | Maíz | Chelius y Triplett 2000 |
| <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | Cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Kocuria varians</i> | <i>Tagetes</i> sp. | Sturz y Kimpinski 2004 |
| <i>Microbacterium esteraromaticum</i> | <i>Tagetes</i> sp. | Sturz y Kimpinski 2004 |
| <i>Microbacterium testaceum</i> | Maíz | Zinniel <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Mycobacterium</i> sp. ^b | Trigo, pino Scot | Conn y Franco 2004; Prittilä <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Nocardia</i> sp. ^b | Cítricos | Araujo <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Streptomyces</i> | Trigo | Coombs y Franco 2003 |

^a Patógena humana oportunista, ^b Patógena humana común. Basado en Rosenblueth y Martínez-Romero (2006).

Entre la gran mayoría de bacterias endófitas aisladas, solo una pequeña proporción corresponde a las bacterias diazotróficas (Barraquío *et al.* 1997; Martínez *et al.* 2003). Poblaciones bacterianas diazotróficas fijan nitrógeno atmosférico y lo convierten en formas asimilables por las plantas. Básicamente se distinguen dos grupos, las bacterias noduladoras que típicamente establecen relaciones simbióticas con leguminosas y las no-formadoras de nódulos que han sido aisladas principalmente de monocotiledóneas como la caña de azúcar *Saccharum* spp, el arroz *Oryza sativa*, el trigo *Triticum aestivum*, sorgo *Sorghum bicolor*, maíz *Zea mays* y diversos pastos tropicales. Entre las bacterias aisladas de estas plantas se encuentran los géneros *Herbaspirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Azospirillum* y *Acetobacter* (Baldani *et al.* 1997; James y Olivares, 1998; Reinhold-Hurek y Hurek 1998).

El caso de las endófitas diazotróficas es quizá el mejor ejemplo de preferencia por el hospedero (Carrol 1999). Elbeltagy *et al.* (2001) encontraron que las tasas de fijación de nitrógeno de *Herbaspirillum* sp. en plantas de arroz dependían de la especie vegetal sugiriendo que una preferencia por hospedero semejante a la que se observa entre *Rhizobium* spp. y leguminosas (Perret *et al.* 2000). Aparte de este ejemplo, se conocen muy pocos casos en donde se exista una fuerte especificidad de las bacterias por alguna especie vegetal. De manera indirecta se han encontrado bacterias endófitas (*Glomeribacter gigasporarum*) viviendo dentro de hongos micorrícicos que establecen relaciones simbióticas con plantas superiores (Jargeat *et al.* 2004).

Aunque la presencia de bacterias endófitas en plantas ha sido registrada en un amplio rango de plantas cultivadas, sin embargo, la información en plantas silvestres es todavía muy limitada. En zonas áridas, el único reporte que se tiene es de Puente (2004), quien obtuvo bacterias cultivables del rizoplasma y endófitas del cactus columnar

Pachycereus pringlei encontrando entre las endófitas representantes de los géneros *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas putida* y *Staphylococcus* spp.

2.1.7. Niveles de abundancia de bacterias endófitas cultivables

A pesar de las diferencias en los métodos de obtención y cultivo de las bacterias endófitas, se ha visto que en general las bacterias endófitas se presentan en densidades poblacionales más bajas que las bacterias rizosféricas o que las bacterias patógenas (Hallmann *et al.* 1997; Rosenblueth y Martínez-Romero 2006). En general la densidad de población depende del tipo de especie bacteriana, del genotipo y etapa fenológica del hospedero, así como de las condiciones ambientales a las cuales se encuentra expuesto el hospedero (Pillay y Nowak 1997; Tan *et al.* 2003).

Tsiantos y Stevens (1986) registraron que los niveles de la bacteria patógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* en tomate oscilaban entre 1×10^9 a 1×10^{10} UFC/g peso fresco de tomate. Contrario a estas grandes cifras, las poblaciones endófitas generalmente oscilan entre 1×10^3 y 1×10^5 UFC/g de peso fresco de planta (Dong *et al.* 1994; Quadt-Hallmann y Kloepper 1996); Lamb *et al.* 1996).

Las más altas densidades bacterianas suelen encontrarse en las raíces y disminuyen progresivamente hacia el tallo y las hojas (Quadt-Hallmann y Kloepper 1996). Este hecho apoya la hipótesis de que las raíces son el principal sitio de entrada de las endófitas (Lodewyckx *et al.* 2002).

2.1.8. Procedimientos para la detección, aislamiento y cultivo de bacterias endófitas

Los procedimientos más comunes para la obtención de bacterias endófitas combinan técnicas de esterilización de los tejidos seguidas, ya sea de maceración del tejido vegetal y su posterior siembra en medio de cultivo, o el cultivo de pequeños segmentos de tejido en medio nutritivo y alternativamente se utilizan técnicas basadas en el uso de vacío para extracción de savia (Hallman *et al.* 2006).

2.1.9. Técnicas de desinfección superficial para obtención de bacterias endófitas

Las técnicas de desinfección son un punto clave en la obtención de bacterias endófitas puesto que la propia definición de este tipo de microorganismos lleva implícita la aplicación de técnicas de desinfección a los tejidos vegetales para la extracción de bacterias de su interior (Hallmann *et al.* 1997).

En teoría la técnica de desinfección debe ser lo suficiente fuerte como para eliminar cualquier organismo de la superficie del tejido pero sin dañar el tejido vegetal y las endófitas. Aunque esto no siempre se logra debido a que el agente desinfectante suele penetrar el tejido, existen procedimientos generales para la desinfección de tejidos los cuales involucran: 1) Riguroso lavado del tejido vegetal con agua corriente para eliminar, en el caso de las raíces, partículas de suelo adheridas al tejido de interés, 2) pretratamiento opcional para eliminar sustancias hidrofóbicas de la superficie del tejido y para proveer mejor acceso del agente desinfectante al tejido, 3) Desinfección (con agitación) para eliminar los colonizadores remanentes sobre la superficie el tejido, 4) Enjuagues con

soluciones de lavado estériles bajo condiciones de esterilidad y 5) Verificación del procedimiento de desinfección (Hallman *et al.* 2006).

En el paso 2, los agentes surfactantes más utilizados son el Tween 20 (Mahafee *et al.* 1997), Tween 80 (Sturz 1995), o Triton X-100 (Misaghi y Donndelinger 1990) los cuales se pueden agregar al agente desinfectante para reducir la tensión superficial de manera que éste último pueda penetrar los nichos y ranuras entre las células epidérmicas (Hallmann *et al.* 1997).

En el paso tres, los agentes desinfectantes más utilizados son hipoclorito de sodio (Gardner *et al.* 1982; Quadt-Hallmann *et al.* 1997; Schulz *et al.* 1993; Miché y Balandreau 2001), etanol (Dong *et al.* 1994), peróxido de hidrógeno (McInroy y Kloepper, 1994; Misaghi y Donndelinger 1990) y ocasionalmente vapor de óxido de propileno (Sardi *et al.* 1992). Por razones de salud humana, el cloruro de mercurio se sugiere solo para casos en los que el tejido vegetal no puede someterse a un procedimiento de desinfección convencional (O'Dell y Trappe 1992; Sriskandarajah *et al.* 1993), como en los casos de tejidos frágiles o muy permeables.

Los tiempos de incubación con los diferentes agentes desinfectantes son variables porque dependen del grado de lignificación del tejido a desinfectar. En general los tiempos para el hipoclorito de sodio a bajas concentraciones (1-3.5%) oscilan entre 1-6 minutos (McInroy y Kloepper 1995; Coombs y Franco 2003), para el etanol se manejan concentraciones mayores al 70% y tiempos máximos de 1 minuto (Gardner 1982; Coombs y Franco 2003). Es factible la aplicación de más de un agente desinfectante (Hallman *et al.* 2006) y la escisión de la capa superficial del tejido, por ejemplo la capa leñosa de raíces (Reiter *et al.* 2002). En cuanto a los enjuagues, estos son llevados a cabo después de la

aplicación del agente desinfectante y surfactante (Hallman *et al.* 2006; Miché y Balandreau 2001).

Al final del procedimiento de desinfección se debe verificar la esterilidad superficial del tejido. Esto se puede conseguir: 1) Imprimiendo la superficie del tejido sobre medio de cultivo (Shishido *et al.* 1995; Schulz *et al.* 1998), 2) Inoculando alícuotas del cultivo en medio de cultivo (McInroy y Kloepper 1994) o 3) Colocando trozos del tejido en medio de cultivo (Gagné *et al.* 1987). El procedimiento se considera efectivo cuando no se presenta crecimiento microbiano.

2.1.10. Cultivo del material vegetal en medio de cultivo

En el caso de bacterias, la técnica más eficiente es la maceración del tejido. Alternativamente, en los casos en que se desea evitar el uso de desinfección química se utiliza la centrifugación (Boyle *et al.* 2001) o la extracción por vacío (Hallmann *et al.* 1997), para colectar el fluido intercelular (apoplástico) y de los vasos conductores. En teoría la maceración de tejidos puede recuperar endófitas presentes en el tejido cortical, vascular, en espacios intercelulares así como colonizadores intracelulares (Hallman *et al.* 2006).

Entre los más utilizados para el cultivo de bacterias endófitas se encuentran medios generales como soya tripticasa (Gardner *et al.* 1982), la cual soporta un amplio rango de bacterias o caldo nutritivo (Zinniel *et al.* 2002), medio SC, útil para bacterias difíciles de crecer (McInroy y Kloepper 1995) y medios más específicos como medio King para *Pseudomonas* (Misaghi y Donndelinger 1990). Entre los medios selectivos, los medios libres de nitrógeno (Rennie 1981) son utilizados para el aislamiento de endófitas

diazotróficas (Hartmann *et al.* 2000), el medio Henderson (Henderson y Duff 1963) y medio Pikoskaya (Pikoskaya 1948) medio específico utilizado para el aislamiento de bacterias solubilizadoras de fosfatos.

2.1.11. Detección de bacterias endófitas por métodos cultivo-independientes

El estudio de bacterias endófitas se ha basado tradicionalmente en el aislamiento de bacterias cultivables, sin embargo los métodos cultivo-dependientes subestiman la cantidad de microorganismos debido a que no recuperan microorganismos no-cultivables, tales como bacterias biotróficas obligadas o microorganismos que requieren condiciones de cultivo desconocidas. Las nuevas técnicas de biología molecular no requieren el cultivo de bacterias, el estudio es abordado mediante el análisis de secuencias del 16S rRNA partir del aislamiento de ADN proveniente de tejidos vegetales (Chelius y Triplett 1999; Conn y Franco 2004).

También a través del uso de regiones conservadas del rRNA se puede realizar la detección de procariotes por hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En su formato general, la hibridación *in situ* utiliza sondas de oligonucleótidos etiquetados con fluorescencia para la detección de regiones específicas del 16S rRNA dentro de células procarióticas (Daims *et al.* 2005)

2.1.12. Aplicaciones de las bacterias endófitas

Debido a la estrecha relación que se establece entre las plantas y las bacterias endófitas, se han aprovechado los efectos de las bacterias endófitas primordialmente, en el mejoramiento de la producción de plantas bajo sistemas de cultivo. Los efectos positivos

más conocidos son: estimulación del crecimiento vegetal a través la fijación de nitrógeno (Hurek *et al.* 2002; Cocking 2003), secreción de reguladores del crecimiento vegetal (Bastian *et al.*, 1998), protección contra la infección de microorganismos fitopatógenos (Chen *et al.* 1995; Benhamou *et al.* 1996; Ryu *et al.* 2004), protección contra insectos (Azevedo *et al.* 2000), producción de sideroforos y solubilización de minerales (Puente *et al.* 2004), los cuales se abordan con detalle en el capítulo III.

Actualmente se están explorando otras aplicaciones de los microorganismos endófitos en la fitoremediación. Algunas bacterias endófitas han mostrado capacidad natural para degradación xenobiótica (Ryan *et al.* 2008). Siciliano *et al.* (2001) encontraron que algunas plantas creciendo en suelos contaminados con xenobióticos albergan poblaciones endófitas las cuales presentan genes encargados de la degradación de contaminantes, en particular compuestos nitro-aromáticos. Van Aken *et al.* (2004) también encontraron que una cepa fitosimbiótica de *Methylobacterium* sp. aislada del olmo *Populus deltoides*×*nigra*, fue capaz de degradar numerosos compuestos nitro-aromáticos como el 2,4,6-trinitrotolueno. Este conocimiento se ha llevado a otros campos en donde cepas genéticamente elaboradas para resistencia a metales, como el níquel (Lodewyckx *et al.* 2001) incrementan la bioacumulación y tolerancia a este elemento en plantas inoculadas con dichas endófitas.

Existe una diversidad considerable de metabolitos secundarios producidos por bacterias endófitas, sin embargo no se han caracterizado a profundidad. La producción de bioplásticos (poli-3-hidroxiбутирато, PHPB) se ha considerado una aplicación potencial de *Herbaspirillum seropedicae*. Catalán *et al.* (2007) encontraron que esta bacteria endófitas y

diazotrófica acumula niveles significativos de PHB creciendo con diferentes fuentes de carbono. El diseño y desarrollo de sistemas de bacterias y plantas superiores capaces de acumular PHAs (poli-3-hidroxialcanoato) o PHBs podría ayudar a reducir los costos en la producción de nuevos heteropolímeros, cuyas aplicaciones son muy variadas (Aldor y Keasling 2003).

En el campo de la medicina humana, nuevos fármacos, antibióticos, antimicóticos, inmunosupresores y compuestos contra el cáncer son únicamente algunos ejemplos de compuestos activos producidos por microorganismos endófitos (Strobel *et al.* 2007). Entre los géneros más comunes de bacterias endófitas, las *Pseudomonas* spp., producen una gran cantidad de metabolitos secundarios entre los que se han aislado antibióticos. Las ecomicinas, son una nueva familia de antibióticos de naturaleza lipopéptica que actúa contra hongos como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* y son producidas por *Pseudomonas viridiflava*, ésta bacteria se asocia con las hojas de diversas especies de pastos y se le ha localizado tanto en el filoplano como en el interior de tejidos (Miller *et al.* 1998).

2.1.13. Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGBP) y bacterias degradadoras de rocas

Entre los efectos benéficos de las bacterias asociadas a las plantas, la promoción del crecimiento vegetal es de los más reconocidos (Bashan y Levanoy 1990). La contribución de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal conocidas como PBPB (por sus siglas en inglés) se atribuye a diversas capacidades fisiológicas de las bacterias. Entre los efectos directos se reconoce la fijación de nitrógeno (Holguin y Bashan 1996), la solubilización de

fosfatos (Illmer y Schinner 1995; Illmer *et al.* 1995), la degradación de rocas con la consecuente movilización de nutrientes para las plantas (Puente *et al.* 2004) y la producción de fitohormonas y otras sustancias que mejoran la tolerancia de las plantas a condiciones ambientales estresantes como salinidad y toxicidad por metales y plaguicidas (Bashan y Holguin 1997).

El papel de la fijación de nitrógeno bacteriana para beneficio de las plantas es bien conocido puesto que las plantas no pueden realizar este proceso. La capacidad de las bacterias para fijar N_2 atmosférico se mide a través del crecimiento de bacterias en medios que carecen de compuestos nitrogenados y cuantitativamente por la reducción de acetileno que indirectamente expresa la actividad de la nitrogenasa (Sprent y Sprent 1990).

En cuanto a las bacterias que movilizan nutrientes del sustrato a las plantas, se ha observado que éste proceso se realiza a través de la producción de ligandos que solubilizan principalmente fosfatos (Bormann *et al.* 1998). En muchas ocasiones, la solubilización de fosfatos de calcio, fierro y aluminio puede proveer del fósforo necesario para las plantas (Klumar y Narula 1999) debido a que las formas fosfatadas son abundantes en la mayoría de ambientes, aunque como tal no son disponibles para las plantas (Babenko *et al.* 1984; Watteau y Berthelin 1990).

En los escasos estudios de bacterias asociadas a plantas de zonas áridas, Puente (2004) encontró que algunas bacterias endófitas de cardón *Pachycereus pringlei* poseen capacidad de disolver fosfatos y transformar el fósforo en formas asimilables para las plantas. Asimismo, encontró cepas de bacterias endófitas con capacidad para degradar roca y fijar nitrógeno atmosférico sugiriendo que estas capacidades fisiológicas pueden estar relacionadas con el establecimiento de plantas en rocas.

2.2. JUSTIFICACIÓN

Gran parte del conocimiento de organismos endofíticos se ha enfocado al estudio de hongos de plantas cultivadas. En el caso de las bacterias se atribuye un carácter ubicuo a la presencia de las bacterias endófitas en las plantas. Sin embargo se desconoce si esto aplica igualmente para especies silvestres y por lo tanto también se desconoce si las bacterias endófitas de especies silvestres de ambientes extremos como las halófitas o xerófitas tienen algún papel en la adaptación de las plantas a dichos ambientes. Tan solo el conocimiento y obtención de bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento de plantas silvestres constituye nuevas opciones de inoculantes para plantas cultivadas.

A partir de estudios previos acerca de las endófitas de plantas desérticas se ha encontrado que dichas bacterias muestran capacidad para disolver minerales y para incrementar el crecimiento de la planta. De esta manera se ha comenzado a dilucidar, desde el punto de vista microbiológico, el papel de las bacterias endófitas en el establecimiento de algunas plantas en el desierto Sonorense.

La presente investigación pretende proveer elementos que sirvan para explicar el éxito de plantas colonizadoras de rocas a través del estudio de bacterias endófitas con capacidad de promover el crecimiento vegetal y/o degradar rocas. Se ha seleccionado a la cactácea *M. frailena* por su capacidad para colonizar rocas en el sur del Desierto Sonorense. De acuerdo con Strobel (2007), las plantas con algún grado de endemismo o provenientes de ambientes con una configuración especial, en este caso zonas áridas, presentan estrategias de adaptación que se pueden asociar con características singulares de sus organismos endófitos.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo General

Verificar la presencia natural de bacterias endófitas en la cactácea *Mammillaria fraileana* y obtener bacterias cultivables con potencial para fijar nitrógeno y/o degradar rocas.

2.3.2. Objetivos específicos

- Detectar la presencia natural de bacterias endófitas cultivables en tallos, raíces, frutos y semillas de *M. fraileana*.
- Cuantificar la abundancia de bacterias endófitas cultivables en tallo, raíz, frutos y semillas de *M. fraileana*.
- Verificar la presencia natural de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de *M. fraileana*.
- Detectar y cuantificar la abundancia de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de *M. fraileana*.
- Obtener, aislar e identificar cepas bacterianas de endófitas cultivables de *M. fraileana*.
- con potencial para fijar nitrógeno.
- Obtener, aislar e identificar, cepas bacterianas de endófitas cultivables de *M. fraileana*.
- con potencial para solubilizar fosfatos y/o degradación de rocas.

2.4. HIPÓTESIS

Hipótesis I: Referente a la presencia natural de bacterias endófitas en la cactácea *M. fraileana*.

Si la presencia de bacterias endófitas ha sido comprobada para una gran diversidad de especies vegetales, entonces también se puede detectar la presencia de bacterias endófitas en *Mammillaria fraileana*.

- **Hipótesis II: Referente a las cepas bacterianas de endófitas cultivables de *M. fraileana*. con potencial para fijar nitrógeno.**
- La capacidad de algunas bacterias endófitas de *M. fraileana* para crecer en medio libre de nitrógeno y para reducir acetileno indicarán que las bacterias son fijadoras de nitrógeno atmosférico.
- **Hipótesis III: Referente a las bacterias cultivables con potencial para disolver formas químicas de fosfatos y para degradar rocas.**

Algunas bacterias endófitas cultivables de *M. fraileana* tendrán la capacidad de solubilizar fosfatos lo cual estará determinado por la cantidad de fósforo liberado *in vitro*.

Algunas bacterias endófitas cultivables de *M. fraileana* tendrán potencial para degradación de rocas. Esto se manifestará en una disminución del pH del medio, lo cual será acompañado por un aumento en el número de partículas de roca de menor tamaño y una disminución en el número de las partículas más grandes.

2.5. MÉTODOS

2.5.1. Obtención de bancos de semilla

Se realizaron colectas a lo largo de los años 2004 a 2008, especialmente después de los periodos de lluvias de verano y algunos de invierno, ello debido a que la ocurrencia de lluvias es un factor que parece desencadenar la floración y fructificación.

Extracción de semillas

La extracción de semillas se realizó mediante la compresión de los frutos. Las semillas se separaron de la pulpa mediante lavados en agua corriente, hasta que el agua de lavado perdió la consistencia mucilaginosa típica de la pulpa. En el proceso se eliminaron las semillas que flotaron en la solución de lavado pues se consideraron con baja o nula viabilidad. Las semillas fueron secadas a temperatura ambiente y posteriormente almacenadas en refrigeración (4°C).

2.5.2. Detección, cuantificación y aislamiento de bacterias endófitas de tallos, raíces, frutos y semillas de *M. fraileana*

2.5.2.1. Endófitas cultivables de frutos y semillas

Se desinfectaron 8 frutos de la siguiente manera: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) 10 enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 3% durante 5 minutos, d) 5 enjuagues con agua destilada estéril, e) 5 enjuagues con Tiosulfato de sodio al 2% y finalmente f) Abundantes enjuagues con agua destilada estéril. En condiciones de esterilidad, la pulpa o masa funicular y las semillas, fueron homogenizadas en 1 mL *PBSNa* (pH 6.2, 0.002 M). El homogenizado fue colocado

en 10 mL de caldo nutritivo e incubado en agitación durante 24 h a 130 rpm a 30°C. Las diluciones 1×10^0 a 1×10^{-6} del homogenizado con crecimiento primario fueron inoculadas por extensión en placa en cajas Petri conteniendo Agar nutritivo. Se realizaron tres replicas de cada caja Petri y un testigo negativo que consistió en *PBS* y otro testigo positivo que consistió en tres frutos lavados únicamente con *PBS* pH 6.2 (0.2 M). Las cajas Petri fueron incubadas a 30 ± 1 ° C. Se hicieron observaciones periódicas hasta los 18 días de incubación.

2.5.2.2. Bacterias endófitas cultivables de frutos

Se desinfectaron 23 frutos de la siguiente manera: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) 10 enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 3% durante 5 minutos y d) 10 enjuagues con agua destilada estéril. En condiciones de esterilidad, la masa funicular de cada uno de 10 frutos fue extraída y colocada directamente en cajas Petri con agar nutritivo. La masa funicular de otro grupo de 10 frutos fue colocada individualmente en cajas Petri conteniendo agar soya tripticasa. Los tres frutos restantes fueron colocados en cajas con agar soya tripticasa para verificar el éxito del tratamiento de desinfección. Las cajas Petri fueron incubadas a 36°C y monitoreadas periódicamente hasta los 15 días de incubación.

2.5.2.3. Bacterias endófitas cultivables de semillas

1) Se desinfectó 0.1g de semillas de la siguiente manera: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) 10 enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 3% durante 5 minutos y d) Diez enjuagues con agua destilada estéril. Para verificar el éxito del tratamiento de higienización semillas individuales fueron

colocadas en cajas Petri conteniendo agar soya tripticasa e incubadas a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta por un mes. Las semillas fueron homogenizadas en 1 mL *PBSK* pH 6.2, 0.002 M. Del homogenizado, 900 μL fueron colocados en 10 mL de caldo nutritivo y se mantuvo en agitación hasta 15 días a 130 rpm a 30°C . Paralelamente se inocularon por extensión en placa cajas Petri con agar soya tripticasa utilizando 50 μL del homogenizado desde la dilución 1×10^0 a 1×10^{-6} . La siembra se hizo por triplicado, considerando un testigo negativo que consistió en *PBS* pH 6.2 0.002 M. *PBS*. Las cajas Petri fueron incubadas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$. Se hicieron observaciones semanales hasta 30 días de incubación.

2) Un lote de 0.35 g de semillas se desinfectó de la siguiente manera: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 30 minutos, b) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 1.5 % durante 5 minutos, d) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, e) un minuto con alcohol etílico 100 %. Se dejaron secar las semillas durante dos horas en campana de flujo laminar. Para verificar que el tratamiento de desinfección fue exitoso, un grupo de 50 semillas fue colocado en caldo de soya tripticasa e incubado en agitación a 130 rpm, a 36°C hasta por 30 días, durante los cuales se hicieron observaciones periódicas de frotis del medio para detectar crecimiento bacteriano. El resto de las semillas fue homogenizada en 4 mL *PBS* pH 7.2 0.002 M. Se tomó un volumen de 1 mL del homogenizado y se inoculó en un matraz conteniendo 25 mL de caldo de soya tripticasa. El cultivo se incubó en agitación durante 30 días a 130 rpm a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$.

2.5.2.4. Bacterias endófitas cultivables de plántulas

Se desinfectaron semillas de la siguiente manera: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) 10 enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución

de NaOCl al 3% durante 5 minutos, d) 5 enjuagues con agua destilada estéril, e) 5 enjuagues con Tiosulfato de sodio al 2% y finalmente f) Abundantes enjuagues con agua destilada estéril. Las semillas fueron germinadas sobre agar nutritivo e incubadas en cámara de crecimiento a 25°C y fotoperiodo de 12 h. Se seleccionaron plántulas superficialmente estériles, es decir, que no mostraron algún tipo de crecimiento bacteriano en agar nutritivo.

En condiciones de esterilidad se tomaron 15 plántulas (peso fresco 0.094 g) y se homogenizaron en mortero con 5 mL de *PBS* pH 6.8, 0.006 M. El macerado se centrifugó a 2000 rpm durante 2 minutos. Del sobrenadante se hicieron diluciones seriadas en *PBS*, siendo inoculadas por extensión en cajas Petri con alguno de los siguientes ocho medios de cultivo: Agar Nutritivo, agar soya tripticasa, Medio Pikoskaya (Pikoskaya, 1948) suplementado con fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Hierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%), medio Henderson (Henderson y Duff. 1963) fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Hierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%) y Medio Rennie libre de nitrógeno. El control negativo consistió en cajas inoculadas con *PBS* pH 6.8, 0.006 M. Las cajas fueron incubadas a 30±1°C por un periodo de 30 días.

2.5.2.5. Presencia natural de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de *M.*

fraileana

2.5.2.5.1. Bacterias endófitas no-cultivables de semillas

Fue necesario verificar la presencia de bacterias no cultivables en semillas por dos razones: 1) Verificar si las semillas son fuente natural de endófitas y 2) Estimar el efecto

que pudieran tener las poblaciones naturales de endófitas en experimentos posteriores que abordaron el estudio de la interacción de bacterias inoculadas y las plantas (*Capítulo III*).

2.5.2.5.2. Detección y cuantificación de bacterias viables en semilla por tinción fluorescente

Se utilizó un lote de 0.30 g de semillas y se higienizó bajo campana de flujo laminar de acuerdo al siguiente procedimiento: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 30 minutos, b) 10 enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 1.5 % durante 5 minutos, d) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, e) 1 minuto con alcohol etílico absoluto. Se dejaron secar las semillas bajo condiciones de esterilidad ambiental. Para verificar que el tratamiento de desinfección fue exitoso, un grupo de 100 semillas fue colocado en caldo de soya tripticasa e incubado en agitación a 130 rpm, a 36°C hasta por 30 días durante los cuales se hicieron observaciones periódicas de frotis del cultivo para detectar crecimiento bacteriano.

El resto de las semillas fue sometido a tinción fluorescente de acuerdo al método de Söderström (1977). Las semillas (0.30 g) fueron maceradas en mortero de porcelana utilizando 7 mL de *PBSK* estéril, 0.002 M pH 7.2. Se dejó precipitar la fracción gruesa del tejido manteniendo en refrigeración la muestra durante una hora y posteriormente se tomó una alícuota de 20 µL del sobrenadante para diluir en 180 µL de *PBSK* estéril, 0.002 M pH 7.2, mezclándose con igual volumen de una dilución 1:100 de una solución de diacetato de fluoresceína FDA previamente preparado con 20 mg de FDA en 10 mL de acetona. Para la tinción se dejó incubar a temperatura ambiente y oscuridad durante 4 minutos. La solución de teñido se eliminó a través dos lavados, el primero consistió en centrifugación durante

tres minutos, desecho del sobrenadante y resuspensión del botón celular en *PBSK* estéril, 0.002 M pH 7.2, el segundo lavado fue semejante pero con tiempo de centrifugación de 1 min. El botón celular obtenido en éste último paso se resuspendió en *PBSK* estéril, 0.002 M pH 7.2 al volumen inicial de 200 μ L. De la muestra teñida se tomaron 4 réplicas. Una réplica consistió en un portaobjetos con un volumen de 15 μ L.

La detección y el conteo de bacterias viables se realizaron utilizando el objetivo 20 \times en microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BX41, filtro FITC). Las imágenes fueron capturadas con cámara digital (Evolution VF) y procesadas con analizador de imágenes Image Pro Plus 5.0. El conteo total de cada uno de 71 campos observados se utilizó para calcular posteriormente el número total de bacterias por gramo de semilla.

2.5.2.5.3. Detección de bacterias por Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

Se utilizaron alrededor de 50 semillas previamente higienizadas mediante el procedimiento del inciso anterior (inciso 2.5.4). Las semillas se dejaron secar bajo condiciones de esterilidad ambiental. Para verificar que el tratamiento de desinfección fue exitoso, un grupo de 40 semillas fue colocado en caldo de soya tripticasa e incubado en agitación a 130 rpm, a 36°C hasta por 30 días durante los cuales se hicieron observaciones periódicas de frotis del cultivo para detectar algún tipo de crecimiento bacteriano. La hibridación se realizó siguiendo el método propuesto por Daims *et al.* (2005).

Fijación de las semillas: Se utilizaron 10 semillas. Cada semilla fue presionada mecánicamente hasta extraer el interior de la semilla a lo que se denominó genéricamente embrión, los restos de la testa fueron removidos. Los embriones de semilla fueron fijados en 1mL de paraformaldehído frío, al 4% (PFA, Sigma) durante 2 horas. Posteriormente se

eliminó el PFA mediante dos lavados consistentes en inmersión de la muestra en *PBS*Na frío (pH 7.2, 0.002 M) durante 10 min.

Deshidratación de la muestra: Una vez fijados los embriones, se colocaron en portaobjetos previamente lavados con KOH (10% KOH w/v en 95% etanol) y cubiertos con una solución de gelatina (0.1% w/v gelatina, 0.01% w/v persulfato potásico de cromo) para mantener adherida la muestra durante todo el proceso. Se dejó secar la muestra durante 15 min. a temperatura ambiental. Para la deshidratación se sumergieron cuidadosamente los portaobjetos con el tejido del interior de la semilla adherido durante tres minutos en cada una de las concentraciones siguientes de alcohol etílico, 50%, 80% y 90%. Todos los pasos subsecuentes se realizan en oscuridad o condiciones mínimas de luz.

Tratamiento con lisozima: A cada muestra se le colocó un volumen de 10 μ L de lisozima (Sigma) (54000 U/mg) preparada a una concentración de 10 mg/mL. Se incubó la muestra en oscuridad durante 15-20 minutos. La lisozima se removió con micropipeta y enseguida se repitieron los pasos de deshidratación con alcohol etílico a concentraciones crecientes (50%, 80%, 90%) durante tres minutos cada una.

Hibridación: Se utilizó la sonda específica para el dominio *bacteria* EUB338 (Integrated DNA Technologies) (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3', Amman *et al.* (1990) marcada con el fluorocromo rojo CY3 (Máximo de excitación a 552 nm y Máx. de emisión a 565 nm). Se preparó la mezcla de hibridación con un volumen de 2 μ L de la sonda (a una concentración final de 3 ng μ L⁻¹) y 10 μ L del buffer de hibridación (preparación para 1mL con una astringencia de 15%: 180 μ L de NaCl 5 M+20 μ L de Tris-HCl 1 M+649 μ L de H₂Odd+150 μ L de formamida+1 μ L de SDS 10%). Enseguida se agregaron 12 μ L de la mezcla de hibridación a cada muestra de semilla. Los portaobjetos

conteniendo la muestra de semilla inmersa en la mezcla de hibridación fueron colocados horizontalmente y por separado en cámaras de hibridación (tubos corning de 50 mL) las cuales a su vez contenían toallas de papel humedecidas con el remanente de buffer de hibridación. Las cámaras de hibridación fueron entonces colocadas en el horno de hibridación VWR (Modelo 5430) e incubadas a 46°C durante 2 horas en oscuridad.

Lavado: Los portaobjetos con la muestra de semilla fueron retirados de las cámaras de hibridación y la mezcla de hibridación fue lavado mediante un pequeño volumen de buffer de lavado (3.18 mL de NaCl 5 M+1 mL de Tris-HCl 1 M y llevados a un volumen de 50 mL con H₂Odd) previamente calentado a 48 °C. Inmediatamente se sumergieron los portaobjetos con la muestra de semillas en solución de buffer de lavado mantenido en baño maría a 48 °C durante 15 minutos.

Enseguida se retiraron los portaobjetos del buffer de lavado y se da un lavado final con un volumen aproximado de 50 µL de H₂Odd enfriada a -14°C que se deja por 2-3 s. Se retira inmediatamente el H₂Odd de lavado con micropipeta para evitar que el tejido se desprenda del portaobjetos.

Finalmente se secaron cuidadosamente los portaobjetos con aire a presión y se dejaron en refrigeración o congelación dependiendo del tiempo tomado hasta su observación al microscopio.

Previo a su observación al microscopio, se adicionó una gota de protector de fluorescencia Citrifluor AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA). Las observaciones fueron realizadas con el objetivo 100× en el microscopio con

epifluorescencia (OLYMPUS BX41, filtro CY3), capturadas con cámara digital (Evolution VF) y procesadas con analizador de imágenes Image Pro Plus 5.0.

2.5.2.5.4. Detección de bacterias endófitas de semilla por Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las preparaciones de semillas analizadas previamente por FISH fueron utilizadas para observación por MEB. El pre-tratamiento para la MEB se realizó para lavar la solución de montaje *antifade* utilizada para la FISH y también con el propósito de deshidratar el tejido. Esto se consiguió mediante lavados en solución de alcohol etílico a concentraciones ascendentes (50%, 80% y 96%), durante cinco minutos en cada concentración. Las preparaciones fueron secadas con aire a presión y mantenidas en un recipiente con desecante hasta su observación. Las muestras fueron observadas al MEB (Hitachi S-3000N) y las micrografías fueron obtenidas con el software Quartz PCI (V 5.5).

Alternativamente se utilizaron semillas aplastadas para su observación en fresco y otras fueron recubiertas con tetróxido de Osmio (OsO_4) para verificar por MEB la presencia de bacterias endófitas de semilla. En ambos casos se utilizaron semillas desinfectadas superficialmente de acuerdo al procedimiento: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 30 minutos, b) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 1.5 % durante 5 minutos, d) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, e) 1 minuto con alcohol etílico absoluto. Se verificó la ausencia de bacterias cultivables en la testa mediante incubación de un grupo de semillas en caldo de soya tripticasa a 130 rpm, a 36°C durante una semana.

2.5.2.5.5. Detección de bacterias endófitas de semilla por amplificación del 16 sDNA

Se utilizaron 0.5 g de semillas higienizadas utilizando el método referido para MEB, tinción con FDA y FISH (inciso 2.5.4). Las semillas fueron almacenadas a -17 °C hasta el momento de su procesamiento.

Extracción de ADN: Todo el proceso de extracción se realizó en condiciones de esterilidad ambiental. El primer paso fue la extracción de bacterias del tejido vegetal. Las semillas fueron colocadas en 3 mL de TE y sonicadas (Microson ultrasonic cell disruptor, Misonix, New York) mediante 5 pulsos de 1 minutos intercalados con 1 minuto de reposo. El extracto de las semillas sonicadas se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugó a 11000 rpm por 4 min. El *pellet* fue resuspendido en 570 uL de TE. La muestra fue sometida a ebullición durante 15 minutos. Se realizaron 3 ciclos de calor y frío alternados, colocando la muestra en agua hirviendo e inmediatamente en hielo. Se agregaron 30 µL de SDS a 37°C y 3 µL de proteasa K⁺ (20 mg/mL), se mezcló la solución y se dejó en incubación durante una hora a 37 °C en baño María. Se adicionaron 100 µL de NaCl 5M y se mezcló, enseguida se adicionaron 80 µL de CTAB/NaCl previamente calentado. La mezcla se incubó a 65 °C durante 10 min., se transfirió a tubos nuevos y se agregaron 500 µL de una mezcla de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por inversión 100 veces y se centrifugó durante 5 minutos en ultracentrífuga. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos y se agregaron 500 µL de Cloroformo/Alcohol isoamílico (24:1), se mezcló igualmente por inversión y se centrifugó igual que en el paso anterior. Se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos, se agregó 1 mL de etanol al 100% preenfriado en congelador,

se mezcló y se dejó en congelación durante 2 h. La muestra se centrifugó durante 30 min. (11000 rpm), se removió el sobrenadante y se agregaron 50 μ L de alcohol etílico al 70%, se re-centrifugó a 11000 rpm durante 30 min. Se dejó evaporar el alcohol en campana de flujo laminar (una noche). El producto de la evaporación fue el ADN, se enjuagaron las paredes del tubo con 50 μ L de H₂O estéril y se almacenó la muestra a -20°C.

Amplificación del gen 16S rDNA: La amplificación del 16S rDNA se realizó utilizando primers universales para el dominio bacteria, ellos fueron: 518 F (5'-CCA GCA GCC GCG GTA AT -3') y 1070 R (5'-AGC TGA CGA CAG CCA T-3'). Para 25 μ L de la mezcla de reacción se adicionaron los siguiente componentes: 2.5 μ L de Buffer 10X con MgCl₂ 15 mM (QIAGEN Sciences, Maryland), 0.5 μ L de dNTP 2.5 mM, 2.0 μ L de una mezcla 5 mM de cada primer, 1.25 μ L dimetilsulfoxido (Sigma, St. Louis, MO), 2.5 μ L de albúmina de suero bovino 0.4 g L⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO), 0.125 μ L HotStarTaq DNA polimerasa (QIAGEN Sciences, Maryland), 6 μ L del templado y 10.125 μ L de ddH₂O estéril.

La PCR fue llevada a cabo en el termociclador (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) utilizando el siguiente programa: 1) 95°C 15 min, 2) 94 °C 45 seg., 3) 55°C 45 seg., 4) 72°C 30 seg., 5) 30 ciclos del paso 2 al 4, 6) 72°C 7 min y 7) 25°C.

Electroforesis en gel de agarosa: El producto de PCR se visualizó en gel de agarosa al 2%. La electroforesis se corrió a 100 V/ 75 mA durante 60 min. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Se corrieron tres réplicas de la muestra y un blanco únicamente con ddH₂O.

Revelado y captura: El gel fue teñido con solución de bromuro de etidio (Sigma) durante 20 minutos. El gel obtenido se fotodocumentó en un transiluminador UPV Biodoc-Ir System.

2.5.2.6. Bacterias endófitas cultivables de tallos de plantas adultas

Se colectaron cuatro individuos de la zona de estudio, dos plantas representaron a las plantas creciendo en roca y otras dos representaron a las plantas creciendo en un suelo pedregoso pero con suelo formado. El pretratamiento de los ejemplares consistió en lavado riguroso del tallo y las raíces con agua corriente para eliminar las partículas de suelo, sobre todo las adheridas a las raíces. En condiciones de esterilidad ambiental se obtuvieron trozos de tallos de aproximadamente dos centímetros. Las secciones de tallo se higienizaron de acuerdo al siguiente procedimiento: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) Enjuagues abundantes con agua purificada estéril, c) Agitación con NaOCl al 3% durante 5 minutos y d) 10 enjuagues abundantes con agua destilada estéril. Los trozos de tallos fueron macerados en 50 mL de *PBSK* estéril, 0.002 M pH 7.2. Diluciones seriadas del extracto fueron inoculados por extensión en cajas Petri conteniendo alguno de los siguientes medios de cultivo: Agar nutritivo, agar soya tripticasa, Medio Pikoskaya (Pikoskaya, 1948) suplementado con fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Hierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%), medio Henderson (Henderson y Duff. 1963) fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Hierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%). Las cajas Petri fueron incubadas a 30 ± 1 °C y se hizo cuenta viable después de 72 hr de mantenimiento del cultivo. Trozos de tallos fueron colocados en placas con medio de agar nutritivo (AN) e incubados durante 24 h a 30°C para verificar que la higienización fuera exitosa. Los

morfotipos con características coloniales distintas fueron conservados en glicerol al 15% a -80°C.

2.5.2.7. Bacterias endófitas cultivables de raíces de plantas adultas

Se colectaron 6 individuos de la zona de estudio, dos plantas de cada sitio donde se midió el biovolumen de *M. fraileana*. De la longitud total de las raíces, se utilizó el tercio apical en donde teóricamente se supone una mayor densidad de bacterias endófitas provenientes del suelo. Previo al tratamiento de desinfección superficial, las raíces fueron enjuagadas con agua corriente para eliminar partículas de suelo fuertemente adheridas a la superficie de la raíz.

2.5.2.8. Higienización de raíces

La higienización consistió en los siguientes pasos: a) Agitación en tween 20 al 2% durante 10 minutos, b) Enjuagues abundantes con agua purificada estéril, c) Agitación con NaOCl al 3% durante 5 minutos y d) 10 enjuagues abundantes con agua destilada estéril. Las raíces fueron fragmentadas en secciones de 1 cm. aproximadamente y se homogenizaron en mortero con 50 mL de Caldo de Soya Trypticasa, incubándose a 30°C a 130 rpm durante 24 h. Raíces en trozos fueron colocadas en placas con medio de AN e incubadas a 30 ° C para verificar que la higienización fuera exitosa.

Con el tratamiento anterior hubo crecimiento de bacterias presuntivamente del rizoplano, por lo tanto, se realizó una segunda higienización (ver párrafo anterior). Enseguida se procedió a eliminar la corteza de la raíz con el fin de asegurar la eliminación de bacterias de rizoplano. Para verificar la efectividad del tratamiento de higienización se

dio una segunda higienización a 15 trozos de raíz, los cuales fueron colocados sobre AN e incubados a 30°C durante 48 horas.

Las raíces sin corteza se homogenizaron en mortero utilizando 1 mL de Caldo de Soya Tripticasa. Del extracto crudo se tomaron 100 µL para preparar diluciones seriadas en *PBS* pH 6.8 (0.002M) las cuales fueron inoculadas por extensión en dos medios: agar soya tripticasa y agar nutritivo. El resto del homogenizado fue inoculado en matraces conteniendo caldo de soya tripticasa y se incubó a 130 rpm y 30 ± 1°C. Después de 35 h de incubación del extracto vegetal, 100 µL de las diluciones 10⁻⁰, 10⁻² y 10⁻⁵ en *PBS* pH 6.8 (0.002M) fueron inoculadas por extensión en cajas Petri conteniendo alguno de los siguientes medios de cultivo: Medio Pikoskaya (Pikoskaya, 1948) conteniendo uno de los siguientes fosfatos: fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Fierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%), medio Henderson (Henderson y Duff. 1963), igualmente con fosfato de Aluminio (0.01%), fosfato de Fierro (0.01%) o fosfato de calcio (0.38%) y Medio Rennie (1981). Las cajas Petri fueron incubadas a 30 ± 1°C y se hizo cuenta viable después de 48 h de crecimiento. Los morfotipos bacterianos con características coloniales (forma, color, borde, apariencia, consistencia) y celulares distintas (tamaño, forma) fueron aislados y purificados en el medio donde fueron obtenidos. La caracterización colonial de los morfotipos se realizó conforme a su apariencia en agar nutritivo. La capacidad fluorescente fue determinada por inoculación de los morfotipos en el medio de King *et al.* (1954) y visualizada con luz ultravioleta. La formación de halo de solubilización en medio Pikoskaya fue monitoreada periódicamente y el diámetro del halo fue medido a los 30 días

de incubación. Suspensiones celulares de cada uno de los morfotipos fueron preservados en glicerol al 15% en viales criogénicos a -80°C .

2.5.2.9. Identificación de las bacterias endófitas de *M. fraileana*

Se determinó la identidad taxonómica de cuatro cepas de bacterias endófitas de *M. fraileana* con características relevantes para fijación de nitrógeno y/o degradación de rocas obtenida por secuenciación total del gen 16sRNA. Adicionalmente, se verificó la identidad de la cepa etiquetada como BPOLCY, la cual fue utilizada como control en algunos experimentos. La secuenciación y alineamiento fueron solicitadas como servicio a la compañía Genotech Co. (Corea del Sur).

2.5.2.10. Evaluación del potencial de las bacterias aisladas como PGPB (pruebas de solubilización de fosfatos de Calcio y fijación de Nitrógeno)

a) Aislamiento de cepas bacterianas de endófitas cultivables de *Mammillaria fraileana* con potencial para fijar nitrógeno

Raíces de 6 ejemplares provenientes de tres sitios de la zona de estudio fueron enjuagadas con agua corriente hasta eliminar el exceso de partículas del suelo. Se realizaron enjuagues adicionales con agua destilada y se dejaron en agitación por espacio de 1.5 h. El detergente Tween 20 al 2% fue eliminado con enjuagues abundantes con agua purificada estéril. Las raíces fueron cortadas con bisturí estéril en trozos de aproximadamente 3 cm de longitud y 2-4 mm de diámetro después del cual se dejaron en agitación con detergente Tween 20 al 2% durante 20 min. Enseguida, se colocaron las raíces en agitación en solución de Hipoclorito de Sodio NaOCl al 3% durante 10 minutos. Se descartó el NaOCl y

las raíces se lavaron mediante 10 enjuagues abundantes de agua destilada estéril. Se cortaron los extremos de las raíces y se seccionaron en trozos de 1 cm de longitud. Para verificar la efectividad del tratamiento de higienización se colocaron 12 trozos de raíz con corteza en placas con medio Rennie sólido sin N e incubados a 30°C durante 72 horas.

Las raíces se separaron en dos grupos para considerar bacterias endófitas de raíz con corteza y bacterias de raíces sin corteza. A un primer grupo de raíces se les retiró la corteza en condiciones axénicas. Posteriormente se pesaron 2 g de éstas raíces y se maceraron en 1 mL de medio líquido Rennie libre de nitrógeno. El macerado fue vaciado en 50 mL del mismo medio y se dejó en incubación durante 5 días sin movimiento y a 30±1°C. De igual manera, raíces con corteza fueron maceradas en 1 mL de medio líquido Rennie libre de nitrógeno. El macerado fue inoculado en un matraz conteniendo 50 mL de medio Rennie líquido libre de nitrógeno e incubadas durante 5 días sin movimiento y a 30±1°C. Después de los cinco días de incubación, se realizaron diluciones seriadas de ambos macerados en cultivo y se inocularon por extensión en placas con medio Rennie sólido. Las cajas Petri fueron incubadas a 30±1°C y se hizo cuenta viable después de 48 h de crecimiento. Los morfotipos de características coloniales diferentes fueron aislados y purificados y posteriormente liofilizados para su preservación a -20°C.

b) Reducción de acetileno por bacterias endófitas de raíz

Se realizaron pruebas de reducción de acetileno para confirmar la capacidad de fijación de nitrógeno de algunos morfotipos de raíz aislados con medio Rennie. Se analizaron 9 morfotipos: 5 morfotipos aislados en medio Rennie con cantidad mínima de

nitrógeno (inciso 2.5.2.8) y 4 morfotipos obtenidos de medio sin nitrógeno (inciso anterior, 2.5.10a).

Se utilizó como preinóculo a cada uno de los morfotipos creciendo en medio Rennie líquido suplementado con una cantidad mínima de nitrógeno (extracto de levadura al 0.01%). La excepción de cultivo fue el morfotipo M2Per, el cual parece limitar su crecimiento en medio con nitrógeno, por lo tanto este morfotipo fue cultivado y mantenido en medio sin fuente de nitrógeno. Las cepas *Azospirillum brasilense* Cd y *Bacillus subtilis*, se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Se inyectaron 100 μ L de inóculo Densidad Óptica (DO)_{540 nm}=1 en viales con medio Rennie semisólido 0.3% y se dejaron en incubación a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante dos días después de los cuales se sellaron los frascos. Entonces, se desplazó 1 mL de volumen de aire de cada frasco y se sustituyó por 1 mL de acetileno. Los viales fueron nuevamente incubados a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante dos días. Se realizó la prueba de reducción de acetileno a etileno por cromatografía de gases de acuerdo al método descrito por Holguin *et al.* (1992) utilizando el Cromatógrafo de Gases HP 5890 Serie III y la Columna HP Al/S 19091P-S15 con Detector FID. Para conocer el número de bacterias presentes al momento de realizar la prueba, se mantuvo por duplicado el experimento pero en medio líquido. El día de la determinación de etileno se hicieron diluciones de los cultivos y se inocularon en placas con medio Rennie sólido con extracto de levadura al 0.01 % y para *Azotobacter vinelandii* M2Per se utilizó medio Rennie libre de nitrógeno. Las placas se incubaron a $36\pm 0^{\circ}\text{C}$ durante dos días y se realizó cuenta viable.

c) Pruebas de remoción de fosfatos inorgánicos de calcio

Debido a que la formación de halo solo fue observada en el medio Pikoskaya conteniendo fosfato de calcio, las pruebas de remoción de fosfatos fueron realizadas únicamente para la forma de (CaPO_4) . Se determinó la habilidad de 9 morfotipos endófitos de raíz para remover fosfatos de calcio *in vitro*. Se utilizó medio Pikoskaya líquido con CaPO_4 al 0.30%. El diseño experimental consistió en 10 tratamientos con tres réplicas por tratamiento. Dentro de los tratamientos se consideraron dos controles, el control positivo fue la cepa *Pseudomonas putida* SENDO2 (Endófito de cardón) (Puente, 2005) y como testigos negativos se tuvieron matraces sin inocular en dos variantes: incubados en agitación e incubados sin agitación para restar el efecto de solubilización sin la intervención bacteriana.

Se utilizaron tres matraces con 50 mL de medio Pikoskaya líquido por morfotipo. Los matraces fueron inoculados con 1 mL de la suspensión bacteriana en solución salina (NaCl , 0.85%) con una concentración de 1×10^9 ($\text{DO}_{540 \text{ nm}}=1.0$ a 540 nm). Los matraces se incubaron por 30 días a 110 rpm y $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. La remoción de P (P_2O_5) *in vitro* fue determinada por el método de Jackson (1958) al inicio y fin del experimento. También se realizó la cuenta viable de bacterias presente al final del experimento. Se realizaron tres réplicas por tratamiento, siendo una réplica un grupo de 6-9 cajas Petri conteniendo agar nutritivo.

c.1) Análisis estadístico

El valor promedio de fósforo solubilizado obtenido en el tratamiento sin inóculo fue restado al valor individual en cada tratamiento. Se consideró que al eliminar el efecto de la

acción mecánica de la agitación, los valores analizados serían resultado directo del inoculante. Dicho efecto fue determinado mediante ANOVA de una vía y comparaciones Tukey.

d) Degradación de rocas por bacterias endófitas de *M. fraileana*

Se evaluó la capacidad *in vitro* de las bacterias endófitas aisladas de raíz de *M. fraileana* para degradar rocas de proveniente de sitios en donde ésta cactácea es abundante como colonizadora de rocas.

Se utilizaron pulverizados de rocas que fueron utilizados en el Cap. I inciso (1.5.9). El sustrato se preparó con cantidades iguales de 10 rocas pulverizadas (diámetro de partícula $\leq 74\mu\text{m}$) provenientes de un sitio con alta abundancia de *M. fraileana* creciendo sobre rocas. Posteriormente se esterilizó el pulverizado de roca por autoclave en sobres individuales de 1.5 g.

El diseño experimental consideró en este ensayo principalmente a tres morfotipos de bacterias endófitas aisladas de raíz utilizando medios suplementados con Al, Ca y Fe: Ellas son *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Bacillus megaterium* M2PCa. Adicionalmente se midió la habilidad de la endófitas fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* M2Per y se incluyó un tratamiento en donde se midió el efecto combinado de las tres primeras endófitas y del morfotipo fijador de nitrógeno. El control positivo fue la cepa *Bacillus pumilus* ES4, endófitas de cardón la cual degrada roca volcánica. Como control negativo se estableció un tratamiento sin inóculo bacteriano.

Medios de cultivo: Se hicieron pruebas preliminares para obtención de un medio mínimo que propiciara el crecimiento litotrófico de las bacterias. El medio utilizado fue

basado en la formulación del medio Rennie (1987) diluido al 33% respecto al medio completo. De la formulación original únicamente se modificó la fuente de nitrógeno, en lugar de extracto de levadura se utilizó NH_4Cl al 0.2%. En los tratamientos en donde participó el morfotipo fijador de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* M2Per y en el consorcio de endófitas, no se agregó NH_4Cl como fuente de nitrógeno.

Obtención del inóculo: Para la aclimatación de las cepas al medio mínimo utilizado en el experimento, se utilizó caldo de soya tripticasa diluido al 50% desde la preparación del pre-inóculo e inóculo. Para obtener los pre-inóculos, cada una de las cepas fue inoculada individualmente en caldo de soya tripticasa e incubadas durante 12 h a $36\pm 1^\circ\text{C}$ y agitación constante a 110 rpm. Se inocularon nuevamente los pre-inóculos en caldo de soya tripticasa al 50% y se incubaron durante 12 h a $36\pm 1^\circ\text{C}$ y agitación constante a 110 rpm. Únicamente para la endófito *Azotobacter vinelandii* M2Per el tiempo de incubación para la obtención del pre-inóculo e inóculo fue de 48 h. El inóculo fue cosechado por centrifugado a 4500 rpm durante 20 minutos. Los inóculos se lavaron tres veces en solución reguladora *PBSK* (0.002 M y $\text{pH} = 7.2$) y finalmente resuspendidos en *PBSK* a una concentración final de 1×10^9 , equivalente a $\text{DO}_{540\text{ nm}}=1$.

Inoculación del medio líquido con roca pulverizada. Se agregó 1.5 g de roca pulverizada a matraces conteniendo 140 mL de medio Rennie al 33%, con o sin fuente de nitrógeno, según correspondiera. A cada matraz con la roca pulverizada en suspensión se le agregaron 10 mL de suspensión bacteriana y se dejaron en incubación durante 32 días a $36\pm 1^\circ\text{C}$ y agitación constante a 110 rpm. Al tratamiento del consorcio se le agregaron 2.5 mL de suspensión bacteriana de cada una de las cuatro endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA,

Enterobacter sakazakii M2PFe, *Bacillus megaterium* M2PCa y *Azotobacter vinelandii* M2Per. A los tratamientos sin bacteria se les agregó 10 ml de *PBSK*. Se consideraron cuatro réplicas por tratamiento.

Determinaciones periódicas: Se realizaron determinaciones semanales de pH y cuenta viable. La cuenta viable para *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Bacillus megaterium* M2PCa se hizo en agar soya tripticasa al 50% y para *Azotobacter vinelandii* M2Per se utilizó medio Rennie sólido libre de N.

Semanalmente se tomaron muestras para el conteo y determinación del tamaño de partículas de roca en suspensión. Para ello se tomó 1 mL de cada matraz y se hizo una dilución 1:100 en solución salina de NaCl al 3.5% prefiltrada y el diámetro y número de las partículas de roca utilizando el contador de partículas Multisizer 3 Coulter Counter (Beckman).

d.1) Análisis estadístico

Los valores del cambio de pH fueron ponderados respecto al valor promedio del tratamiento control sin bacteria. Por lo tanto, el cambio de pH se asume como directamente relacionado a la actividad bacteriana. Para conocer el efecto real del inóculo se restó el porcentaje de incremento en número de partículas al valor obtenido en el tratamiento blanco, sin inóculo. Al porcentaje de cambio en el número de partículas de cada tratamiento se expresaron como la diferencia respecto al tratamiento sin bacteria. Se realizaron ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparaciones *t-student* del número de partícula al inicio y después de los 32 días de incubación.

2.6. RESULTADOS

2.6.1. Detección, cuantificación y aislamiento de bacterias endófitas de tallos, raíces, frutos y semillas de *Mammillaria fraileana*

2.6.1.1. Endófitas cultivables de frutos y semillas

En los homogenizados de frutos con semilla sometidos a higienización no se detectó ningún tipo de crecimiento microbiano después de 18 días de crecimiento del cultivo. Tampoco se detectó crecimiento microbiano en el testigo negativo (*PBS*). El tratamiento no desinfectado mostró crecimiento masivo de hongos y bacterias.

2.6.1.2. Bacterias endófitas cultivables de frutos

A las 48 horas de incubación se comprobó la efectividad del tratamiento de desinfección. No se detectó crecimiento externo en los frutos colocados enteros en agar soya tripticasa. A los 15 días de incubación, tanto en placas con agar nutritivo como agar soya tripticasa, se observó que solo el 10% de los frutos desarrolló crecimiento de hongos pero no así de bacterias.

2.6.1.3. Bacterias endófitas cultivables de semillas

A los 30 días de incubación no se detectó actividad bacteriana en el macerado de semilla colocado en caldo nutritivo. El tratamiento de higienización fue exitoso dado que no hubo crecimiento de bacterias en la superficie de las semillas colocadas en Agar nutritivo. Hasta 30 días de incubación, el medio sólido de soya tripticasa no mostró crecimiento bacteriano en ninguna de las diluciones del homogenizado de semillas. Las placas inoculadas con *PBS* tampoco mostraron crecimiento de bacterias. Otro grupo de

semillas colocadas para verificar el tratamiento de desinfección no mostraron cambios en la turbidez del medio por lo tanto se consideró como exitoso el tratamiento de desinfección. Después de los treinta días de incubación no se detectó la presencia de bacterias cultivables en el homogenizado de semillas inoculado en caldo de soya tripticasa.

2.6.1.4. Bacterias endófitas cultivables de plántulas

Satisfactoriamente, el control negativo inoculado con solución reguladora de fosfatos no exhibió ningún tipo de crecimiento microbiano. Hasta los 30 días de incubación, el macerado de plántulas inoculado en 8 diferentes medios no mostró crecimiento bacteriano de manera que no se obtuvieron bacterias cultivables de plántulas.

2.6.1.5. Presencia natural de bacterias endófitas no-cultivables en semillas de *M.*

fraileana

2.6.1.5.1 Detección y cuantificación de bacterias viables en semilla por tinción fluorescente

Los conteos de bacterias endófitas de semilla por la técnica de tinción fluorescente, indicaron una densidad de bacterias endófitas viables de 2.44×10^6 células·g de semilla⁻¹, $\pm 6.44 \times 10^{-5}$ (Fig. 10).

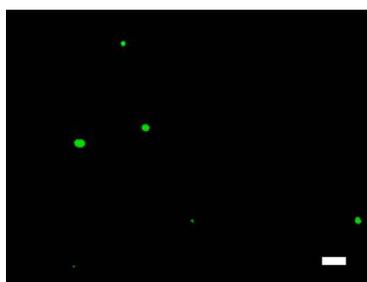


Fig. 10. Tinción de bacterias endófitas viables teñidas por el método de tinción fluorescente con diacetato de fluoresceína (FDA). Escala de referencia 5 μ m.

2.6.1.5.2. Detección de bacterias por Hibridación fluorescente *in situ* (FISH)

A través de la FISH se verificó la presencia de bacterias endófitas de semillas de *M. fraileana*. Se observó una mayor abundancia de bacterias en semillas en imbibición. Dichas bacterias se observaron tanto en tejido vascular (Fig. 11a) como en el resto embrión. Se observó una distribución dispersa de pequeños grupos de bacterias (Fig. 11b).

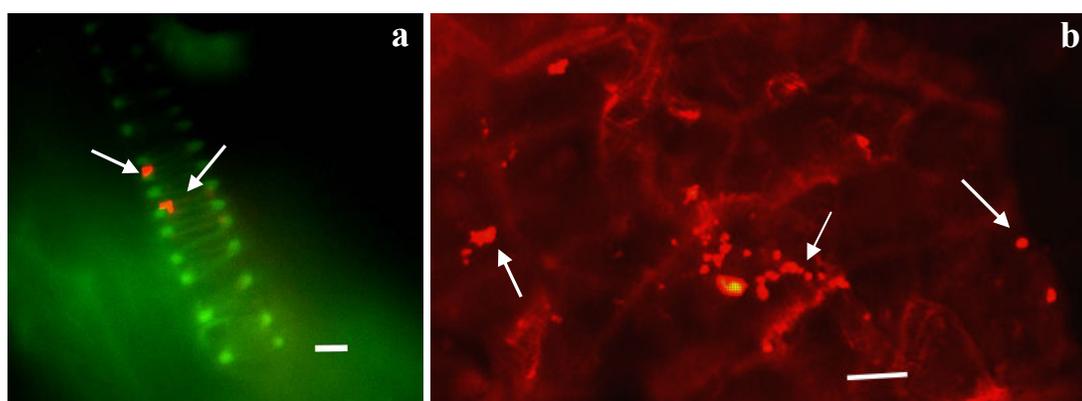


Fig. 11. Micrografía de epifluorescencia para la detección de bacterias endófitas de semillas de *M. fraileana*. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente y se les retiró la testa. El tejido interno se presionó hasta formar una delgada capa y posteriormente se sometió a hibridación fluorescente *in situ* FISH utilizando la sonda EUB338 para el dominio Bacteria y el fluorocromo CY3. a) Tejido vascular (las flechas indican los cuerpos de las bacterias y la organización del tejido vascular) de la semilla previo a la germinación, b) Tejido del interior de la semilla a los 8 días de imbibición. Escala de referencia 5 μ m.

2.6.1.5.3. Detección de bacterias endófitas de semilla por Microscopía Electrónica de Barrido.

El análisis por MEB de las muestras previamente analizadas por FISH proporcionó mas evidencia de la presencia de bacterias en el interior de semillas desinfectadas superficialmente y dejadas a imbibición durante 8 días. Las bacterias se encontraron asociadas a la cara interna de la membrana que cubre a la semilla debajo de la testa (Fig. 12)

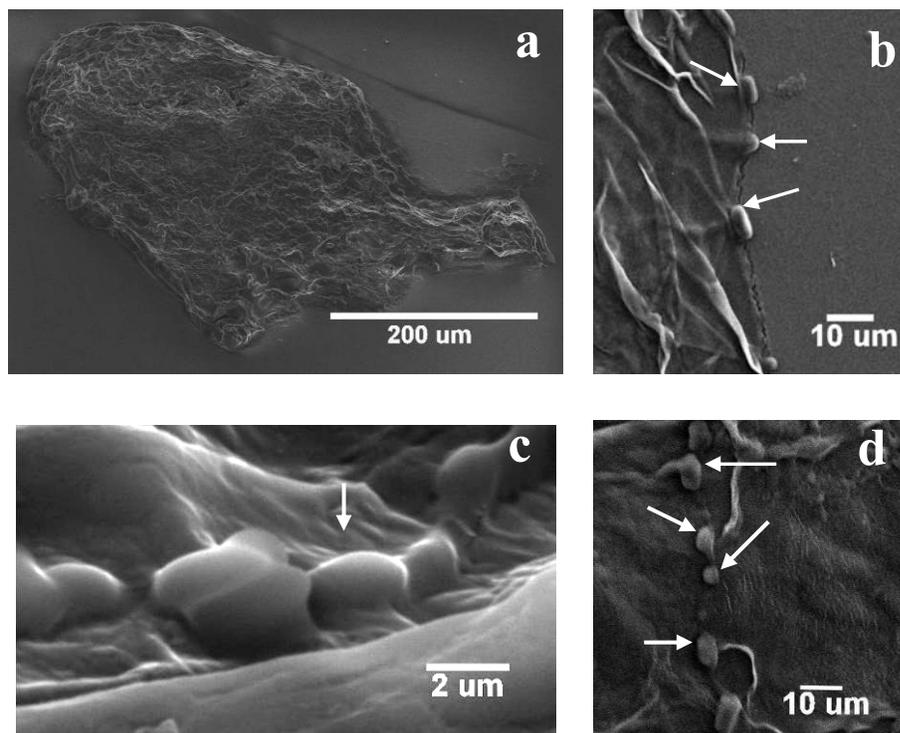


Fig. 12. Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido del interior de la semilla de *M. fraileana*. Las semillas fueron desinfectadas superficialmente y se les retiró la testa. El tejido interno se presionó hasta formar una delgada capa. a) Observación en fresco de semilla sin testa presionada mecánicamente hasta formar una delgada capa de tejido. La semilla con testa mide aproximadamente 0.5 mm, b) y d) Tejido del interior de la semilla (sin testa) a los 8 días de imbibición de la semilla. Se señalan bacterias en forma bacilar expuestas sobre una membrana que cubre internamente a la semilla. c) Tejido interno de la semilla a los 8 días de imbibición de la semilla. Obsérvese la forma bacilar de la bacteria. Esta muestra fue procesada previamente por FISH.

2.6.1.5.4. Detección de bacterias endófitas de semilla por amplificación del 16 sDNA

Al realizar la extracción de ADN y amplificación del 16S rRNA, se pudo confirmar la presencia de bacterias en el interior de semillas (Fig. 13). Estas poblaciones corresponden a bacterias endófitas que no pudieron ser aisladas por métodos cultivo-dependientes.

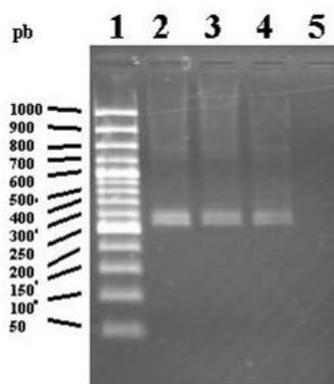


Fig. 13. Imagen de un gel de agarosa al 2% en el que se muestra la presencia del 16S rDNA bacteriano. Carril 1=Marcador GeneRuler 100 bp DNA, carriles 2, 3, 4=Amplificado del 16S rDNA bacteriano utilizando los primers 518 F, 1070, carril 5=Blanco (H_2O).

2.6.1.6. Bacterias endófitas cultivables de tallos de plantas adultas

En los tallos de plantas provenientes de suelo del hábitat natural se observaron niveles de abundancia de bacterias endófitas de 282.5 UFC g⁻¹ peso fresco de tallos (SE±40.50), mientras que para las plantas establecidas en roca la abundancia fue de apenas 181.7 UFC g⁻¹ peso fresco de tallos (SE±38.56). A las 24 h se confirmó la efectividad del tratamiento de desinfección lo cual fue determinado por la ausencia de crecimiento bacteriano en la superficie de los trozos de tallo colocados en agar nutritivo. Después de 48 h comenzó a observarse crecimiento bacteriano.

2.6.1.7. Bacterias endófitas cultivables de raíces de plantas adultas

Se confirmó la presencia de bacterias cultivables en raíces sin corteza. En el extracto crudo, las poblaciones bacterianas cultivables mostraron una abundancia variable dependiendo del medio de crecimiento utilizado. En agar nutritivo la población fue de solo 1.81×10^4 UFC·g⁻¹ ± 1.81×10^4 , mientras que en agar soya tripticasa fue de 5.44×10^4 UFC

g^{-1} peso fresco raíz. En agar nutritivo la población consistió de un morfotipo y en agar soya tripticasa apenas se pudieron diferenciar dos morfotipos. Después de 35 horas de incubación del extracto crudo de raíces, las poblaciones bacterianas mostraron una mayor diversidad de morfotipos que el extracto obtenido inicialmente. Las poblaciones para el cultivo del extracto incubado durante 35 h se encontraron en el rango de $1.05 \times 10^9 \pm \text{SE}$ $1.71 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco raíz a $1.20 \times 10^{10} \pm \text{SE}$ $8.33 \times 10^7 \text{ UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ peso fresco raíz que corresponden a los aislamientos en medio Rennie y soya tripticasa, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6 Niveles de abundancia de las poblaciones de bacterias endófitas aisladas del cilindro vascular de raíz de *M. fraileana*.

| Medio de cultivo | Extracto crudo UFC/g peso fresco raíz | Después de 35 h de incubación del extracto crudo. UFC/g peso fresco raíz |
|-----------------------------------|--|--|
| Agar nutritivo | $1.81 \times 10^4 \pm 1.81 \times 10^4$ | $6.57 \times 10^9 \pm 2.98 \times 10^8$ |
| Agar soya tripticasa | $5.44 \times 10^4 \pm 0.0$ | $1.20 \times 10^{10} \pm 8.33 \times 10^7$ |
| Pikoskaya (Al) | ND | $6.28 \times 10^9 \pm 8.32 \times 10^8$ |
| Pikoskaya (Fe) | ND | $7.68 \times 10^9 \pm 1.18 \times 10^9$ |
| Pikoskaya (Ca) | ND | Aprox. 1×10^{12} ND |
| Rennie (con extracto de levadura) | ND | $1.05 \times 10^9 \pm 1.71 \times 10^8$ |

Dado que la abundancia de bacterias endófitas en la raíz fue evidentemente más alta que en otros órganos, se consideró a la raíz como la mejor fuente potencial de endófitas y por lo tanto se seleccionaron los morfotipos de éste órgano para experimentos posteriores. Se diferenciaron 10 morfotipos de acuerdo con su morfología colonial y por su potencial para solubilizar fosfatos y/o crecer en medio para bacterias fijadoras de nitrógeno. Todos los morfotipos fueron capaces de crecer en los medios Henderson y Pikoskaya, formulados con fosfatos. Sólo cuatro morfotipos (M2TSA, M3TSA, M5TSA, M1PCa) evidenciaron la

formación halo de solubilización en medio Pikoskaya. La diferencia entre ambos medios es que el segundo contiene sodio y contiene magnesio, manganeso y fierro. Igualmente todos los morfotipos crecieron en medio Rennie con mínima cantidad de nitrógeno (0.01% de extracto de levadura) por lo tanto se consideraron potenciales fijadores de nitrógeno (Tabla 7).

Tabla 7 Caracterización de algunas bacterias endófitas aisladas de raíz de *M. fraileana*.

| Morfotipo | Potencial para solubilizar fosfatos ^a | | | ^b Potencial para fijar Nitrógeno Medio Rennie | ^c Fluorescencia Medio King | Características celulares | | |
|-----------|--|-----|-----|--|---------------------------------------|---------------------------|-------------|--------------|
| | PCa | PFe | PAI | | | FORMA | TAMAÑO (µm) | TINCIÓN GRAM |
| M1TSA | + | + | + | + | NO | Bacilo | 1.4 | G - |
| M2TSA | +(0.5) | + | + | + | SI | Bacilo | 2.4 | G - |
| M3TSA | +(0.5) | + | + | + | NO | Bacilo | 1.6 | G - |
| M4TSA | - | + | + | + | NO | Bacilo | 1.3 | G - |
| M5TSA | +(0.5) | + | + | + | SI | Bacilo | 1.8 | G - |
| M2RN2 | + | + | + | + | NO | Bacilo | 1.4 | G - |
| M2PAL | + | + | + | + | NO | Bacilo | 1.5 | G - |
| M2PFe | + | + | + | + | NO | Bacilo | 1.7 | G - |
| M1PCa | +(1.5) | + | + | + | NO | Bacilo | 3.1 | G + |
| M2PCa | +(1.5) | + | + | + | NO | Bacilo | 1.5 | G - |

+: Crece en el medio indicado, - : No crece en el medio indicado. ^a: Crecimiento en medio con Pikoskaya suplementado con fosfatos de Aluminio (PAI), Fierro (PFe) o Calcio (PCa). Entre paréntesis, diámetro del halo de solubilización (cm) a los 30 días de incubación. ^b: Crecimiento en Medio Rennie (1987) con 0.01% de extracto de levadura. ^c: Crecimiento en medio King et al (1954) para bacterias fluorescentes (*Pseudomonas*). +: Fluorece con luz UV, - : No fluorece con luz UV.

2.6.1.8. Identificación de las bacterias endófitas de *M. fraileana*

Se determinó la identidad taxonómica de cuatro bacterias endófitas. La identidad fue de 99% y 100% (Tabla 8). Adicionalmente se verificó que la cepa BPOLCY, utilizada como control en algunos experimentos, corresponde a *Bacillus subtilis* con una identidad de 99%, a partir del alineamiento de 1481 pb respecto a 1482 pb de la cepa de referencia EU257436.1 del GenBank.

Tabla 8 Identidad taxonómica de las bacterias endófitas de *M. fraileana* aisladas de raíz

| MORFOTIPO | Órgano de procedencia y medio de aislamiento | ESPECIE IDENTIFICADA | Porcentaje de Identidad | Ubicación taxonómica | Código de acceso de la secuencia de referencia |
|-----------|--|-------------------------------|--------------------------------|---|--|
| M2Per | Bacteria de corteza de raíz. Aislada en medio sin Nitrógeno. | <i>Azotobacter vinelandii</i> | Identidad: 99% (1461/1463 pb) | Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Azotobacter. | EF620439.1 |
| M1PCa | Bacteria del cilindro vascular de raíz. Aislada en medio con fosfatos de Calcio | <i>Bacillus megaterium</i> | Identidad: 100% (1466/1466 pb) | Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus. | AY739269.1 |
| M5TSA | Bacteria del cilindro vascular de raíz. Aislada de medio de soya tripticasa | <i>Pseudomonas putida</i> | Identidad: 100% (1462/1462 pb) | Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas. | AY741157.1 |
| M2PFe | Bacteria del cilindro vascular de raíz. Aislada en medio con fosfatos de fierro. | <i>Enterobacter sakazakii</i> | Identidad: 99% (1454/1455 pb) | Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Enterobacter. | CP000783.1 |

*Los morfotipos indicados como provenientes del cilindro vascular se refieren a los aislamientos de raíces sin corteza.

2.6.1.9. Evaluación del potencial de las bacterias aisladas como PGPB

2.6.1.9.1. Aislamiento de cepas bacterianas de endófitas cultivables de *M. fraileana* con potencial para fijar nitrógeno

Las raíces con corteza sometidas a doble tratamiento de desinfección no mostraron crecimiento bacteriano hasta las 72 horas de incubación, por lo tanto, se consideró exitoso el método de desinfección. En el cultivo conteniendo el macerado de raíces sin corteza se detectaron $5.0 \times 10^8 \pm 0$ UFC·g⁻¹ peso fresco de raíz, mientras que en el cultivo del macerado de raíces con corteza, se detectaron niveles superiores de bacterias endófitas, en promedio $5.63 \times 10^{10} \pm 1.34 \times 10^{10}$ UFC·g⁻¹ peso fresco de raíz. Se diferenciaron dos morfotipos bacterianos del aislamiento de raíz con corteza y otros 2 morfotipos de raíces sin corteza. No se observaron características de la morfología colonial que permitieran establecer diferencias claras entre los cuatro morfotipos.

2.6.1.9.2. Reducción de acetileno por bacterias endófitas de raíz

Los nueve morfotipos aislados de raíz y presuntamente fijadores de nitrógeno mantuvieron sus poblaciones en medio Rennie libre de nitrógeno pero no fueron consistentes en su capacidad para reducir acetileno *in vitro*. Los 2 morfotipos provenientes de raíces sin corteza no mostraron valores positivos de reducción de acetileno. De los 2 morfotipos aislados de raíces con corteza, únicamente *Azotobacter vinelandii* M2Per, bacteria Gram⁻, mostró reducción de acetileno positiva. Los valores de reducción de acetileno por cultivo para dicha cepa fueron inferiores (312.87 nmoles·cultivo, SE±91.92) a los registrados por el control positivo *Azospirillum brasilense* Cd (1113.23 nmoles·cultivo,

SE±134.52). Sin embargo, al considerar la eficiencia por célula o UFC se observó que *Azotobacter vinelandii* M2Per obtuvo valores de reducción promedio de 3.60 SE±0.10×10⁻⁵ nmoles·UFC, cantidad que representa 17 veces más de lo reducido por la cepa control positivo *Azospirillum brasilense* Cd (2.09 SE ±2.5×10⁻⁶ nmoles·UFC) (Tabla 9).

Tabla 9 Capacidad de fijación de nitrógeno de las bacterias endófitas de raíz medida por la reducción de acetileno *in vitro*.

| Identificador de la cepa | REDUCCIÓN ACETILENO | | |
|--|----------------------|------------------------|-------------------------------|
| | UFC | nmoles/cultivo | nmoles/UFC |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe | 4.73×10 ⁷ | 0 | |
| M1HOM* | 8.24×10 ⁶ | 0 | |
| M1PCa | 8.00×10 ⁶ | 0 | |
| <i>Bacillus megaterium</i> M2PCa | 4.80×10 ⁷ | 0 | |
| M1Per* | 1.36×10 ⁶ | 0 | |
| M3HOM* | 2.10×10 ⁵ | 0 | |
| M2RN2 | 1.20×10 ⁷ | 0 | |
| <i>Azotobacter vinelandii</i> M2Per* | 8.67×10 ⁶ | 312.87 (SE±91.92) | 3.60 SE±0.10×10 ⁻⁵ |
| <i>Azospirillum brasilense</i> Cd ⁺ | 5.33×10 ⁸ | 1113.23 (SE±134.52) | 2.09 SE ±2.5×10 ⁻⁶ |
| <i>Bacillus subtilis</i> ⁻ | 1.04×10 ⁸ | 0 | |
| <i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | 2.53×10 ⁶ | 0 | |

En negritas se indican los morfotipos aislados con medio Rennie libre de nitrógeno. Superíndices + y - indican cepas controles. SE error estándar, UFC Unidades formadoras de colonia.

2.6.1.9.3. Remoción de fosfatos inorgánicos de calcio por bacterias endófitas de raíz

Todos los tratamientos inoculados con bacterias mostraron capacidad para remover fósforo *in vitro*. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($F=30.77$; $p<0.0001$) respecto al fósforo solubilizado por mililitro de medio Pikoskaya suplementado con CaPO₄ al 0.38%. La comparación de medias por la prueba Tukey indicó que los tratamiento con mayor remoción de P correspondieron a tres endófitas: *Enterobacter sakazakii* M2PFe (31.85 mg P₂O₅·mL⁻¹ ±SE=2.2), M3HOM (28.78 mg P₂O₅·mL⁻¹ SE±2.2) y M2PAI (19.69 mg P₂O₅·mL⁻¹ SE±2.2). El resto de las bacterias endófitas analizadas

removieron cantidades de P que no difirieron significativamente del tratamiento control positivo inoculado con *Pseudomonas putida* SENDO2 el cual apenas alcanzó 4.6 mg $P_2O_5 \cdot mL^{-1}$, SE ± 2.2 .

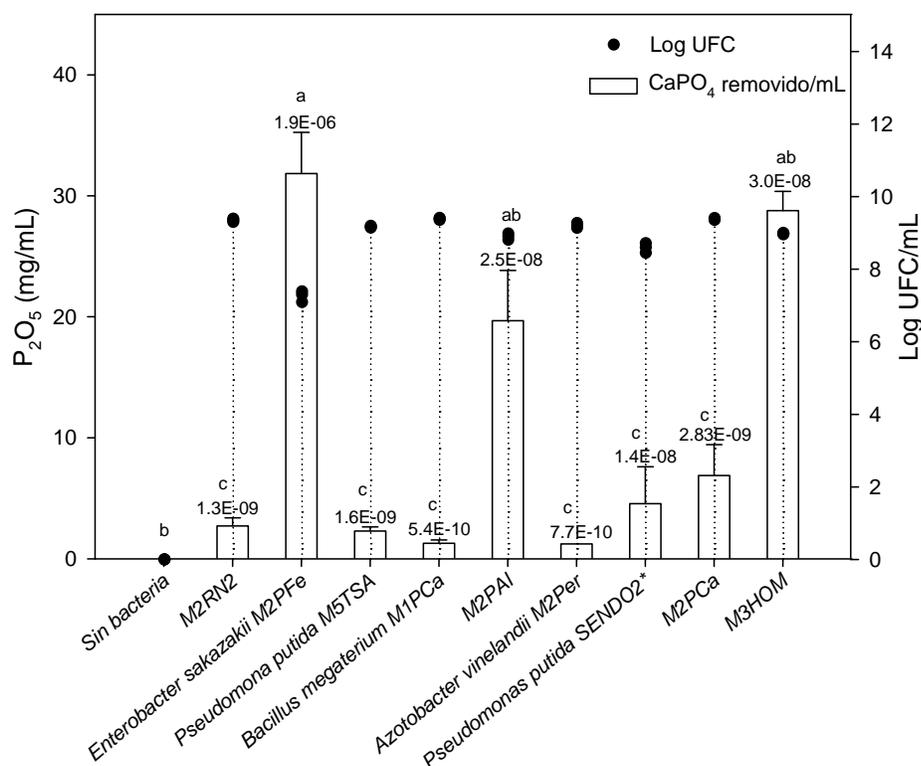


Fig. 14. Solubilización de $CaPO_4$ in vitro por bacterias endófitas de *M. fraileana*. ANOVA ($F=30.77$; $p<0.0001$) y comparación Tukey para $CaPO_4$ ($mg \cdot L^{-1}$) de medio líquido Pikoskaya después de 30 días de incubación. Columnas denotadas con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p<0.05$) en el fósforo solubilizado por cultivo. Las barras indican Error estándar (SE), la ausencia de barra indica SE insignificante. El número arriba de cada columna expresa la eficiencia de solubilización de fósforo por unidad formadora de colonia (UFC) (mg de $P_2O_5 \cdot UFC^{-1}$). El eje secundario del eje Y indica el Log de UFC (unidades formadoras de colonia) asociadas al valor de solubilización por morfotipo. El valor de UFC para el tratamiento sin bacteria aparece graficado con valor 0 indicando ausencia de bacterias.

Respecto a los niveles poblacionales de los inóculos, no se observó una disminución dramática en relación a la densidad de inóculo aplicado inicialmente (1×10^9 $UFC \cdot mL^{-1}$). Al

final del experimento se observaron niveles poblacionales promedio desde $1.9 \times 10^7 \pm 3.52 \times 10^6$ UFC·mL⁻¹ = 7.26 ± 0.09 (en Log UFC·mL⁻¹) que corresponden a la población del morfotipo *Enterobacter sakazakii* M2PFe hasta $2.4 \times 10^9 \pm 9.20 \times 10^8$ UFC·mL⁻¹ = 9.38 ± 0.02 (en Log UFC·mL⁻¹) para el morfotipo endófito *Bacillus megaterium* M1PCa (Fig. 14).

Al dividir el valor de P solubilizado por la población presente en cada tratamiento, se encontró que el tratamiento con la endófitas *E. sakazakii* M2PFe era significativamente superior ($1.9 \times 10^{-6} \pm \text{SE} = 1.7 \times 10^{-7}$) ($\alpha = 0.05$) al resto de los tratamientos, incluyendo el control positivo.

2.6.1.9.4. Degradación de rocas por bacterias endófitas de *M. fraileana*.

a) Efecto de la inoculación de bacterias endófitas de *M. fraileana* en el pH del medio conteniendo roca pulverizada en suspensión.

Se observaron cambios en el pH del medio líquido de roca en suspensión desde la primer semana de establecido el experimento. A excepción del tratamiento inoculado con la endófito fijadora de nitrógeno *A. vinelandii*, se observó disminución del pH en la mayoría de los tratamientos al cabo de 32 días de duración del experimento. El tratamiento control sin bacterias mostró una disminución promedio de 0.40 respecto al pH inicial (Figura 15).

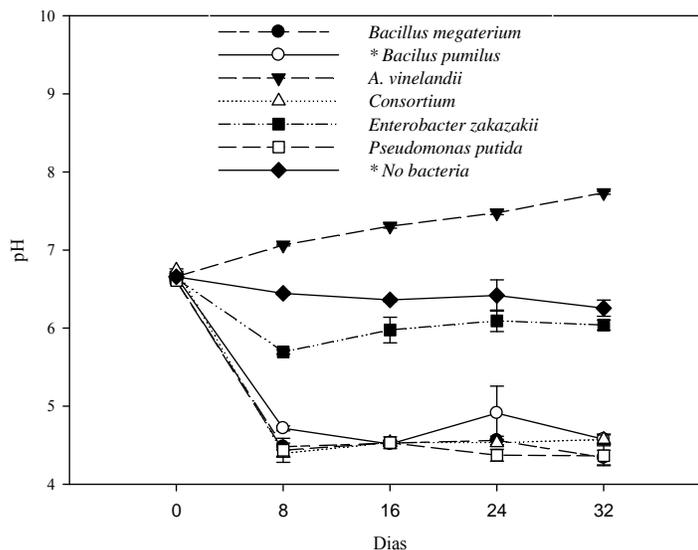


Fig. 15. Curvas de variación del pH del medio líquido con roca pulverizada e inoculado con diferentes endófitas de *M. fraileana*. * Tratamientos control.

El ANOVA de los valores de magnitud del cambio del pH indicó diferencias altamente significativas entre tratamientos ($F=286.76$, $p < 0.0001$, $df=30$). La comparación de medias de Tukey-Kramer ($p < 0.05$) indicó diferencias entre el tratamiento de la bacteria *Azotobacter vinelandii* respecto al resto debido a que fue el único en donde se observó un aumento de pH ($1.47 \pm 0.07SE$, respecto al valor inicial). Con ligera disminución del pH se ubicó *Enterobacter zakazakii* ($-0.19 SE \pm 0.07$) con un comportamiento semejante al del tratamiento control no inoculado. Las endófitas *P. putida* y *B. megaterium* disminuyeron significativamente el pH del medio ($-1.84 SE \pm 0.08$ y $-1.86 SE \pm 0.07$, respectivamente) pero no mostraron diferencias significativas respecto al control positivo *B. pumilus* ES4 ($-1.68 SE \pm 0.07$ y $-1.74 SE \pm 0.07$). Asimismo, el tratamiento con la combinación de endófitas *A. vinelandii*, *E. zakazakii*, *P. putida* y *B. megaterium* también mostró disminución en el pH ($-1.77SE \pm 0.07$), sin diferencias respecto a los controles *Bacillus pumilus* ES4 (Figura 16).

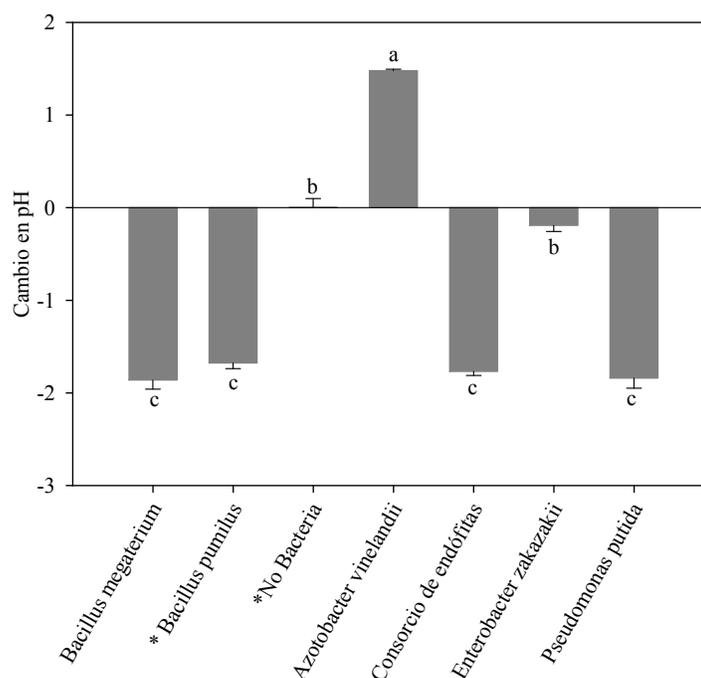


Fig. 16. Variación del pH del medio líquido con roca pulverizada e inoculado con diferentes endófitas de *M. fraileana*. Los valores son el resultado de la diferencia entre el valor inicial y el final ponderado respecto al tratamiento sin bacteria. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos * Tratamientos control.

b) Dinámica poblacional de las poblaciones de endófitas de *M. fraileana* incubadas en medio líquido con roca pulverizada

La dinámica de las poblaciones bacterianas en los siete tratamientos inoculados fue variable pero con una tendencia a la disminución en el número de bacterias en el medio (Fig. 17a, b). El tratamiento control sin bacterias no presentó crecimiento bacteriano. Los niveles más altos en la población bacteriana fueron observados para *Enterobacter zakazakii* M2PFe (5.4×10^7 UFC·mL⁻¹), el consorcio de endófitas (1.55×10^6 UFC·mL⁻¹) y *Azotobacter vinelandii* M2Per (5.4×10^5 UFC·mL⁻¹). La endófito *Pseudomonas putida* fue la única que

no presentó bacterias viables al final de experimento (Fig. 8a). Por otro lado, los tratamientos con *Bacillus megaterium* M2Pca (1.69×10^4 UFC·mL⁻¹) y el control positivo *Bacillus pumilus* ES4 (3.2×10^4 UFC·mL⁻¹) disminuyeron sus poblaciones casi al 50% del inóculo inicial (Fig. 17 b).

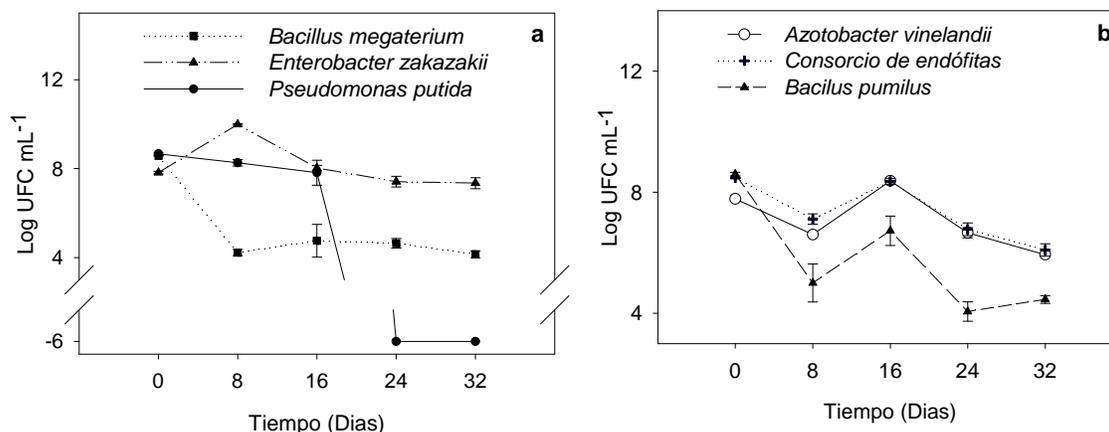


Fig. 17. Variación de las poblaciones de endófitas de *M. fraileana* incubadas en medio líquido con roca pulverizada durante 32 días. Los tratamientos control se encuentran marcados con asterisco. El tratamiento sin bacterias no mostró crecimiento en el medio.

c) Efecto de las bacterias endófitas de *M. fraileana* en el número de partículas de roca pulverizada en suspensión

El número de partículas presentes en el medio líquido después de 32 días de incubación con diferentes endófitas de *M. fraileana* mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el inicio y fin del experimento en cada uno de los cuatro intervalos de tamaño de partícula analizados (3-5 μm , 5-8 μm , 8-12 μm y 12 a 26 μm). Tales diferencias expresan un incremento en el número de partículas en todos los tratamientos inoculados con bacterias, incluyendo el control positivo. Por otro lado, el control sin bacterias no mostró diferencias en el número de partículas de los tres intervalos de menor tamaño (3-5 μm , 5-8

μm y 8-12 μm) pero si evidenció un aumento significativo en el intervalo de 12 a 26 μm . En general, la presencia de partículas más pequeñas fue mayor que el de partículas grandes, tanto en el tiempo cero como después de los 32 días de duración del experimento. Por ejemplo, al término del experimento, el mayor número de partículas estuvo presente en el intervalo de 3-5 μm , con niveles cercanos a 1×10^7 partículas/mL de suspensión de roca, mientras que las partículas de mayor tamaño oscilaron entre 1×10^2 partículas·mL⁻¹ y correspondió al intervalo de 12-26 μm .

Al restar el aumento de partículas del tratamiento sin bacterias a cada uno de los tratamientos, se observó que en la mayoría de los tratamientos fue consistente el efecto del inóculo bacteriano (Fig. 18, valores arriba de cada columna). El control positivo con *Bacillus pumilus* ES4 mantuvo una superioridad en el incremento de partículas respecto al tratamiento sin bacteria, cumpliéndose esto para todos los intervalos de diámetro de partícula analizados. En el intervalo de 3-5 μm , el incremento fue de un 29 % por arriba del tratamiento no inoculado; en el intervalo de 5-8 μm , el incremento fue de 107 %; en el intervalo de 8-12 μm el incremento fue de 531% y en el último intervalo de 12 a 26 μm se observó un aumento del 403% respecto al tratamiento sin bacteria.

En los tratamientos con endófitas, todos incrementaron el número de partículas significativamente. Sin embargo, sólo las endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA, *Bacillus megaterium* M2PCa y *Azotobacter vinelandii* M2Per reflejaron incrementos superiores a los del tratamiento sin bacteria. En orden descendente, la endófito *Azotobacter vinelandii* M2Per incrementó el número de partículas en: 89% (partículas de 3-5 μm), 161% (partículas de 5-8 μm), 271% (partículas de 8-12 μm) y 143% (12 a 26 μm) respecto al

tratamiento sin bacterias. Enseguida se observó a la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA, cuyos valores de porcentaje de aumento del número de partículas fueron 74% (partículas de 3-5 μm), 45% (partículas de 5-8 μm), 156% (partículas de 8-12 μm) y 317% (12 a 26 μm). Un patrón semejante fue encontrado para la cepa *Bacillus megaterium* M2PCa en donde se observaron incrementos considerables del 47% a partir de 5 μm y hasta 180% μm en el intervalo de 12 a 26 μm .

Por otro lado, el tratamiento inoculado con el consorcio de endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe, *Bacillus megaterium* M2PCa y *Azotobacter vinelandii* M2Per, mostró sólo aumento en los primeros dos intervalos de tamaño de partículas, siendo estos de 36 % (3-5 μm) y 10% (5-8 μm). Finalmente el tratamiento con *Enterobacter sakazakii* M2PFe, únicamente mostró un ligero aumento en la cantidad de partículas respecto al tratamiento sin bacteria: del 15% y 9%, en los intervalos de 8-12 μm y 12-16 μm , respectivamente.

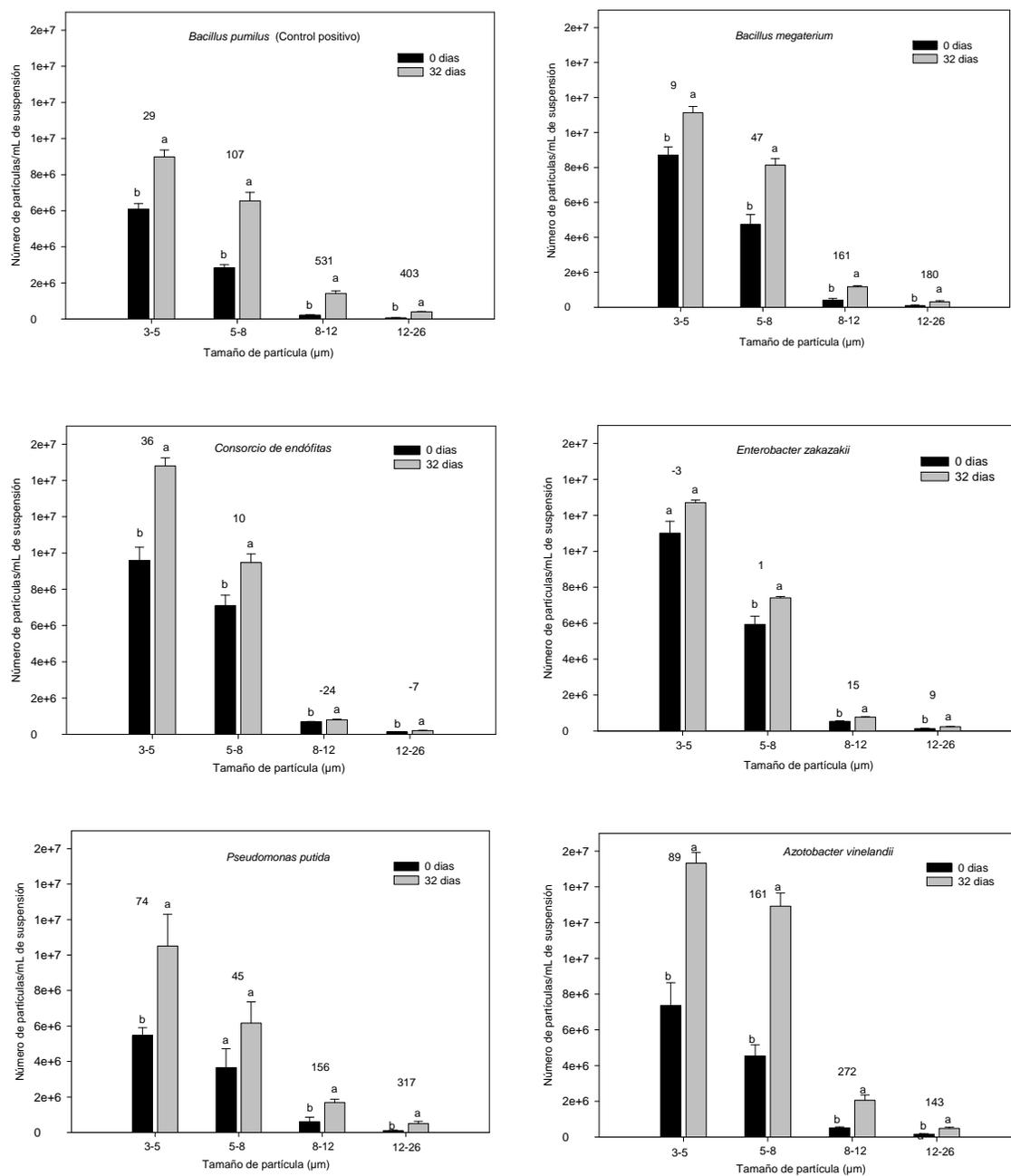


Fig 18. Reducción del tamaño de partículas de roca en suspensión por bacterias endófitas de *M. fraileana*. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el número de partículas del tiempo inicial y el tiempo final comparados mediante la prueba *t-Student*. Los valores arriba de cada columna indican el porcentaje bruto de aumento en el número de partículas respecto al tratamiento sin bacterias, por lo tanto valores negativos indican porcentajes menores que el tratamiento no inoculado. Las barras representan el error estándar (SE). Ausencia de barra representa SE insignificante.

2.7. DISCUSIÓN

2.7.1. Presencia natural de bacterias endófitas en la cactácea *M. fraileana*

La ocurrencia natural de las bacterias endófitas como un rasgo ubicuo entre las plantas (Lodewyckx *et al.* 2002) fue comprobado al detectar bacterias cultivables de raíz y tallo y bacterias no cultivables en semillas.

Se realizaron múltiples ensayos con diversos esquemas de desinfección y medios de cultivo pero no se obtuvieron bacterias cultivables en frutos, plántulas y semillas. De acuerdo con Hallmanm (2006) la colonización en órganos generativos como frutos y semillas puede llegar a ser tan baja que no es posible su detección por métodos cultivo-dependientes. Por otro lado, la técnica de desinfección y los métodos de cultivos podrían limitar la obtención de organismos cultivables. En ocasiones el grado de penetración del agente desinfectantes puede dañar a las poblaciones endofíticas (Micheé y Balandreau 2001; Hallman *et al.* 2006). Sin embargo, este no parece ser el caso, dado que la técnica de desinfección rutinaria en este trabajo basada en el uso de NaOCl al 1.5% durante 5 minutos fue probada en experimentos de germinación demostrando ser óptima para producir plántulas sanas, lo cual sugiere que se mantiene la integridad de la semilla y sus probables endófitas después del tratamiento de desinfección. En cuanto a los medios de cultivo, se sabe que medios generales como la soya tripticasa, utilizada en este trabajo, ofrecen buenos resultados para la recuperación de altas densidades de bacterias endófitas (Gardner 1982). Sin embargo, el uso de medios diluidos podría ser una alternativa (McInroy y Kloepper 1995; Elvira-Recuenco y Van Vuurde 2000) puesto que las sustancias del interior de las plantas no parecen representar un ambiente complejo y rico en nutrientes.

Ante la fuerte evidencia sobre la presencia natural de bacterias endófitas en semillas (Mundt y Hinkle 1976; McInroy y Kloepper 1995; Coombs y Franco 2003; Mano *et al.* 2006; Ferreira *et al.* 2008) y la existencia de transferencia vertical de endófitas de semillas a plántulas (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006) se exploraron herramientas cultivo-independientes para verificar la presencia de endófitas en semillas. A través de la tinción fluorescente para bacterias viables se encontraron densidades de bacterias endófitas de semilla que fueron superiores (2.44×10^6 bacterias·g⁻¹ de semilla) a los obtenidos por Puente (2009a), quien utilizando la misma técnica de tinción refiere niveles de 2.85×10^4 bacterias/g de semilla de cardón *Pachycereus pringlei*. A pesar de una relativa alta carga de bacterias endófitas en semillas de *M. fraileana*, la incapacidad de cultivo de estos microorganismos dificulta el conocimiento básico de su fisiología y probable interacción con la planta lo cual podría estudiarse mediante el uso de técnicas moleculares. Las evidencias cualitativas obtenidas mediante hibridación fluorescente *in situ* (Fig. 2) y microscopía electrónica de barrido (Fig. 3) indicaron una distribución de las bacterias endófitas en el interior del tejido de la semilla. Adicionalmente se encontró una mejor expresión de las bacterias endófitas en semillas en proceso de imbibición lo cual sugiere que las bacterias se activan paralelamente con la cadena de eventos que ocurren durante la germinación de la semilla.

Al evidenciarse fragmentos del 16S rDNA en muestras de semillas desinfectadas superficialmente, se confirmó definitivamente la presencia de bacterias en el interior de las semillas de *M. fraileana*. Si bien, la obtención de ADN de otras bacterias asociadas a las plantas resulta relativamente fácil, es necesario tener especial cuidado en la selección de primers cuando se trabaja con endófitas debido a la fuerte interferencia que puede

representar el 16S rDNA presente en organelos vegetales (Chelius y Triplett 2001; Van-Overbeek *et al.* 2006).

Se obtuvieron cepas cultivables de raíz a niveles poblacionales semejantes a los presentados en otros estudios. En raíces de plantas adultas de apariencia sana se observaron poblaciones bacterianas endófitas que oscilan entre 1.81×10^4 UFC·g⁻¹ peso fresco raíz hasta 1.20×10^{10} UFC·g⁻¹ peso fresco raíz. Dichos valores correspondieron a la densidad bacteriana del extracto crudo y del cultivo después de 35 horas de incubación del mismo. Al parecer, es frecuente que las bacterias endófitas cultivables aumenten sus poblaciones desde niveles no detectables hasta densidades considerables después de un tiempo de incubación de la muestra. Estos resultados sugieren que en la muestra fresca las bacterias estuvieron a niveles poco o nulamente detectables o en un estado fisiológico no cultivable (Adams y Kloepper 1996). Tomando en cuenta lo anterior y al hecho de que también se observó un aumento en la diversidad de morfotipos, se consideraría que la densidad real de las muestras podría ser mayor que la detectada inicialmente pero quizá no sea tan alta como la observada en la muestra incubada ya que en esta pudo estar expresado el crecimiento de las poblaciones iniciales. Además, se sabe que los niveles naturales de bacterias endófitas son relativamente bajos, quizá del orden de 10^5 CFU·g de raíz⁻¹ (Hallmann *et al.* 1997) y valores tan altos, del orden de 10^{10} CFU·g de raíz⁻¹ son más frecuentemente observados en bacterias patógenas (Tsiantos y Stevens 1986).

La densidad de bacterias endófitas fue mayor en las raíces que en el tallo. Considerando los valores más bajos de las poblaciones bacterianas recuperadas de raíz (1.81×10^4 UFC·g⁻¹ peso fresco raíz), resultan superiores a los observados en tallo (181.7

UFC g⁻¹ peso fresco de tallos). Estos resultados son congruentes con lo reportado por (Quadt-Hallmann y Kloepper 1996) quien menciona que las más altas densidades de bacterias endófitas se observan en las raíces y disminuyen progresivamente en sentido acropétalo y sugiriendo que el suelo es una fuente importante de bacterias endófitas (Lodewyckx *et al.* 2002).

Es probable que la abundancia y diversidad de bacterias endófitas se relacione con el grado de desarrollo del suelo. En el caso de este estudio el suelo estuvo representado por el suelo con incipiente desarrollo que se alcanza a formar alrededor de las raíces de *M. fraileana*. Al analizar las poblaciones de bacterias cultivables obtenidas de tallos se encontraron densidades de bacterias endófitas más altas ($282.5 \pm SE40.50$ UFC g⁻¹ peso fresco) las plantas creciendo entre el sustrato rocoso y suelo formado del habitat natural, que la de plantas creciendo estrictamente sobre roca ($181.7 \pm SE38.56$ UFC g⁻¹ peso fresco de tallos). Asumiendo un patrón semejante en las raíces y considerando la capacidad de *M. fraileana* para colonizar ciertas rocas (Lopez *et al.* 2009), se podrían asociar menores densidades poblacionales a estados tempranos de sucesión en rocas.

Entre las bacterias endófitas aisladas se diferenciaron 14 morfotipos por sus características coloniales y por su habilidad para crecer en diversos medios. A excepción de *Bacillus megaterium* M1PCa, todas las bacterias resultaron Gram negativas. La predominancia de bacterias endófitas Gram⁻ ha sido registrada en plantas cultivadas como la vid (Bell *et al.* 1995), cítricos (Gagné *et al.* 1997), algodón y maíz (McInroy y Kloepper 1994) encontrándose porcentajes que van desde el 75% hasta el 100%. Por otro lado el

estudio de 27 especies silvestres de pradera indica que el 70% de las bacterias endófitas dieron negativo en la tinción Gram (Zinniel *et al.* 2002).

De las cepas identificadas por secuenciación total del gen 16S rRNA se identificaron *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakazakii* por capacidades potenciales como en la degradación de compuestos inorgánicos y por su potencial como fijadoras de nitrógeno. Las dos últimas especies parecen constituir bacterias oportunistas patógenas para el hombre. Aunque es sabido que algunas cepas patógenas para el hombre difieren en la expresión de ciertas toxinas respecto de las cepas aisladas de plantas, es necesario indagar sobre el riesgo que pudieran representar para el hombre, ello como un prerrequisito para su uso en plantas de cultivadas.

2.7.2. Bacterias endófitas cultivables de *M. fraileana* con potencial para fijar nitrógeno

En la segunda aproximación de este trabajo se realizó la búsqueda de cepas cultivables con capacidad para fijar nitrógeno. De los 19 morfotipos diferenciados únicamente 4 presentaron potencial para fijar nitrógeno y fueron relativamente altos, incluso en los aislamientos de raíces sin corteza (6.63×10^{10} UFC) en aislamientos de raíces con corteza. De los cuatro morfotipos aislados con medio sin fuente de nitrógeno se encontró que solamente la cepa identificada como *Azotobacter vinelandii* M2Per mostró actividad de la nitrogenasa, enzima indicadora de fijación de nitrógeno. De acuerdo con otros estudios (Barraquio *et al.* 1997; Martínez *et al.* 2003), las endófitas fijadoras de N representan solo un pequeño porcentaje del total de la comunidad. En este estudio, la cepa fijadora de N₂ *Azotobacter vinelandii* M2Per representa el 5% del total de morfotipos

aislados de *M. fraileana*, sin embargo su eficiencia en la reducción de acetileno por célula (UFC) fue casi 17 veces lo obtenido para *Azospirillum brasilense*, cepa control. Debido a la magnitud de fijación de nitrógeno observada en *Azotobacter vinelandii* M2Per, es posible que su papel promotor del crecimiento en *M. fraileana* sea de alta relevancia.

2.7.3. Degradación de rocas riodacita por bacterias endófitas de *M. fraileana* y solubilización de fosfatos inorgánicos

La degradación de rocas por microorganismos asociados a las plantas es un proceso que promueve el crecimiento de las plantas. Los ácidos orgánicos, principalmente los de cadena corta producidos por el metabolismo de los microorganismos y/o de las plantas disuelven rocas beneficiándose ambos debido a que se producen compuestos inorgánicos asimilables (Hisinger *et al.* 1992; Chang Li 1998, Yamanaka 2003).

En los resultados de este trabajo se encontró que la mayoría de las bacterias endófitas pudieron mantener sus poblaciones en un medio con mínima adición de nutrientes para las bacterias, sugiriendo que las bacterias fueron capaces de realizar un metabolismo litotrófico.

En teoría, la producción de los ácidos disminuye el pH del medio, fragmentando las partículas a tamaños más pequeños y por lo tanto aumento el número de partículas suspendidas en el medio (Puente *et al.* 2006). Los iones hidrógeno de los ácidos presentes en la solución del suelo, como el ácido oxálico pueden intemperizar minerales silicatados sin la producción de bicarbonatos (Bormann *et al.* 1998).

En el caso del tratamiento en donde se mezclaron varias endófitas, es probable que los compuestos nitrogenados producidos por la endófito fijadora de nitrógeno *Azotobacter*

vinelandii, hayan servido como fuente de dicho nutriente para el resto del consorcio de bacterias endófitas. Esto puede confirmarse al observar que las curvas poblacionales del consorcio de endófitas y *Azotobacter vinelandii* tiene un comportamiento semejante en cuanto a su tendencia y nivel poblacional. Solo en el caso excepcional de la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA se registró una disminución dramática de la población a la tercera semana del experimento. Diversos factores pueden asociarse a este hecho pero quizá el más probable es que un agotamiento de los carbohidratos del medio haya limitado el mantenimiento de las poblaciones de esta endófito.

Al analizar las variaciones de pH en el medio se observó una marcada disminución del pH hacia el final del experimento. De acuerdo al modelo descrito anteriormente, las endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Bacillus megaterium* M2PCa que tuvieron marcada disminución de pH tendrían potencial para degradar rocas. Sin embargo en el análisis de número de partículas, únicamente dos de ellas, *Pseudomonas putida* M5TSA y *Bacillus megaterium* M2PCa mostraron un incremento constante en el número de partículas en el medio. La capacidad de *Pseudomonas putida* para degradar rocas a través de la producción de ácidos orgánicos ha sido reportada previamente (Puente *et al.* 2006).

Contrario a lo esperado, el tratamiento con la endófito fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* M2Per mostró un incremento constante del pH del medio el cual se acompañó por un aumento significativo en el número de partículas en todos los intervalos analizados, sobre todo en el intervalo de 3 a 8 μm . El aumento en el pH durante la degradación de minerales se ha relacionado con la producción de amonio, lo cual parece

plausible en una bacteria fijadora de nitrógeno y con la liberación de compuestos durante la muerte de los microorganismos (Liermann *et al.* 2000).

Se encontró que existe un patrón general que expresa un aumento del número de partículas en el medio. Este hecho fue observado en experimentos similares por Puente *et al.* (2006), quien encontró además una relativa disminución en el número de partículas de mayor tamaño. En este estudio se mantuvo un aumento en el número de partículas en los intervalos de partículas superiores (8-12 y 12-26), sugiriendo que las bacterias actuaron en gran medida sobre partículas de mayor tamaño (arriba de 26 μm) que dieron origen a partículas de menor tamaño. La diferencia significativa en el último intervalo (12-26 μm) del tratamiento sin bacteria se atribuyó al efecto de la agitación del medio.

Durante el crecimiento heterotrófico bacteriano, los metabolitos ácidos producidos pueden solubilizar óxidos, silicatos, carbonatos y minerales hidróxidos a través de reducción, acidólisis y mecanismos de acomplejamiento (Jain y Sharma 2004).

El proceso de degradación de rocas supone la liberación de elementos abundantes como el P, Na y K sin embargo, las rocas riodacitas utilizadas en este experimento son particularmente pobres en fósforo presentando concentraciones menores al 1% (Lopez *et al.* 2009). En este caso la degradación de roca supondría la intemperización de minerales silicatados a los cuales se asocian elementos como K, Na, Al, Fe, Mn, Ca y Mg. Entonces la capacidad de las endófitas podría estar asociada a la intemperización de dichos minerales más que a solubilización de fosfatos. Ello puede confirmarse al analizar los resultados de solubilización de CaPO_4 mostrados previamente (Capítulo II inciso 2.6.5.3) donde justamente las endófitas de *M. fraileana* *Pseudomonas putida* M5TSA y *Bacillus megaterium* M2PCa mostraron valores de solubilización de P relativamente bajos,

comparados, por ejemplo con la endófito *Enterobacter sakazakii*, la cual fue buena solubilizadora de fosfatos pero no presentó la misma capacidad para degradar roca riodacita.

2.8. CONCLUSIONES PARCIALES

- A través de métodos cultivo-dependientes y cultivo-independientes se confirmó la presencia de bacterias endófitas de *M. fraileana*.
- No se obtuvieron bacterias cultivables en semillas, frutos y plántulas, a pesar de que se realizaron múltiples ensayos con diversas técnicas de desinfección y medios de cultivo
- El uso de técnicas cultivo-independientes como amplificación del gen 16S rDNA, hibridación fluorescente in situ y tinción de bacterias viables indicó la presencia de bacterias endófitas en semillas a niveles poblacionales mayores a lo reportado en otras cactáceas. Las evidencias cualitativas indicaron una distribución de las bacterias endófitas en el interior del tejido de la semilla.
- Se obtuvieron cepas cultivables de tallo y raíz obteniendo niveles poblacionales en raíz semejantes a los presentados en otros estudios.
- Se aislaron 14 morfotipos de raíz entre los que destacaron *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakazakii* por capacidades potenciales para degradar compuestos inorgánicos y por su potencial como fijadoras de nitrógeno. Dichas bacterias fueron identificadas a través de la secuenciación total del gen 16S rRNA.

- Se comprobó la presencia y capacidad de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en raíces de *M. fraileana*. *Azotobacter vinelandii* M2Per fue la única cepa que endófito capaz de reducir acetileno. Dada la eficiencia de dicha bacteria se considera de alto potencial para promover el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno.
- Se verificó la presencia de bacterias endófitas de *M. fraileana* capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos entre las que destacaron *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Bacillus megaterium* M2PCa.
- Se comprobó la capacidad de las endófitas *Azotobacter vinelandii* M2Per *Pseudomonas putida* M5TSA y *Bacillus megaterium* M2PCa para degradar rocas riodacitas. Esto se observó a través del aumento de partículas *in vitro* pero se encontró que el efecto de fragmentación de roca se puede deber no sólo a acción de compuestos ácidos.
- Se concluye la presencia de bacterias endófitas en *M. fraileana* y que éstas poseen capacidad para promover el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno y/o la liberación de nutrientes producto de la degradación de rocas.

3. CAPÍTULO III

Efecto de la inoculación con bacterias endófitas en la intemperización de las rocas y en el crecimiento de *M. fraileana*

3.1. ANTECEDENTES

3.1.1. Bacterias endófitas promotoras del crecimiento vegetal

Es generalmente aceptado que las comunidades endófitas juegan un papel importante en la fisiología de su planta hospedante (Zhang *et al.* 2004). Es muy común que las plantas colonizadas por bacterias endófitas sean más sanas que las no inoculadas (Waller *et al.* 2005). Los efectos benéficos de las bacterias endófitas parecen ocurrir de a través de los mismos mecanismos que las bacterias benéficas de rizoplasma (Kloepper *et al.* 1991). Los mecanismos de promoción del crecimiento se presentan a través de forma directa o indirecta (Kloepper *et al.* 1991). La promoción directa supone la provisión directa de compuestos que sintetizan las bacterias para las plantas o la facilitación de la absorción de ciertos nutrientes del ambiente. Por otro lado, la promoción indirecta ocurre cuando las bacterias disminuyen o previenen el efecto negativo de uno o más organismos patógenos (Lodewyckx *et al.* 2002).

Entre las vías más conocidas para promover directamente el crecimiento vegetal se encuentra la fijación de nitrógeno atmosférico, la síntesis de sideroforos, que pueden solubilizar y secuestrar hierro del suelo, para proveerlo a las plantas, la síntesis de diversas fitohormonas, la solubilización de minerales como el fósforo para hacerlo más disponible para las plantas y la síntesis de compuestos de bajo peso molecular o enzimas que pueden

modular el crecimiento y desarrollo vegetal (Lodewyckx *et al.* 2002). Otros mecanismos recientemente registrados son la producción de sustancias volátiles promotoras del crecimiento vegetal como el 2-3 butanodiol y acetoina (Pirtilä *et al.* 2004).

Entre los efectos indirectos se reconoce la supresión de enfermedades por antagonismo de las bacterias endófitas contra microorganismos fitopatógenos (Bevinio *et al.* 1998), la producción de antibióticos contra fitopatógenos (Bangera y Thomashow 1996), la producción de enzimas, la competencia por nutrientes y nichos y la resistencia sistémica inducida (Glick 1995). Algunas bacterias endófitas también son capaces de suprimir la proliferación de nemátodos (Sturz y Kimpinski 2004), o incluso pueden producir paralelamente antibióticos y sideroforos *in vitro* (Sessithsch *et al.* 2004).

3.1.2. Mecanismos biológicos participantes en la intemperización de rocas

El intemperismo de rocas y suelo provee de los elementos esenciales para las plantas, excepto el nitrógeno y carbono (Hoffland *et al.* 2004). El intemperismo biológico involucra la participación de plantas superiores (April y Keller 1990; Hinsinger *et al.* 1998), líquenes (Krumbein 1983), hongos (Silverman y Muñoz 1970), cianobacterias, un gran número de bacterias (Lutz 1981; Shwartzman y Volk 1989; Hiebert y Bennet 1992), siendo común el establecimiento de asociaciones simbióticas entre bacterias y plantas (Layval *et al.* 1990; Danhorn y Fuqua 2007).

El intemperismo químico-biológico ocurre mediante mecanismos pasivos (respiración) y/o mecanismos activos (producción de ácidos orgánicos) (Boyle *et al.* 1974; Viles 1995; Puente *et al.* 2004a). Los ácidos producidos por el metabolismo de los microorganismos y/o de las plantas disuelven rocas beneficiándose ambos debido a que se

producen compuestos inorgánicos asimilables (Hisinger *et al.* 1992; Chang y Li 1998, Yamanaka 2003).

En muchas ocasiones, la solubilización de fosfatos de calcio, fierro y aluminio puede proveer del fósforo necesario para las plantas (Klumar y Narula 1999) debido a que las formas fosfatadas son abundantes en la mayoría de ambientes, aunque como tal no son disponibles para las plantas (Babenko *et al.* 1984; Watteau y Berthelin 1990; Raghothama 199). El uso de bacterias solubilizadoras de fosfato como inoculantes incrementa simultáneamente la absorción de fósforo y la productividad de las plantas. Entre los géneros más eficientes para solubilización de fosfatos se encuentran cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Rhizobium* (Rodríguez *et al.* 2006).

Durante el intemperismo de las rocas se liberan elementos minerales que pueden ser absorbidos por las plantas. El principal mecanismo para la solubilización de fosfatos es la producción de ácidos orgánicos. Las fosfatasas ácidas juegan el papel principal en la mineralización del fósforo orgánico (Rodríguez *et al.* 2006). Los microorganismos están implicados en la solubilización de fosfatos vía la producción de ligandos. Los iones hidrógeno de los ácidos presentes en la solución del suelo, como el ácido oxálico pueden intemperizar minerales silicatados sin la producción de bicarbonatos (Bormann *et al.* 1998).

Recientemente se ha encontrado que en la interacción entre la cactácea columnar *Pachycereus pringlei* y sus endófitas se liberaron cantidades considerable de nutrientes del sustrato que favorecieron el crecimiento vegetal, sugiriendo además la participación en la intemperización de rocas volcánicas en ambientes áridos (Puente *et al.* 2009a).

3.2. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias endófitas promueven un aumento en la productividad de cultivos, en la remoción de contaminantes, en la inhibición de patógenos, en la producción de nitrógeno y de metabolitos secundarios. Estos efectos pueden ayudar también a explicar el éxito de plantas silvestres en hábitats como las rocas, cuyas condiciones son especialmente difíciles. El establecimiento y permanencia de las especies vegetales da lugar a procesos de sucesión vegetal que conllevan a la formación de suelos. Durante la sucesión, el intemperismo de rocas o material parietal es un proceso fundamental para la génesis del suelo. En el intemperismo biológico se reconoce ampliamente el efecto directo de hongos micorrícicos y bacterias de rizoplasma, sin embargo poco se conoce de la participación de las bacterias endófitas en la intemperización de rocas.

El conocimiento integral del potencial de las bacterias *in vitro* y su efecto en la interacción con las plantas y los sustratos, proveerá de elementos para entender su papel en el establecimiento de *M. fraileana* en rocas y su contribución en la intemperización de rocas para la formación de suelo. Adicionalmente pueden representar una alternativa de bioinoculantes para otras plantas.

3.3. OBJETIVOS

3.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto de la interacción bacterias endófitas-plantas en la movilización de elementos minerales durante la intemperización de rocas y en el crecimiento de plantas de *M. fraileana*.

3.3.1. Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales hacia plantas de *M. fraileana*.
- Analizar los patrones de movilización de elementos minerales en sustratos con diferente patrón de abundancia de *M. fraileana* en su hábitat natural.
- Determinar el efecto en la producción de biomasa vegetal de la inoculación con bacterias endófitas de *M. fraileana*.
- Verificar la presencia y distribución de las bacterias endófitas inoculadas en diferentes tejidos vegetales de plantas de *M. fraileana*.
- Evaluar la capacidad de colonización y establecimiento de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de *M. fraileana*.
- Determinar el efecto de bacterias endófitas en la actividad fotosintética de plantas de *M. fraileana*.
- Evaluar el efecto de la interacción de bacterias endófitas en la producción de nitrógeno total en plantas.

3.4. HIPÓTESIS

Efecto de la interacción bacterias endófitas en la movilización de elementos de rocas.

H₁: La participación de las bacterias endófitas de *M. fraileana* en la intemperización de rocas se observará a través de una movilización de elementos minerales del sustrato hacia las plantas.

Patrones de movilización de elementos minerales y su relación con la abundancia de

M. fraileana en su hábitat natural. H₂: Las diferencias en la movilización de elementos producidas por bacterias endófitas pueden asociarse a diferencias en la composición mineral de los sustratos. Como se ha visto, existe una correlación entre la composición mineral del sustrato con variaciones en la abundancia de la especie (Lopez *et al.* 2009).

Colonización y establecimiento de bacterias endófitas reintroducidas en *M. fraileana*.

H₃: El carácter endofítico de las bacterias inoculadas en plantas de *M. fraileana* será evidente con la colonización y establecimiento exitoso de las bacterias en el interior de las plantas.

Efecto de las bacterias endófitas como potenciales promotoras del crecimiento vegetal

(PBGP). H₄: Bacterias endófitas de *M. fraileana* con capacidad para la degradación de rocas o fijación del nitrógeno tienen la capacidad para promover el crecimiento vegetal a través del incremento de la biomasa vegetal, de una mayor actividad fotosintética y de un mayor aporte de nitrógeno a la planta.

3.5. MÉTODOS

3.5.1. Efecto de las bacterias endófitas en la biomasa y en la movilización de elementos minerales hacia *M. fraileana*

3.5.1.1. Diseño experimental

Se estableció un diseño considerando como fuentes de variación a: 1) tipo de sustrato y 2) inóculos bacterianos. Para cada interacción sustrato-inóculo se realizaron 6 réplicas, siendo cada réplica una maceta. (Tabla 10). Dos réplicas fueron utilizadas para los estudios histológicos.

En el tipo de inóculo se consideraron 5 bacterias endófitas de raíz de *M. fraileana*: *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe, *Bacillus megaterium* M1PCa, y *Azotobacter vinelandii* y el consorcio de las cuatro endófitas. Entre los tratamientos control positivo se consideraron *Bacillus pumilus* ES4 por su capacidad para degradar roca (Puente 2004) y *Azospirillum brasilense* Cd como control positivo de bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB).

Para el sustrato se consideraron cuatro tratamientos que incluyeron dos tratamientos con roca pulverizada y dos controles. Los tratamientos con roca fueron: roca riolacita y brecha volcánica (mezcladas en las proporciones indicadas en la Fig.19) colectadas del sitio de estudio donde se registraron variaciones en la abundancia de *M. fraileana*. En los tratamientos controles, el tratamiento control negativo consistió en el uso exclusivo de perlita (Supreme Perlite, Portland, OR) únicamente para soporte de las plántulas. En el control positivo se utilizó perlita con riegos de solución nutritiva de Hoagland al 0.1% (Fórmula completa : 492 mg·L⁻¹ de MgSO₄, 0.6 mL de FeSO₄ al 0.5%+Acido tartárico al

0.4%, 1.81 mg·L⁻¹ de MnCl₂·4H₂O, 2.86 mg mg·L⁻¹ de H₃BO₃, 0.22 mg de ZnSO₄·5H₂O, 0.078 mg de CuSO₄·7H₂O, 0.1202 mg mg·L⁻¹ de NaMoO₄·H₂O, 1.8 mg·L⁻¹ de CaCl₂, 16 mg·L⁻¹ de KSO₄, 0.5 mg·L⁻¹ de K₂HPO₄, 100 mg·L⁻¹ de KNO₃ y 3 mg·L⁻¹ de Ca(NO₃) · 4H₂O).

Tabla 10 Diseño experimental para evaluar el efecto bacterias endófitas-planta en la movilización de elementos minerales

| S U S T R A T O S | | | | |
|--|---|---|---|---|
| I N Ó C U L O | CONTROL NEGATIVO Perlita + riego con agua estéril (1:1 Agua potable + agua desionizada) | CONTROL POSITIVO Perlita + Solución Hoagland al 10 % | Mezcla de perlita +Roca riolacita pulverizada+ riego con agua estéril (1:1 Agua potable + agua desionizada) | Mezcla de Perlita + Brecha volcánica pulverizada + riego con agua estéril (1:1 Agua potable + agua desionizada) |
| Control negativo Solución <i>PBS</i> sin inocular | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Control positivo solubilizador de rocas <i>Bacillus</i> <i>pumilus</i> ES4 | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Endófito de <i>M.</i> <i>fraileana</i> <i>Enterobacter</i> <i>sakazakii</i> M2PFe | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Endófito de <i>M.</i> <i>fraileana</i> <i>Bacillus</i> <i>megaterium</i> M1PCa | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Endófito de <i>M.</i> <i>fraileana</i> <i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> 1 M5TSA | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |

... Cont. Tabla 10

| | | | | |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Consortio de bacterias endófitas <i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe, <i>Bacillus megaterium</i> M1PCa, <i>Pseudomonas putida</i> M5TSA y <i>Azotobacter vinelandii</i> M2Per | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Endófitas de <i>M. fraileana</i> Fijadora de nitrógeno <i>Azotobacter vinelandii</i> M2Per, <i>Bacillus</i> | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |
| Control positivo fijador de Nitrógeno <i>Azospirillum brasilense</i> Cd | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) | 6 réplicas (macetas) |

3.5.1.2. Preparación del sustrato

Se tamizó perlita granulada a tres tamaños de partícula: a) Partícula < 0.53 mm, b) Partículas de 0.53-0.85 mm y c) Partículas de 0.85 mm–1.4 mm. Se prepararon mezclas de perlita a diferentes tamaños de grano y se esterilizaron por autoclave. El resto del material utilizado también fue esterilizado con alcohol etílico al 70% (macetas) o en autoclave (algodón). En condiciones de esterilidad ambiental, el sustrato fue vertido en capas en las macetas simulando condiciones semejantes a las que se esperarían en sustrato rocoso, es decir, tamaño de partícula mayor en la capa superior (Fig. 19). En total se utilizaron 8 g de perlita por maceta y en los tratamientos con roca se agregó un gramo de roca pulverizada a 74 micras. El polvo de roca fue agregado en la capa superficial del sustrato y se mezcló

ligeramente. Con la aplicación de los riegos la roca pulverizada fue distribuyéndose homogéneamente en el sustrato soporte (perlita).

Las macetas fueron colocadas individualmente en cámaras de crecimiento elaboradas con recipientes plásticos previamente desinfectados con alcohol étílico al 70% (Fig. 19).

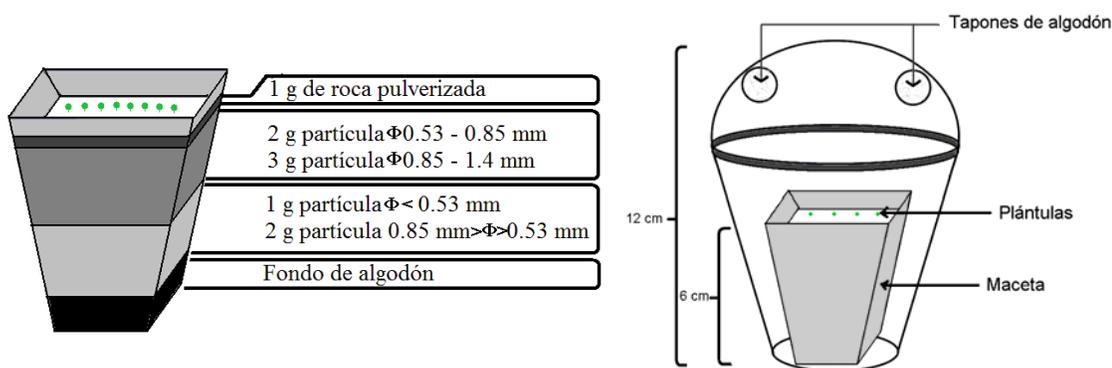


Fig. 19. Distribución vertical de partículas de sustrato en las macetas y diseño de microcámaras de crecimiento.

3.5.1.3. Obtención de plántulas

Se desinfectaron superficialmente lotes con 0.35 g de semillas mediante el siguiente procedimiento: a) Agitación en Tween 20 al 2% durante 30 minutos, b) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 1.5 % durante 5 minutos y d) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril. Para verificar la efectividad de la desinfección, grupos de 100 semillas fueron colocados en agar soya tripticasa al 2% e incubadas durante al menos una semana a 30°C.

Las semillas para germinación fueron colocadas en cajas Petri conteniendo agar nutritivo al 1% e incubadas en cámara de crecimiento (incubadora modelo 815, Precision

Scientific, Chicago, IL) a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% HR, con fotoperiodo de 8 h dia^{-1} y a una intensidad luminosa de $10\pm 2 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Las plántulas obtenidas de esta manera estuvieron superficialmente libres de bacterias cultivables (Fig 20a).

3.5.1.4. Trasplante y aclimatación de las plantas al invernadero

A los 2.5 meses de edad y en condiciones de esterilidad, un promedio de 20 plántulas fueron transferidas a las macetas conteniendo sustrato de acuerdo al tratamiento correspondiente. Las macetas fueron colocadas individualmente en las microcámaras de crecimiento (Fig 2b) y después fueron transferidas al invernadero. Temperatura diurna $25\pm 5^{\circ}\text{C}$, temperatura nocturna $17\pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo promedio de 11 h con luz natural o artificial entre 340 a $370 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

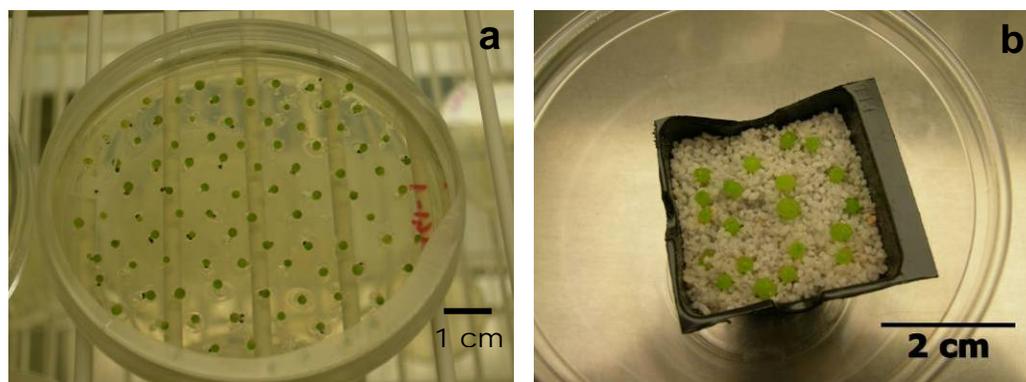


Fig. 20. Obtención de plántulas superficialmente estériles y su trasplante a cámaras de crecimiento axénicas. a) Plántulas de un mes de edad creciendo en agar nutritivo al 1%, b) Plántulas transplantadas a perlita a los 2.5 meses de edad.

3.5.1.5. Inoculación

Después de 15 días de aclimatación de las plantas en el invernadero, se inocularon con 1 mL de suspensión bacteriana ($\text{DO}_{540 \text{ nm}}=1$ que equivale a una concentración celular

de 1×10^9 células \cdot ml⁻¹) de la cepa correspondiente. La inoculación se realizó con una jeringa y a través del tapón de algodón en la micro-cámara de crecimiento. Previo a la inoculación se humedeció el sustrato con la solución del riego, según el tratamiento en cuestión.

Los riegos subsecuentes fueron administrados quincenalmente aplicando 7 mL de la solución estéril del riego: a) Agua potable diluida 1:1 con agua desionizada para el tratamiento con perlita y para los tratamientos adicionados con roca o, b) Solución Hoagland al 10% para el tratamiento control positivo.

3.5.1.6. Determinación de producción de biomasa de plantas de *M. fraileana*

Las plantas fueron cosechadas a los 5.5 meses después de iniciarse el tratamiento con bacterias inoculadas. Para remover las plantas se humedeció previamente el sustrato con agua desionizada. Se extrajeron cuidadosamente las plantas tratando de obtener la raíz completa. Las partículas de sustrato adherido a las raíces fueron desprendidas remojando las plantas en agua desionizada y utilizando pinzas de disección. Las plantas fueron secadas en papel filtro y posteriormente secadas a 60 °C durante 5 días, después se registró el peso de todas las plantas cosechadas.

3.5.1.6.1. Análisis estadístico

Debido a que el crecimiento natural de las plantas es lento, el peso seco obtenido fue del orden de miligramos por réplica. Por lo tanto, los valores de peso seco por replica (macetas con número variable de plantas) fueron ponderados para expresarse como el peso

de 1000 plantas. Los datos de peso seco fueron analizados por ANOVA de una vía y comparados por la prueba Tukey ($p > 0.01$).

3.5.1.7. Determinación de la proporción relativa de elementos minerales en plantas

Las plantas secadas a peso constante fueron molidas en tubos *ependorf* de 1.5 mL utilizando un pistilo de vidrio esmerilado. Para el microanálisis, pequeñas cantidades del pulverizado de planta fueron montadas en soportes de aluminio con cinta adherente. Se determinó el perfil de composición relativa de Al, C, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, P, Si y Zn utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi S-3000N equipado con detector de rayos X, Oxford, Inca 2000. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: 20 KV (Voltaje de aceleración), distancia de trabajo 15 mm, área de análisis de $800 \mu\text{m} \times 1200 \mu\text{m} \times 3 \mu\text{m}$ de espesor.

3.5.1.7.1. Análisis estadístico

Se analizaron y compararon datos de la proporción relativa de los elementos minerales presentes en las plantas, sin considerar al C y N. Los datos requirieron transformación arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción relativa de cada elemento. Para cada elemento se hicieron ANOVAs de una vía respecto a los inóculos dentro de cada tratamiento de sustrato.

Para analizar los patrones de movilización de elementos minerales respecto a los sustratos se consideraron las interacciones de elementos e inóculos en donde fue evidente el

efecto de alguna cepa y se comparó la proporción del elemento en los cuatro sustratos analizados.

3.5.2. Localización de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de *M.*

***fraileana* y su distribución dentro de las plantas**

La localización de las bacterias se realizó a los 3.5 meses de que las plantas fueron inoculadas. Las cámaras microambientales con las plantas en su interior fueron trasladadas del invernadero al laboratorio. En condiciones de esterilidad las cámaras fueron abiertas para tomar muestras representativas de cada uno de los 8 tratamientos establecidos en invernadero. Se hicieron muestras compuestas de 17 plantas por tratamiento las cuales se dividieron en diferentes cantidades para su procesamiento en inmunolocalización por microscopía fluorescente, en microscopía electrónica de barrido y para cuenta viable de unidades formadoras de colonia. Para remover las plantas se humedeció previamente el sustrato con agua desionizada estéril. Luego, se extrajeron cuidadosamente las plantas tratando de obtener la raíz completa. Las partículas de sustrato adherido a las raíces fueron desprendidas remojando las plantas en *PBSNa* (0.002 M, pH=7.2) y utilizando pinzas de disección.

3.5.2.1. Desinfección superficial de plantas para detección de bacterias endófitas reintroducidas

Este tratamiento se aplicó a todas las plantas utilizadas para detección y conteo de bacterias endófitas. El tratamiento de desinfección se realizó con material estéril y en condiciones axénicas bajo el siguiente procedimiento: 1) agitación durante 35 minutos en

una solución 1:1 de Cloramina al 2% y Tween-20 al 2%, 2) 5 enjuagues descargando con una pipeta un volumen de 10 ml sobre las plantas colocadas en una coladera estéril, 3) Inmersión en alcohol 70% durante 30 segundos y 4) Breve enjuague con ddH₂O estéril. Las plantas fueron secadas en campana de flujo laminar, colocándolas en papel filtro estéril durante 5 min.

3.5.2.2. Capacidad de colonización y establecimiento de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de *M. fraileana*

3.5.2.2.1. Conteo de bacterias endófitas reintroducidas en plántulas de *M. fraileana*

Se utilizaron 5 plantas desinfectadas superficialmente como se indicó en el inciso anterior (inciso **3.5.2.1**). Las plantas fueron secadas en campana de flujo laminar, colocándolas en papel filtro estéril durante 5 min y posteriormente fueron transferidas a tubos *ependorf* para registrar su peso fresco. Enseguida se agregaron 0.5 mL de *PBSK* (0.002 M, pH = 7.2) y se maceraron las plantas durante 3 min utilizando un pistilo de vidrio esmerilado, el macerado se agitó con vórtex durante 5 s y se procedieron a hacer diluciones seriadas del macerado crudo. Algunas diluciones fueron sembradas por extensión en placa utilizando medio Rennie para el tratamiento donde estuviera involucrada la cepa *Azotobacter vinelandii* M2Per y agar soya tripticasa para crecer el resto de las cepas. Las cajas Petri de cada uno de los tratamientos se incubaron a 30 ±1°C hasta la visualización de las colonias de bacterias. Se evaluó cuenta viable a las 48 h y 72 h. Este último periodo fue para los tratamientos con *Azospirillum brasilense* Cd y *Azotobacter salinestris* M2Per.

3.5.3. Preparación de plantas para localización de bacterias endófitas por microscopía electrónica de barrido

Del experimento de movilización de elementos minerales se realizaron dos réplicas adicionales para histología. Un total de 5 plantas por tratamiento fueron desinfectadas superficialmente y secadas como se indica en el inciso **3.5.2.1**. Para este procedimiento se obtuvieron inicialmente cortes histológicos incluidos en parafina los cuales fueron posteriormente desparafinados para su observación al microscopio electrónico de barrido.

Fijación: Las plantas fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2.5% en *PBSNa* (0.1 M, pH=7.4), primero en agitación a 100 rpm durante 24 h y posteriormente durante 15 minutos aplicando pulsos de vacío hasta dejar de observar burbujas en la solución del fijador. Luego, las plantas se enjuagaron tres veces con el *PBSNa* (0.1 M, pH=7.4).

Deshidratación: Las plantas se sumergieron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (50%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%) manteniendo las plantas durante una hora en las concentraciones del 50% al 90%; toda la noche en la solución al 96% y durante 2 h en la concentración al 100%. Al final se sumergieron las plantas durante 20 min. en alcohol absoluto:xilol 100% (V/V) y finalmente en xilol al 100% durante 7-10 minutos.

Infiltración e inclusión en parafina: Este paso se realizó a temperatura de 55-60 °C. Las plantas se colocaron en una mezcla 1:1 de parafina:xilol al 100% durante 25 min. Posteriormente se sumergieron en 4 concentraciones crecientes de parafina líquida y xilol manteniendo las plantas de 1-2 horas en cada concentración. Por último se colocaron en moldes plásticos y enfriados a 4°C.

Corte: Los bloques conteniendo las plantas incluidas fueron microseccionados a $4\pm 1\mu\text{m}$. Los cortes fueron extendidos en baño maría con formalina al 4% y montados en portaobjetos.

Desparafinación: La parafina de los cortes fue removida mediante dos cambios de 10 min. cada uno en solución de xilol al 100%. El xilol se removió mediante inmersión en alcohol etílico a concentraciones decrecientes (100%, 95% y 50%) durante 3 min. en cada concentración.

Recubrimiento con Oro-Paladio. Los portaobjetos fueron recubiertos con una mezcla en proporción 60%:40% de oro:paladio (Edwards S150B). Posteriormente se colocaron en soportes de aluminio. Los cortes de las plantas fueron analizados en el microscopio electrónico de barrido (AmRay 3300FE field emission scanning electron microscope, Advanced Metals Research Corp., Bedford, MA, USA).

Adicionalmente se observaron plantas provenientes de semillas desinfectadas con NaOCl de acuerdo al procedimiento descrito en el inciso 2.5.2.3 (Capítulo II) y plantas sin inocular. En bloques separados, las plantas fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5% en *PBSNa* (0.1 M, pH=7.4) aplicando pulsos de vacío, enjuagadas con *PBSNa* (0.1 M, pH=7.4), deshidratadas en concentraciones crecientes de alcohol etílico (50%, 70%, 90% y 100%), durante dos horas en cada concentración. Enseguida, las plantas fueron llevadas a punto crítico de secado con CO₂ mediante el secador de punto crítico CPD020 (Balserz Union Limited). Después se colocaron las plantas sobre portamuestras de aluminio y se cubrieron con una mezcla en proporción 60%:40% de oro:paladio (Edwards S150B). Las plantas fueron examinadas en el microscopio electrónico de barrido (AmRay 3300FE field

emission scanning electron microscope, Advanced Metals Research Corp., Bedford, MA, USA).

3.5.4. Purificación de anticuerpos para inmunolocalización de bacterias endófitas

Se produjeron anticuerpos policlonales de conejo como se describe en el ANEXO II. Para la purificación de IgG los sueros fueron descongelados a temperatura ambiente y posteriormente se purificaron con las columnas de afinidad G PROSEP- G Media (Millipore), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. La concentración de los anticuerpos purificados se estimó por espectrofotometría a 280 nm. Los anticuerpos fueron finalmente concentrados y almacenados en glicerol al 50% a -20° C como recomienda el protocolo del kit G PROSEP-G Media mencionado previamente (Tabla 11).

Tabla 11 Concentración de los anticuerpos purificados.

| Antígeno | Concentración |
|---|---------------|
| <i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | 850 µg/mL |
| <i>Bacillus megaterium</i> M1PCa | 461 µg/mL |
| <i>Bacillus pumilus</i> ES4 | 396 µg/mL |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe | 900 µg/mL |
| <i>Azospirillum brasilense</i> | 180 µg/mL |
| Testigo negativo (Conejo no inmunizado) | 461 µg/mL |

3.5.5. Preparación histológica de plantas para inmunolocalización fluorescente de bacterias endófitas reintroducidas en *M. fraileana*

Los procedimientos histológicos de este apartado se realizaron en el laboratorio de Microtecnia Vegetal del Departamento de Fitopatología de la Universidad Estatal de Oregon.

Las plantas fueron desinfectadas superficialmente como se indica en el inciso **3.5.2.1**. Se consideraron dos plantas por cada tratamiento, cada una fue seccionada longitudinalmente a la mitad para favorecer una mejor penetración del fijador. El procedimiento histológico de fijación e inclusión utilizado se describe a continuación.

Fijación: La fijación se realizó con Paraformaldehído (PFA) al 2.5% en *PBSNa* (0.1 M, pH 7.2) a temperatura ambiente alternando pulsos de vacío. Después, las plantas fueron mantenidas en PFA a 4°C durante toda la noche y posteriormente enjuagadas tres veces con *PBSNa* (0.1 M, pH 7.2).

Deshidratación: Las plantas se sumergieron en concentraciones crecientes de acetona (70%, 95% y 100%) manteniendo las plantas 2 horas en cada concentración.

Pre-infiltración: Se realizó la preinfiltración al vacío durante 30 min., colocando las plantas una solución 1:1 de acetona al 100% mezclado con glicol-metacrilato, Technovit 7100 (Electron Microscopy Sciences, USA) y a temperatura ambiente. Después se dejaron las plantas en la misma solución durante 4-5 horas a 4°C.

Infiltración directa: Se infiltró la solución pura del glicol- metacrilato, Technovit 7100 (Electron Microscopy Sciences) por vacío durante 30 min. a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvo durante la noche a 4°C.

Inclusión y polimerización: Se colocaron las plantas en moldes de polietileno que después fueron llenados con metacrilato y endurecedor Technovit 2100. Los moldes fueron sellados colocando fragmentos de *parafilm* sobre la solución de polimerización cuidando de no dejar burbujas. La polimerización se logró a 4°C durante 48 h aproximadamente.

Corte: Se utilizó un microtomo rotatorio 3293 Spencer Lens con navaja de acero (Dorn/Hart Microedge), obteniéndose secciones de tejido de 4 ± 1 μm . Los cortes fueron

montados en portaobjetos SuperFrost Plus GOLD con una gota de agua para lograr la extensión del tejido. Los portaobjetos fueron almacenados a 4°C hasta la inmuno-tinción fluorescente.

3.5.5.1. Inmuntinción fluorescente de secciones de plantas con bacterias endófitas

Portaobjetos con cortes de plantas provenientes de los tratamientos inoculados con *Pseudomonas putida* M5TSA, *Bacillus megaterium* M1PCa, *Bacillus pumilus* ES4, *Enterobacter sakazakii* M2PFe, *Azospirillum brasilense* y de plantas sin inocular fueron sometidos al proceso de inmuno-tinción de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1) Sobre el corte del tejido vegetal se colocaron 50 μL de solución de *PBS solución de bloqueo* (0.1% de Tween-20, 1.5% de Glicina, 2% de suero de albúmina de bovino BSA (BioLabs) y 3% de suero de cabra (SIGMA).
- 2) Se realizó un lavado del corte con 100 μL de *PBS solución de lavado* (solución para 100 mL de *PBS*: 250 μL de Tween-20 y 800 mg de BSA).
- 3) Los cortes se enjuagaron con 300 μL de *PBSNa-K* ($8.76 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl, 0.2 g/L de KCl, $1.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 y $0.45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de KH_2HPO_4)
- 4) Se diluyó cada uno de los anticuerpos primarios en proporciones variables de antígeno y *PBSNa-K*, de acuerdo a la recomendación de Griffiths (1993): *Pseudomonas putida* M5TSA, *Bacillus megaterium* M1PCa y *Enterobacter sakazakii* M2PFe se diluyeron 1:50; *Bacillus pumilus* 1:25; *Azospirillum brasilense* 1:3, y los anticuerpos del conejo control negativo se diluyeron 1:4. Se colocaron 50 μL del anticuerpo primario correspondiente sobre el corte y se incubaron durante 90 min. a 37°C en cámaras húmedas. Las cámaras húmedas consistieron en cajas petri en cuyo interior se colocó papel toalla humedecido con *PBSNa-*

K. Se utilizó una cámara húmeda por cada portaobjetos. Se consideraron pruebas cruzadas entre tratamientos incluyendo cortes de muestras inoculadas vs anticuerpos de conejos sin inmunizar

5) Se hicieron dos enjuagues del corte utilizando 100 μ L de *PBS alto en sales* (solución para 100 mL de *PBS*: 2 g de NaCl, 250 μ L de Tween-20 y 100 mg de BSA). Cada enjuague se dejó reposar durante 10 min.

6) Se enjuagaron brevemente los cortes con 300 μ L de *PBS solución de lavado*.

7) A partir de este paso se trabajó en condiciones de luz baja. Se diluyó el anticuerpo secundario 1:500 en *PBSNa-K*. Se utilizó el anti-conejo IgG (H+L) de cabra etiquetado con el fluorocromo TAMRA-ANASPEC (excitación a 555 nm, emisión a 580 nm). Sobre el corte se agregaron 100 μ L del anticuerpo marcado y se incubaron durante 90 min. a 37 °C en cámara húmeda.

8) Se enjuagaron dos veces los cortes con *PBSNa-K*, manteniendo cada enjuague durante 10 min. Los cortes se enjuagaron tres veces más con H₂O dd durante ciclos de 5 min.

9) Se dejaron secar los cortes. Una vez secos, cada corte se cubrió con Cytoseal 60 (Electron Microscopy Sciences), se colocó el cubreobjetos y se dejó para su observación al día siguiente.

3.5.5.2. Inmunolocalización de bacterias por microscopía confocal y microscopía epifluorescente

Las observaciones de Microscopía Confocal Fluorescente se llevaron a cabo en las instalaciones de Microscopía Confocal del Centro para Investigación Genómica-Biocomputación y Centro de Ciencias Ambientales y de Salud de La Universidad Estatal de

Oregon, EUA. Se utilizó el Microscopio *Confocal* Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta y el programa *LSM 3.2*. Las observaciones se complementaron con observaciones en microscopio compuesto de epifluorescencia LEICA-DMRB equipado con lámpara de Argón (ARCLAMP-LEP) utilizando el filtro TRITC 41002a (535/50 nm, 620/50 nm) (Chroma Technology Corp) para evidenciar la fluorescencia del fluorocromo y el filtro GFP-BP 41017 (470/10 nm, 525/50 nm) (Chroma Technology Corp) para contrastar la fluorescencia de la planta. Esta última actividad se realizó en el Departamento de Botánica y Patología Vegetal (Universidad Estatal de Oregon, EUA).

3.5.6. Efecto de la interacción bacterias endófitas en el crecimiento de plantas de *M. fraileana*

3.5.6.1. Diseño del experimento

Se estableció un experimento consistente en el crecimiento de plantas en sustrato mezclado con roca riodacita bajo cinco tratamientos de tipo de inóculo. Se utilizaron como control negativo a *Bacillus subtilis* y un tratamiento blanco (sin aplicación de bacterias). El control positivo fue la bacteria PGPB *Azospirillum brasilense* Cd. Se probaron dos endófitas de raíz de *M. fraileana*, la bacteria *Pseudomonas putida* M5TSA y *Azotobacter vinelandii* M2Per fijadora de nitrógeno.

3.5.6.2. Preparación del sustrato y diseño de cámaras de crecimiento.

Se preparó sustrato perlita (Thermo-o-Rock, West Inc. Az, USA) con tamaño de partícula menor a 1 mm. El sustrato fue mezclado con roca riodacita pulverizada (a 74 μm),

siendo el 13% del peso total del sustrato constituido por roca. El sustrato fue esterilizado por autoclave.

Las cámaras de crecimiento donde se establecieron las plantas desde la germinación estuvieron representadas por cajas Petri de poliestireno con dimensiones de 23 cm×23 cm y 10 mm de altura (Fig. 3). En condiciones de esterilidad el sustrato fue vertido en las cámaras de crecimiento previamente desinfectadas con alcohol al 75%.

3.5.6.3. Obtención de plántulas

Se desinfectaron superficialmente lotes de 0.36 g de semillas (aproximadamente 2300 semillas) mediante el siguiente procedimiento: a) Agitación en Tween-20 al 2% durante 30 minutos, b) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril, c) Agitación con solución de NaOCl al 1.5% durante 5 minutos y d) 10 lavados enjuagues con agua destilada estéril. Para verificar la efectividad del tratamiento de desinfección, lotes de 100 semillas fueron colocados en agar soya tripticasa al 2% e incubadas durante al menos una semana a 35°C.

Para inducir la germinación de las semillas fueron distribuidas directamente sobre el sustrato de perlita + roca regado a saturación. Cada lote de 0.35 g de semillas desinfectadas fue colocado en una cámara de crecimiento, parcialmente sellada con *parafilm*. Se consideraron seis réplicas por tratamiento donde cada réplica estuvo conformada por dos cámaras de crecimiento. Desde la germinación las cajas Petri se colocaron en cámaras de crecimiento CONVIRON 125 y CONVIRON CMP 3244 (Canadá) a las siguientes condiciones de incubación: 25°C, 55% de HR y fotoperiodo ajustado a 6 h día⁻¹ a 10±2 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.5.6.4. Inoculación

Las plántulas fueron inoculadas al mes de edad. Sobre el sustrato húmedo de cada caja Petri se dispersó, con micropipeta, un volumen de 4 mL de suspensión bacteriana a una concentración celular de 1×10^9 células·mL⁻¹. En el tratamiento blanco se aplicó únicamente *PBSK* (pH 7.2, 0.002 M). Después de la inoculación se aplicaron riegos quincenales con 5 mL de agua destilada estéril, bajo campana de flujo laminar.

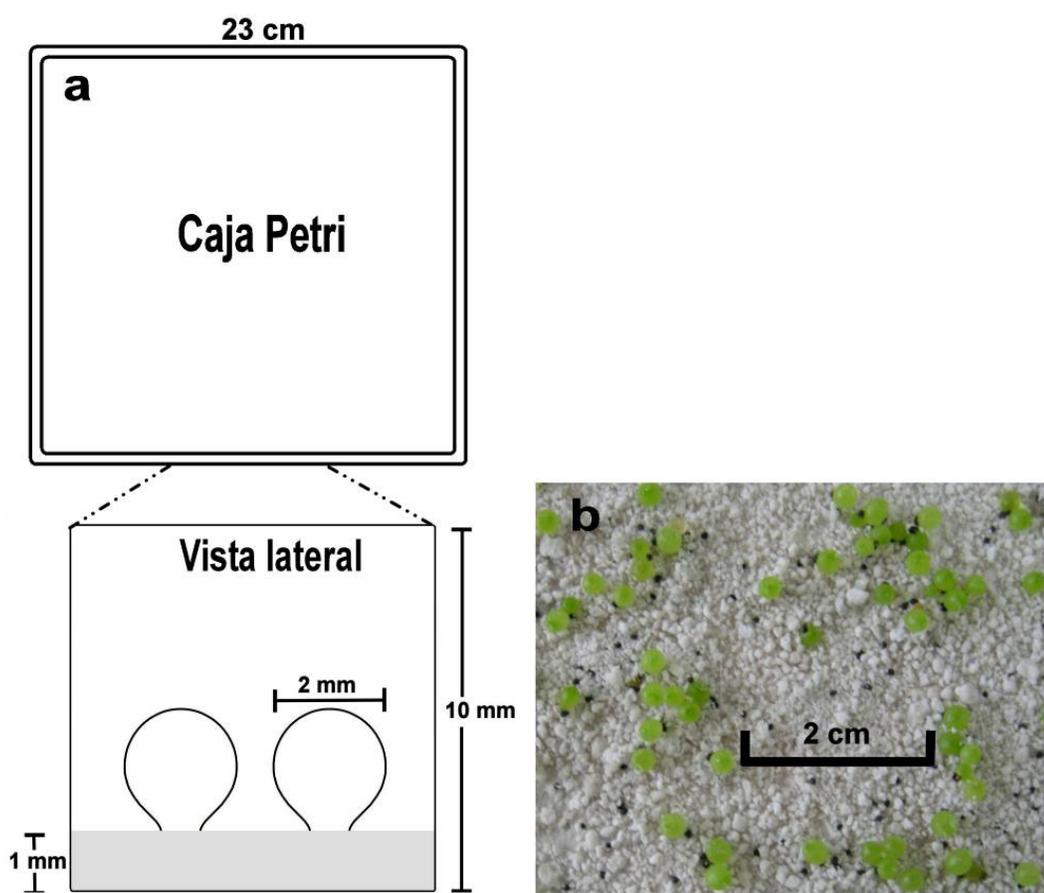


Fig. 21. Cámaras de crecimiento utilizadas para determinar el efecto de la interacción bacterias endófitas-plantas en el crecimiento de *M. fraileana*. a) Cajas Petri de poliestireno (23cm×23cm×1cm) constituyeron microcámaras de crecimiento. b) Visualización de las plantas en el interior de las cajas Petri.

3.5.7. Efecto de bacterias endófitas en la actividad fotosintética de plantas *M.*

fraileana

3.5.7.1. Determinación de la acidez titulable en tejido fresco de plantas de *M.*

fraileana.

A los 5.5 meses de inoculación, se colectaron muestras compuestas de cada réplica dentro de cada uno de los tratamientos. La colecta de plantas se realizó en dos momentos, por la mañana de 6:00 a 8:00 am y por la tarde, de 6:00 a 8:00 pm. Se colectaron plantas completas para acumular 0.2 g de peso fresco por réplica y se colocaron en tubos *ependorf* conteniendo 1 mL de alcohol etílico al 60%. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta el momento de la determinación de acidez tisular. La concentración de ácidos orgánicos totales fue determinada siguiendo una versión modificada del método de Zotz y Andrade (1998). Las muestras fueron maceradas utilizando un homogenizador manual de vidrio con pistilo esmerilado y llevadas hasta un volumen de 20 mL con alcohol etílico grado reactivo al 60%. Enseguida la muestra fue filtrada aplicando vacío moderado (15-20 cm Hg) y posteriormente se llevó a ebullición durante 6 minutos y se dejó enfriar. El extracto así obtenido fue titulado con NaOH 0.010 N. Los resultados indicaron la concentración total de ácidos en la muestra y fueron expresados en milimoles de iones H^+ · g de peso fresco de planta.

3.5.7.2. Análisis estadístico

Los valores de acidez diurna fueron restados de los valores nocturnos para obtener el incremento de acidez titulable el cual fue analizado por ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$).

3.5.8. Efecto de la interacción bacterias endófitas en la producción de nitrógeno total en plantas

A los 4 meses de la inoculación se colectaron muestras compuestas de las plantas de cada tratamiento. La planta, con su parte aérea y raíz, fueron desprendidas cuidadosamente del sustrato y lavadas ligeramente con agua corriente para eliminar partículas remanentes de sustrato. Al final se aplicaron enjuagues con agua destilada. Seis muestras por tratamiento fueron secadas durante 3 días a 55°C . Las plantas secas fueron colocadas en tubos *ependorf* y molidas con una microespátula de acero inoxidable. Muestras de 0.5 g de peso seco fueron analizadas para nitrógeno total por la técnica micro-Kjeldahl después de la digestión de la muestra (Digestion System 12.1009, y Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator, Höganäs, Sweden).

3.5.8.1. Análisis estadístico

La cantidad de N total fue analizado por ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y por la prueba Tukey ($\alpha = 0.05$).

3.6. RESULTADOS

3.6.1. Movilización de minerales hacia *M. fraileana* como resultado de su asociación con bacterias endófitas

La movilización de elementos hacia las plantas fue expresada a través de la proporción relativa de elementos minerales determinados en plantas. Los resultados que se presentan a continuación fueron resultado de ANOVAs de una vía de los datos transformados (arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción relativa de cada elemento cuantificado en las plantas y por cada sustrato). Los ANOVAs se reportan a $p < 0.02$ y las comparaciones Tukey a un nivel $\alpha = 0.05$.

Se observó efecto sobre el contenido de elementos minerales en plantas debidos a la inoculación con bacterias en cada uno de los sustratos analizados, siendo el sustrato enriquecido con solución Hoagland el que mostró mayores diferencias entre los diferentes tratamientos con bacterias. Entre los sustratos con rocas, se observaron mayores diferencias entre bacterias del sustrato riodacita en donde predominó el efecto de la endófito *Bacillus megaterium* M1PCa, mientras que en la brecha volcánica no se observó efecto específico de algún inóculo sobre algún elemento contenido en las plantas. En el sustrato perlita también se observó un efecto diferencial entre inóculos predominando la movilización por el efecto de la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA (Tabla 12).

En el sustrato control positivo que consistió en sustrato perlita enriquecido con solución nutritiva de Hoagland, 8 elementos (Al, Ca, Cu, K, Mg, Na, P y Zn) de los 11 determinados, mostraron una diferencia significativamente mayor en los tratamientos de las

bacterias endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA, *Bacillus megaterium* M1PCa, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y por la cepa control positivo *Bacillus pumilus* ES4. Respecto al Zn, el tratamiento sin bacterias mostró un mayor efecto (Fig.22).

En orden decreciente, el siguiente tratamiento que mostró efecto por inoculantes en el contenido de elementos en la planta, fue el consistente en perlita mezclada con roca riolacita pulverizada. En este sustrato se observó que para 5 elementos (Al, Ca, Cu, Na y Si) hubo un mayor efecto de las endófitas *Bacillus megaterium* M1PCa y *Azotobacter vinelandii* M2Per respecto al tratamiento no inoculado. Para el caso de elementos como Mg, y Zn se observó efecto de los inoculantes pero no fue estadísticamente diferente del tratamiento no inoculado. (Fig 23).

Por otro lado, para el tratamiento con sustrato donde se utilizó brecha volcánica mezclado con perlita se observaron efectos estadísticamente significativos entre el contenido de K, Mg, Na y Si determinados en plantas. Sin embargo, para el K, Mg y Si no se detectaron diferencias claras respecto al tratamiento no inoculado. Para el Na se observaron diferencias entre tratamientos, distinguiéndose el efecto la cepa control positivo y algunas endófitas respecto al tratamiento no inoculado (Fig. 24).

En el control negativo (utilizando como soporte perlita) se observaron efectos significativos para 7 elementos determinados en las plantas. Para el K, Na y Si se observó efecto superior de la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA respecto al resto de los tratamientos, incluyendo el tratamiento no inoculado. Mientras que para Al, Ca, Mg y Zn no se observó una diferencia notable entre los tratamientos inoculados respecto al no inoculado (Fig. 25).

Tabla 12 Elementos minerales movilizados hacia plantas de *M. fraileana* por la interacción de bacterias endófitas-plantas.

| Elemento | S U S T R A T O | | | |
|----------|---|--------------------------------|--|---|
| | Riodacita+Perlita | Brecha Volcánica+Perlita | PERLITA+SOLUCIÓN HOAGLAND | PERLITA |
| Al | * <i>Bacillus megaterium</i> M1PCA | NS | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | NDNB |
| Ca | *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA | NS | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA *<i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe Bacillus pumilus ES4 (+) | NDNB |
| Cu | *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA | NS | *<i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe | NS |
| Fe | NS | NS | NS | NS |
| K | NS | NDNB | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA |
| Mg | NDNB | NDNB | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | NDNB |
| Mn | NS | NS | NS | NS |
| Na | *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA | Efecto similar entre bacterias | *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA *<i>Enterobacter sakazakii</i> M2PFe | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA |
| P | NDNB | NS | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA *<i>Bacillus megaterium</i> M1PCA | NS |
| Si | *<i>Azotobacter vinelandii</i> M2Per | NDNB | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA | *<i>Pseudomonas putida</i> M5TSA |
| Zn | NDNB | NS | NDNB | NDNB |

Para cada elemento se indican en negritas y asterisco a las interacciones significativas con inóculos en cada sustrato ($p < 0.05$, Tukey $\alpha = 0.05$). NS : No se encontraron diferencias estadísticas entre tratamientos, NDNB: Efecto semejante al control negativo (sin bacteria)

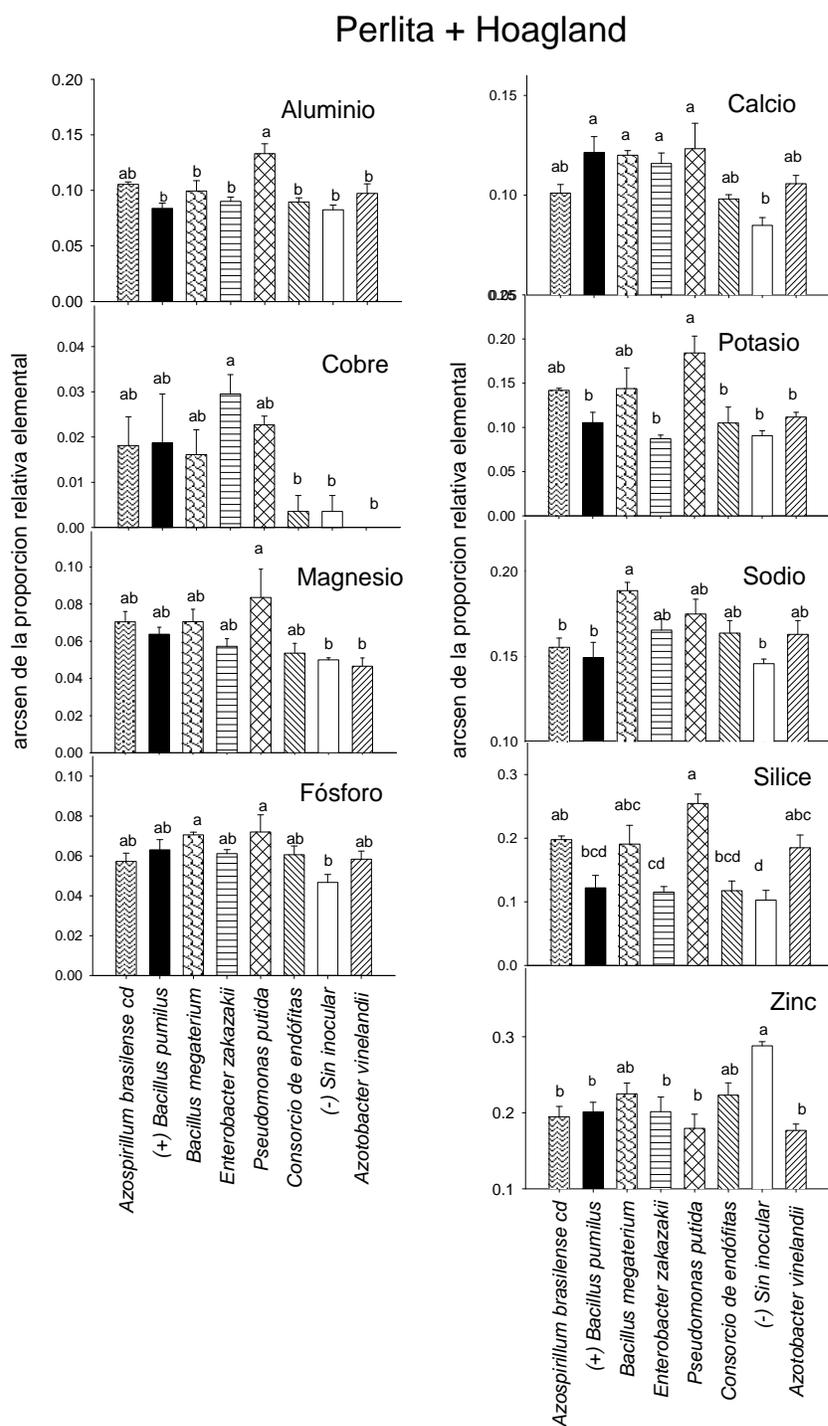


Fig. 22. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia las plantas *M. fraileana* crecidas en perlita enriquecida con solución nutritiva Hoagland al 10%. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican *diferencias* significativas entre tratamientos de inóculo.

Riodacita + Perlita

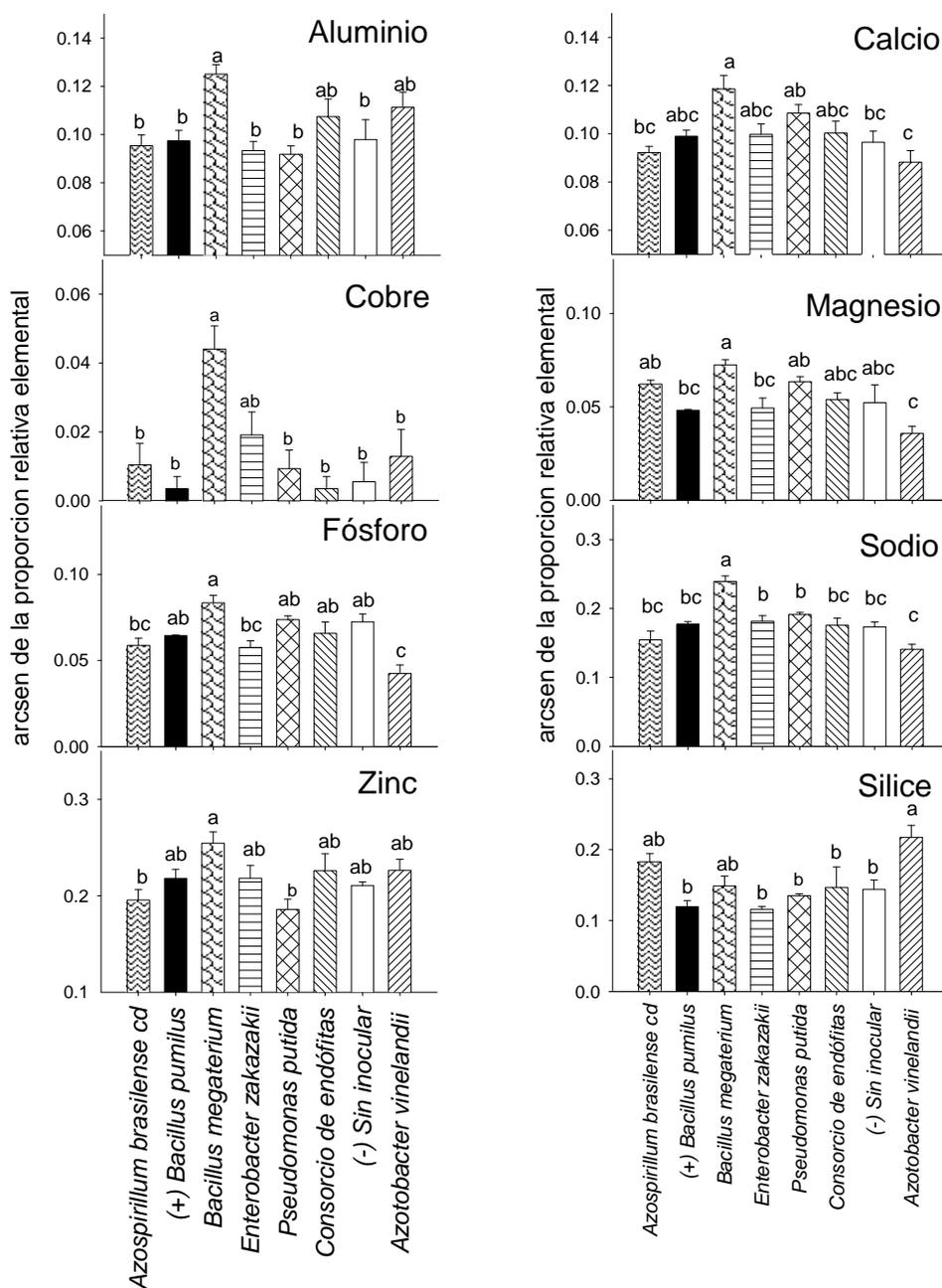


Fig. 23. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia las plantas de *M. fraileana* crecidas en riodacita + perlita. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación de Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo.

Brecha volcánica+Perlita

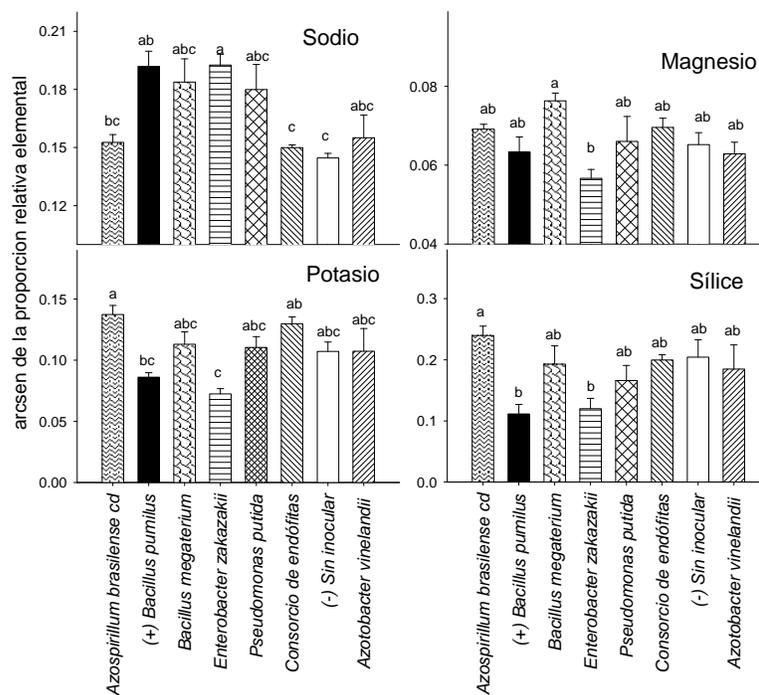


Fig. 24. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia plantas de *M. fraileana* crecidas en brecha volcánica + perlita. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo.

Perlita

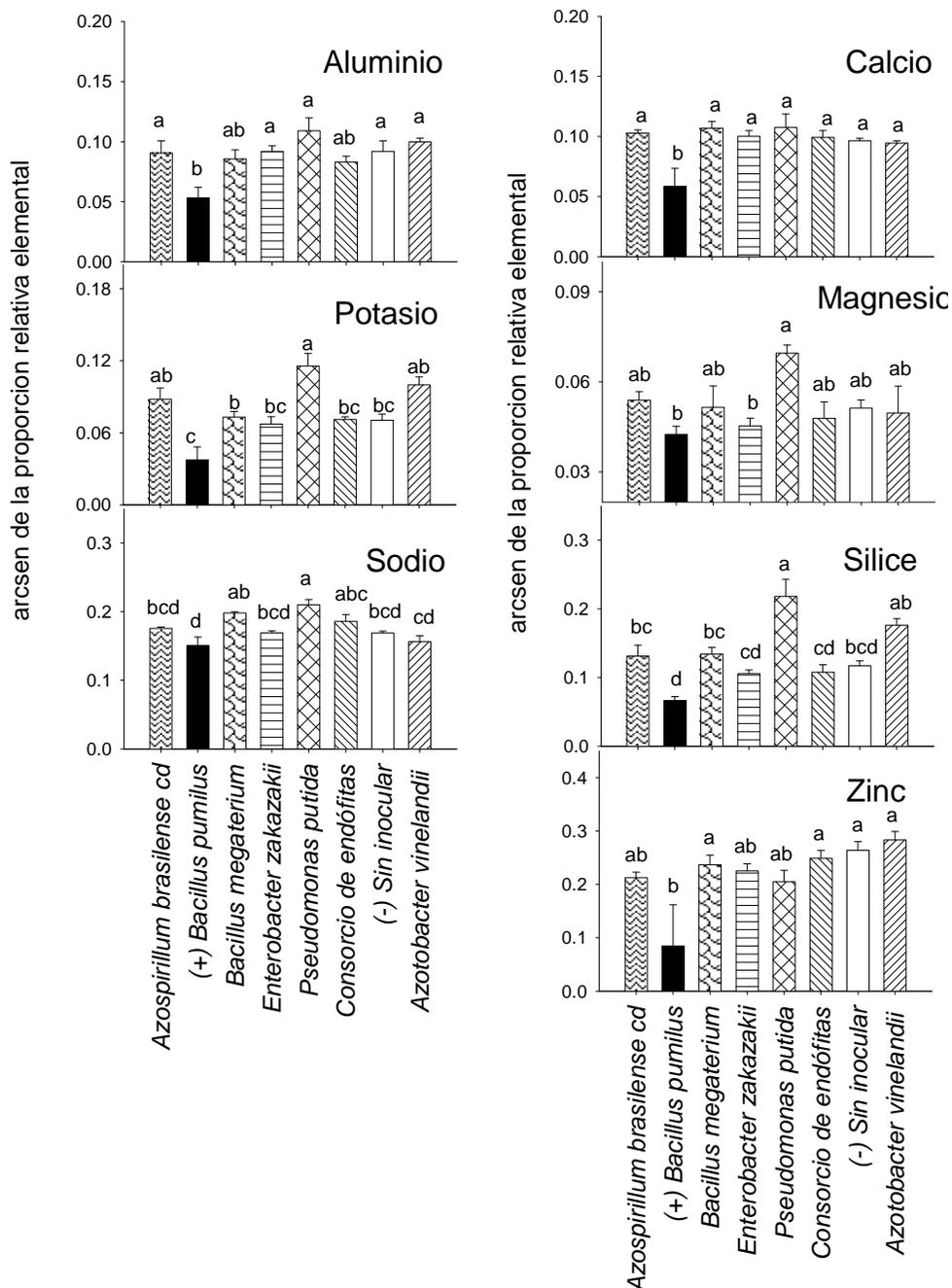


Fig. 25. Efecto de la interacción planta-endófitas en la movilización de elementos minerales del sustrato hacia plantas de *M. fraileana* crecidas en perlita. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo.

3.6.1.1. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en perlita y regadas con solución nutritiva

En el tratamiento control positivo con perlita+solución Hoagland se observó la participación significativa de la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA en la movilización de Al (proporción del elemento en las plantas= $1.78\pm 0.13\%$); K ($3.48\pm 0.38\%$), Si ($6.39\pm 0.61\%$) y Mg ($0.76\pm 0.10\%$), exhibiendo niveles superiores a los observados en plantas inoculadas con las otras bacterias. Al comparar la proporción de Al, K y Si en los cuatro sustratos analizado se observó que el efecto de la bacteria fue superior en el sustrato control positivo y en segundo lugar en los sustratos de perlita y brecha volcánica+perlita. (Fig. 26).

En cuanto al P, la movilización fue superior en los tratamientos con las endófitas *Pseudomonas putida* M5TSA ($0.54\pm 0.06\%$) y *Bacillus megaterium* M1PCa. Entre sustratos no se encontraron diferencias en la proporción de P en el tratamiento con *Pseudomonas putida* M5TSA, mientras que para *Bacillus megaterium* M1PCa hubo una mayor movilización en el tratamiento con roca riodacita (abundancia relativa en la planta= $0.7\pm 0.05\%$) (Fig. 27). Respecto al Cu, la endófito *Enterobacter sakazakii* M2PFe también mostró mayor efecto (abundancia relativa en la planta= $0.09\pm 0.01\%$) y se mantuvo en los cuatro sustratos utilizados (Fig. 28). Respecto al Na *Bacillus megaterium* M1PCa tuvo mayor efecto pero como se mencionó previamente, tuvo mayor efecto en el sustrato con riodacita (abundancia relativa en la planta= $5.62\pm 0.28\%$.) (Fig. 29). Para el Ca, se observó un efecto similar en tratamientos con bacterias (tanto endófitas como del control positivo) y notablemente superior respecto al tratamiento sin bacterias. Las endófitas *Bacillus megaterium* M1PCa (abundancia relativa en la planta= $1.41\pm 0.08\%$), *Pseudomonas*

putida M5TSA y *Enterobacter sakazakii* M2PFe tuvieron un efecto similar al control positivo *Bacillus pumilus* ES4. El efecto de cada una de las endófitas mencionadas fue semejante en los cuatro sustratos analizados. Solo para el control positivo el efecto fue mayor en el sustrato con perlita+solución Hoagland (Fig 30).

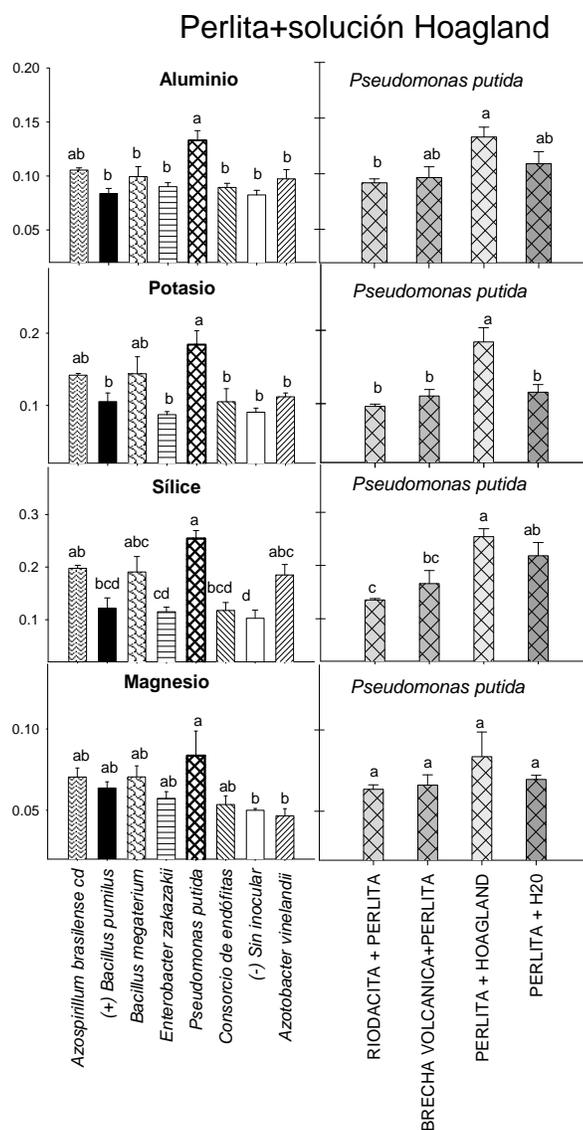


Fig. 26. Movilización de Al, K, Si y Mg hacia las plantas por efecto de la interacción de la endófitas *Pseudomonas putida* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22.

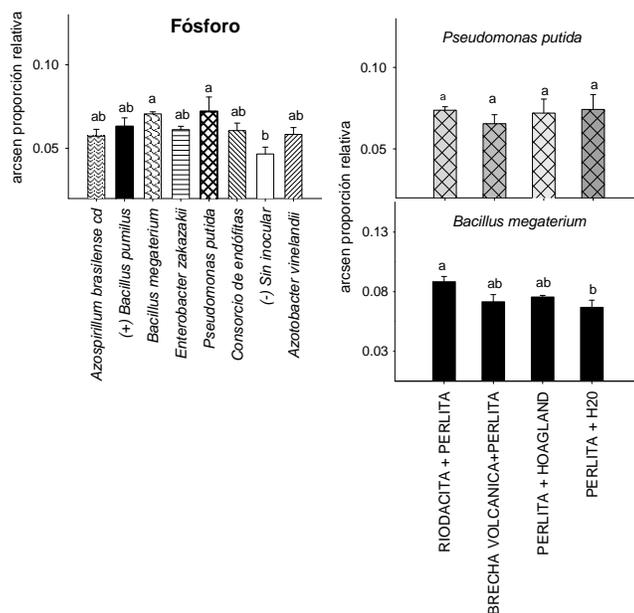


Fig. 27. Movilización de P hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Pseudomonas putida* o *Bacillus megaterium* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación ukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22.

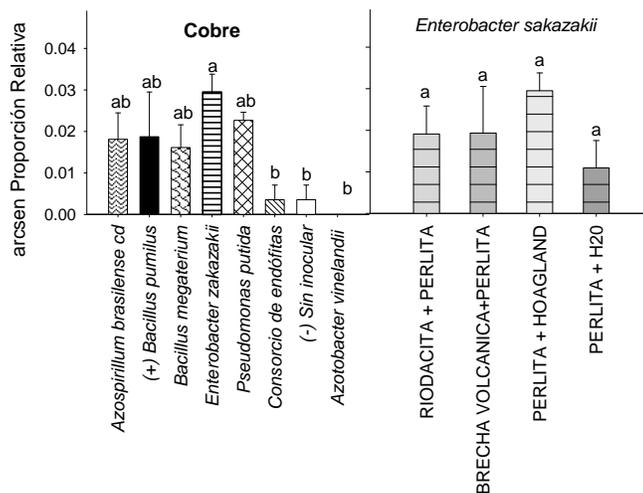


Fig. 28. Movilización de Cu hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Enterobacter sakazakii* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22.

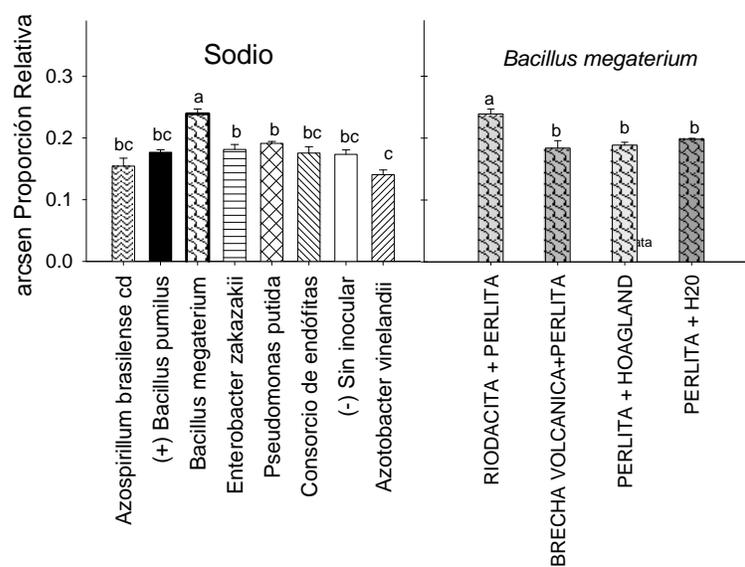


Fig. 29. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Bacillus megaterium* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22.

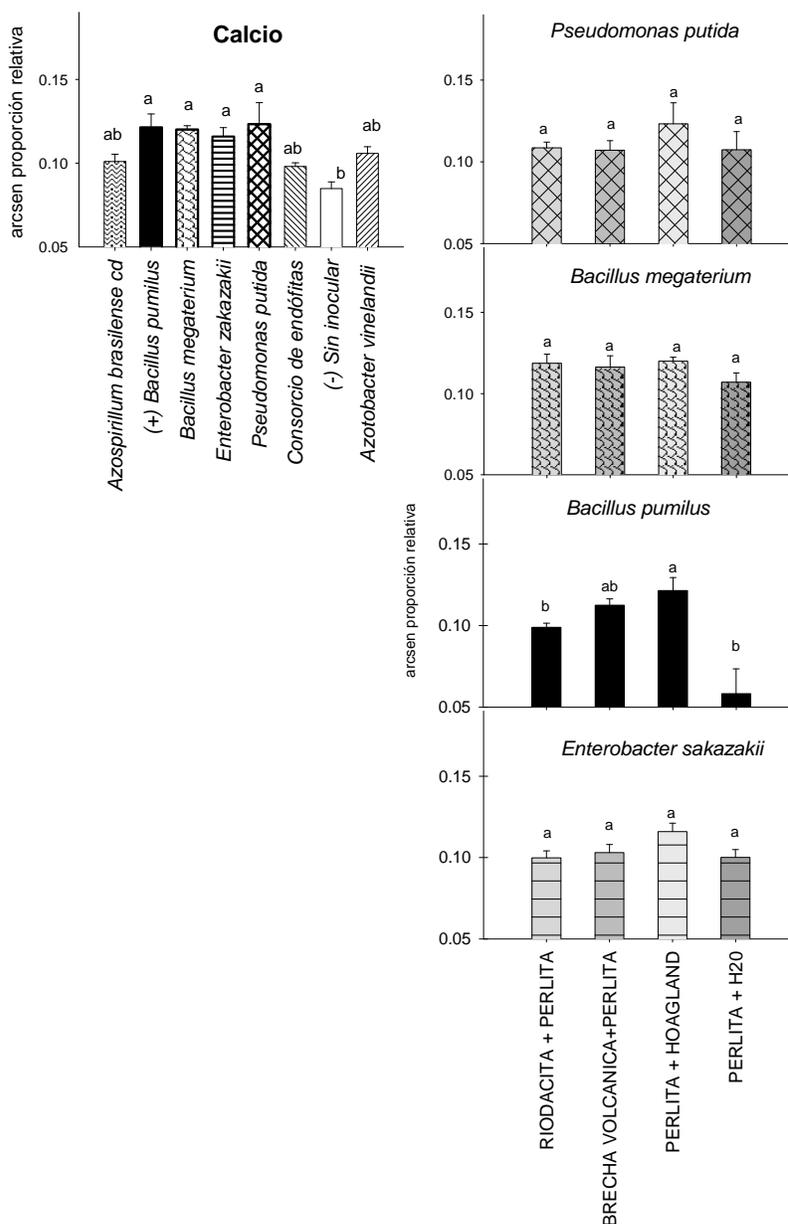


Fig. 30. Movilización de Ca hacia las plantas por efecto de la interacción de las bacterias *Pseudomonas putida*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* ES4 y *Enterobacter sakazakii* con *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 22.

3.6.1.2. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en condiciones deficientes de nutrientes

Los resultados mostraron diferencias entre inóculos con una marcada participación de la endófita *Pseudomonas putida* M5TSA en la movilización de K, Na y Si. Sin embargo, al comparar el efecto de esta bacteria en otros sustratos se observó que el Si y K tuvieron mayor movilización en el sustrato perlita+solución Hoagland, mientras que para el Na fue movilizado en proporciones semejantes en los cuatro sustratos probados (Fig. 31)

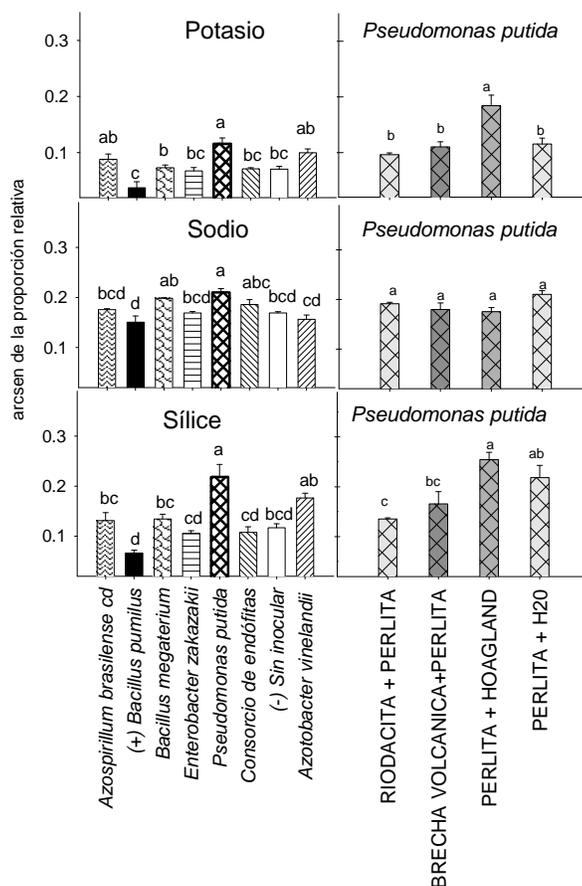


Fig. 31. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Bacillus megaterium* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación de Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23.

3.6.1.3. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en roca riodacita

En el sustrato con riodacita sobresalió la endófito *Bacillus megaterium* en la movilización de Al, Cu, Na y Ca en las plantas (Fig.23). En el caso del Al se observó que los tratamientos con el consorcio de endófitas y la endófito *Azotobacter vinelandii* M2Per tuvieron un efecto semejante al de *Bacillus megaterium* M1PCa y superior al de la cepa control positivo (*B. pumilus* ES4). Comparando la proporción de Al movilizado por *B. megaterium* M1PCa de la riodacita respecto a los otros tres sustratos se encontró que la proporción en el tratamiento con riodacita (abundancia relativa en la planta= $1.56\pm 0.11\%$.) fue significativamente mayor al de la perlita perlita (abundancia relativa en la planta= $0.74\pm 0.12\%$) pero fue semejante a los obtenidos con brecha volcánica y perlita+solución Hoagland (Fig. 32).

Respecto al Cu y en el mismo tratamiento con riodacita, el efecto de *B. megaterium* M1PCa fue superior al de otras bacterias (abundancia relativa en la planta= $0.20\pm 0.02\%$.). Comparando con otros sustratos también tuvo mayor efecto en la movilización de dicho elemento. Para la movilización de Na, el efecto de *B. megaterium* fue mayor (abundancia relativa en la planta= $5.62\pm 0.28\%$.) que los otros inóculos bacterianos y más intensa en la riodacita (Fig. 32). En el caso del Ca la participación de *B. megaterium* fue notable (abundancia relativa en la planta= $1.41\pm 0.08\%$.) y seguido por la endófito *Pseudomonas putida* M5TSA. En este último caso, la movilización de Ca no difirió entre los sustratos probados (Fig. 32). Para el Si la mayor movilización se obtuvo de la riodacita bajo la acción de la endófito *Azotobacter vinelandii* ($4.73\pm 0.05\%$) (Fig. 33).

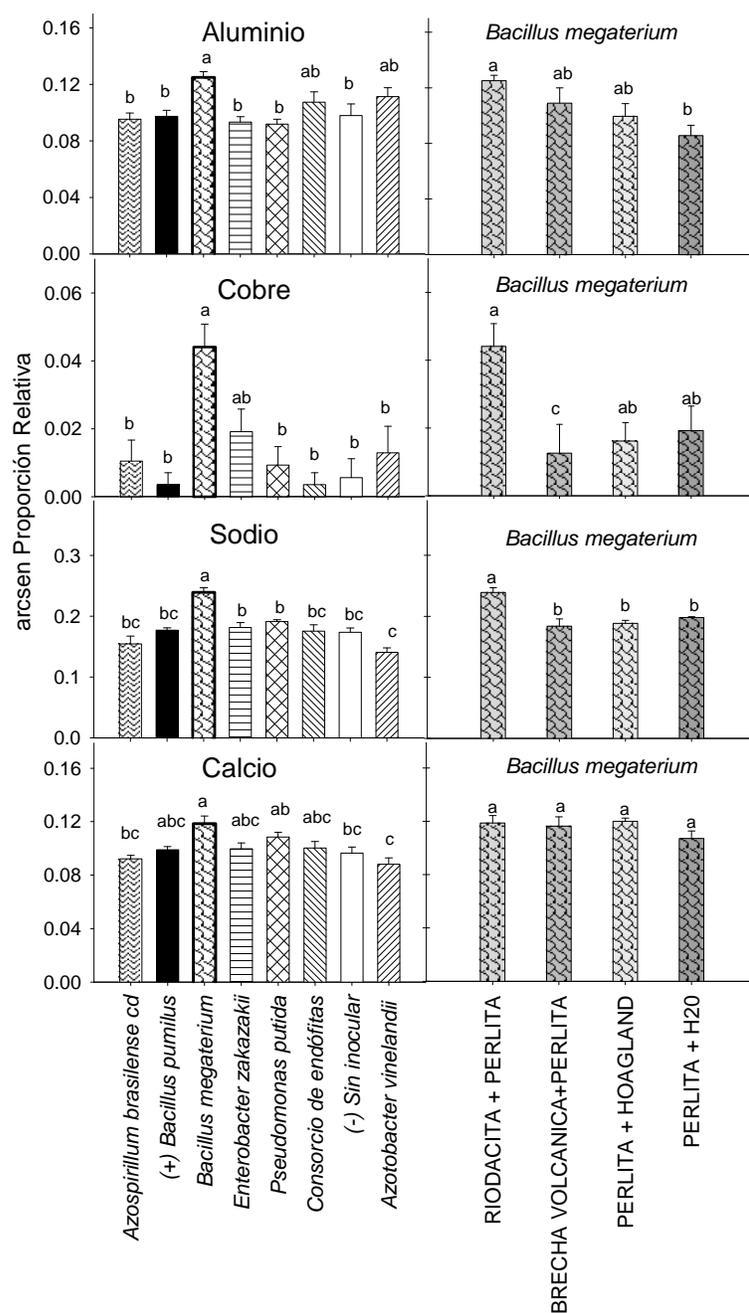


Fig. 32. Movilización de Al, Cu, Na y Ca hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Bacillus megaterium* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre inoculantes. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23.

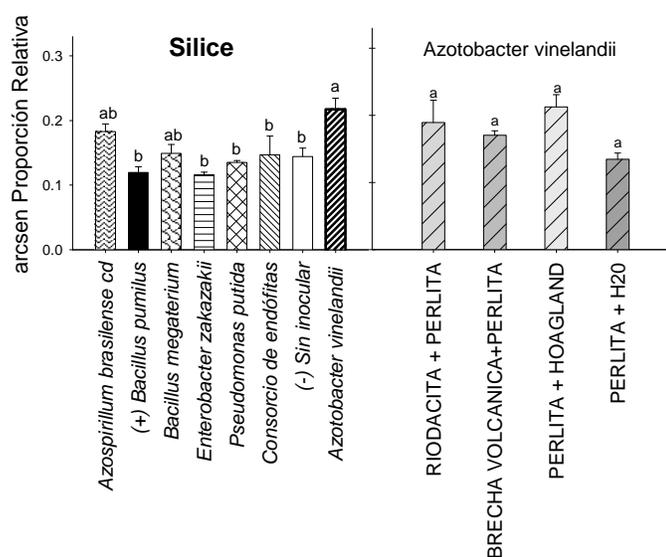


Fig. 33. Movilización de Si hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Azotobacter vinelandii* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 23.

3.6.1.4. Efecto de los inoculantes bacterianos en plantas crecidas en roca de brecha volcánica

En el tratamiento con brecha volcánica solamente se observaron diferencias para el Na. En este tratamiento, la proporción de Na en plantas fue mayor en el tratamiento inoculado con la endófitas *Enterobacter sakazakii* M2PFe seguido por el control positivo *Bacillus pumilus* ES4 y las endófitas *Bacillus megaterium* M1PCa y *Pseudomonas putida* M5TSA a niveles muy semejantes. Al comparar el efecto de *Enterobacter sakazakii* M2PFe en los diferentes sustratos se observó que la movilización de Na fue mayor de brecha volcánica (abundancia relativa en la planta = $3.67 \pm 0.29\%$) (Fig. 34).

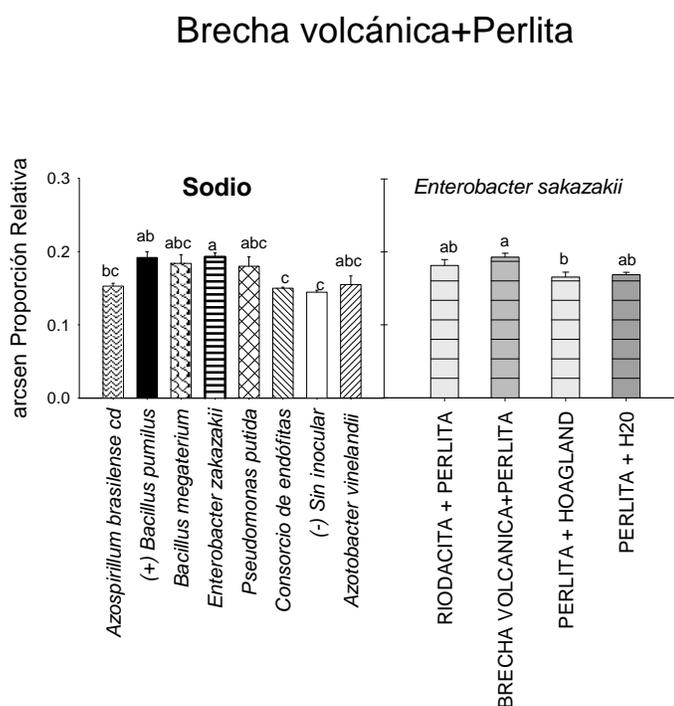


Fig. 34. Movilización de Na hacia las plantas por efecto de la interacción de las endófitas *Enterobacter sakazakii* y *M. fraileana* bajo cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$) entre tratamientos de inóculos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo. La columna de la izquierda viene como referencia de la Fig 24.

3.6.2. Patrones de movilización de elementos minerales en sustratos donde varía la abundancia de *M. fraileana* en su hábitat natural

Se analizó el patrón de movilización de elementos minerales determinados en plantas crecidas en dos sustratos en los que predomina *M. fraileana* en condiciones naturales. De los 11 elementos determinados, se encontraron patrones diferentes en la movilización de Fe, Na y P. El Na y P fueron notablemente más movilizados de las rocas donde *M. fraileana* crece en abundancia, mientras que el Fe fue mayormente movilizado hacia las plantas del sustrato con muy baja abundancia de las plantas creciendo sobre rocas (Tabla 13).

Tabla 13 Movilización de elementos minerales desde los sustratos de cultivo provenientes del ambiente natural hacia *M. fraileana* en condiciones de cultivo.

| Elemento | SUSTRATO | | | | Correlación con la abundancia de <i>M fraileana</i> | Diferencias entre sustratos | Diferencias entre sustratos Pooled-t |
|----------|---|-------------|---|-------------|---|-----------------------------------|--|
| | Riodacita | | Brecha volcánica | | | | |
| | ALTA | | BAJA | | | | |
| | ABUNDANCIA DE <i>M. fraileana</i> (%) | 0.2 | ABUNDANCIA DE <i>M. fraileana</i> (%) | 0.2 | | | |
| Al | 0.9 | 0.2 | 1.32 | 0.2 | negativa | NS | |
| Ca | 0.93 | 0.1 | 0.93 | 0.1 | negativa | NS | |
| Cu | 0.01 | 0 | 0.03 | 0.02 | ND | NS | |
| Fe | 0.17 | 0.03 | 0.29 | 0.03 | negativa | DS | <i>(P = 0.04, F = 6.46)</i> |
| K | 1.02 | 0.22 | 1.16 | 0.22 | positiva | NS | |
| Mg | 0.3 | 0.08 | 0.43 | 0.08 | negativa | NS | |
| Mn | 0.04 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | negativa | NS | |
| Na | 2.9 | 0.18 | 2.07 | 0.18 | positiva | DS | <i>(P = 0.01, F = 13.02)</i> |
| P | 0.53 | 0.05 | 0.26 | 0.05 | ND | DS | <i>(P = 0.01, F = 11.99)</i> |
| Si | 2.11 | 0.8 | 4.33 | 0.8 | positiva | NS | |
| Zn | 4.37 | 0.33 | 4.71 | 0.33 | ND | NS | |

3.6.3. Efecto de la inoculación de bacterias endófitas de raíz de *M. fraileana* en la producción de biomasa de plantas crecidas en sustrato con roca

Los valores de peso seco en las plantas inoculadas con diferentes endófitas y en cuatro diferentes sustratos mostraron diferencias significativas únicamente en el sustrato con riodacita ($F=2.38$, $p=0.04$). En este último sustrato se observó un efecto significativamente superior ($\alpha=0.05$) en el tratamiento con la endófito *Enterobacter sakazakii* M2PFe (peso seco promedio de 1000 plantas= 1.4 ± 0.13 g). En un nivel intermedio se encontraron otros tratamientos con bacterias endófitas y los controles positivos. Con los valores más bajos se observó al tratamiento no inoculado. Al comparar los diferentes sustratos, los valores más altos se encontraron en el sustrato con brecha volcánica, incluso en el tratamiento no inoculado (peso seco promedio de 1000 plantas= 1.5 ± 0.23 g) (Fig. 34.)

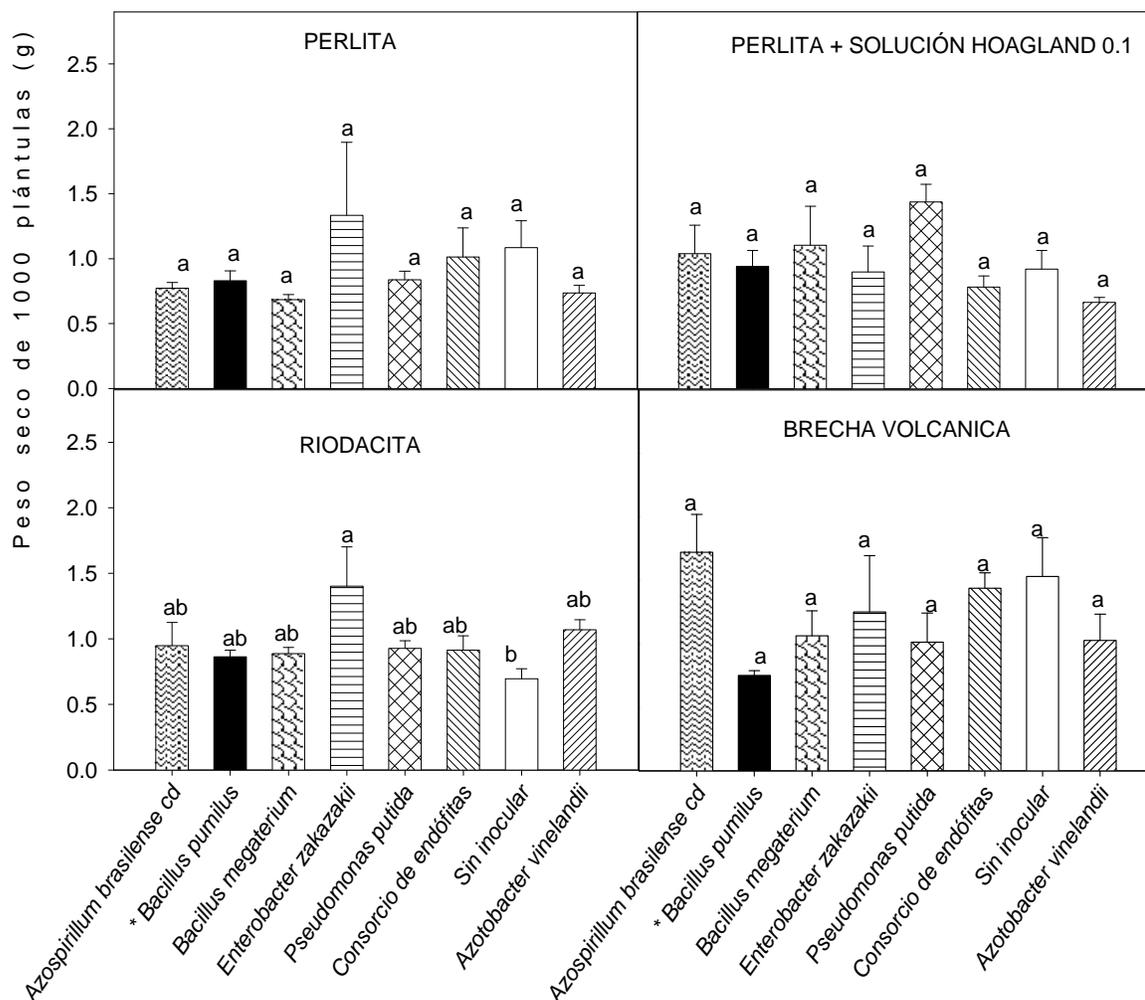


Fig. 35. Efecto de la producción de biomasa de plantas de *M. fraileana* inoculadas con bacterias endófitas y crecidas en cuatro diferentes sustratos. ANOVA de una vía ($p < 0.05$) y comparación Tukey ($\alpha = 0.05$). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de inóculo.

3.6.4. Localización de las bacterias endófitas inoculadas en plantas de *M. fraileana*

A través de inmunotinción fluorescente se demostró el carácter endófito de las bacterias reintroducidas en plantas de *M. fraileana*. Se observó que al igual que las endófitas nativas, las bacterias introducidas presentan una mayor densidad bacteriana en las raíces y disminuye en sentido acropétalo (Fig. 35).

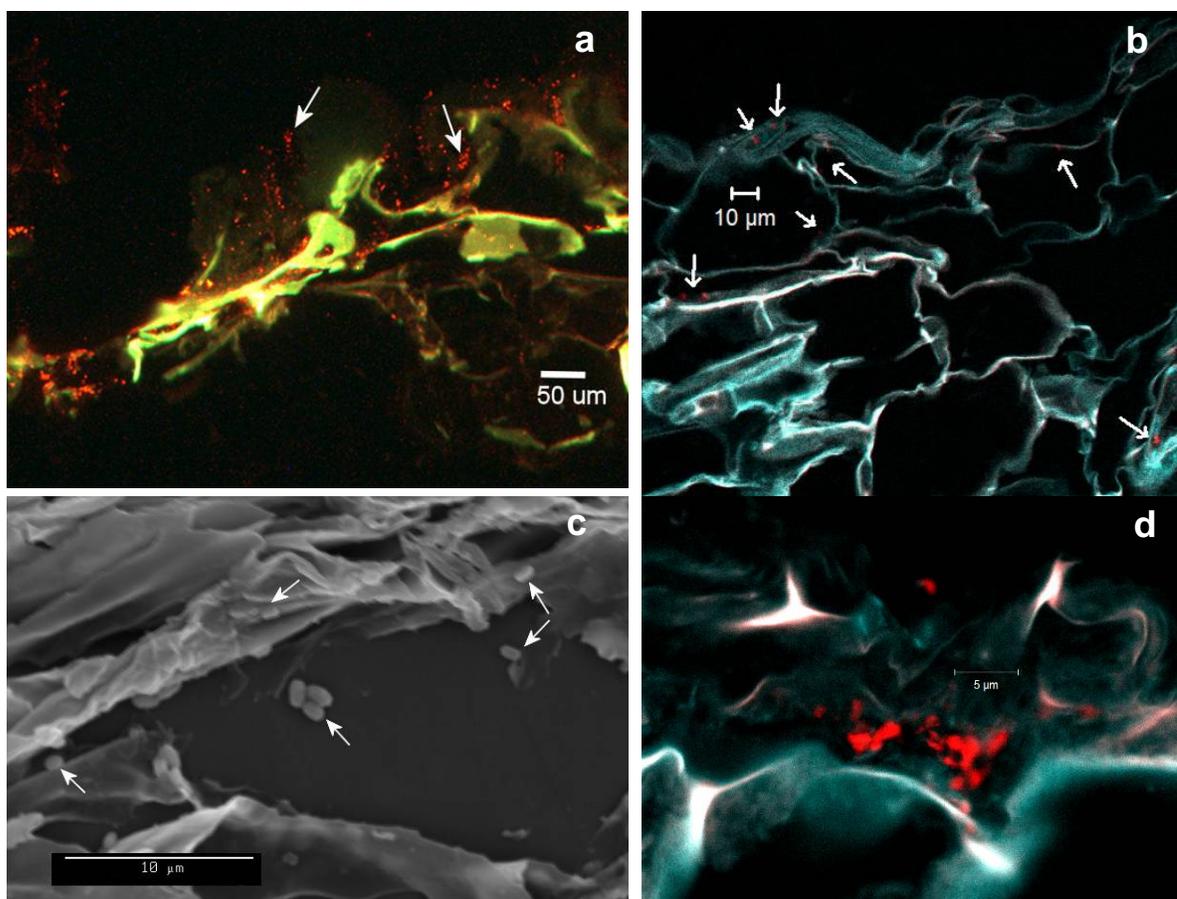


Fig. 36. Ejemplo de colonización endofítica de *Pseudomonas putida* M5TSA en plantas de *M. fraileana* después de 3.5 meses de la inoculación. El patrón de distribución mostró una mayor densidad bacteriana en la base del tallo y raíz, a nivel intracelular en epidermis y primeras capas del clorénquima (tallo). (a) Micrografía epifluorescente. La fluorescencia en tono rojo corresponde a la agrupación de bacterias, (b) y (d) Micrografías obtenidas por Microscopía Confocal Fluorescente, (c) Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido. El resto de las cepas inoculadas mostraron un patrón de distribución semejante.

3.6.5. Capacidad de colonización y establecimiento de las bacterias endófitas inoculadas en plántulas de *M. fraileana*

Las bacterias registradas por cuenta viable fueron obtenidas de plantas desinfectadas superficialmente después de 3.5 meses de la inoculación. La cuenta viable del macerado de dichas plantas indicó diferencias en los niveles poblacionales entre los inóculos dentro de cada sustrato probado. En general, las poblaciones oscilaron entre 7.87×10^4 y 1.66×10^7 UFC g⁻¹ peso fresco, en plantas bajo los tratamientos con las endófitas *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Pseudomonas putida* M5TSA, respectivamente. Esta última cepa fue la que mostró niveles poblacionales más altos en los cuatro sustratos analizados. De forma inesperada se registraron bacterias en el tratamiento no inoculado 8.64×10^4 y 3.11×10^5 UFC g⁻¹ peso fresco (Fig. 36).

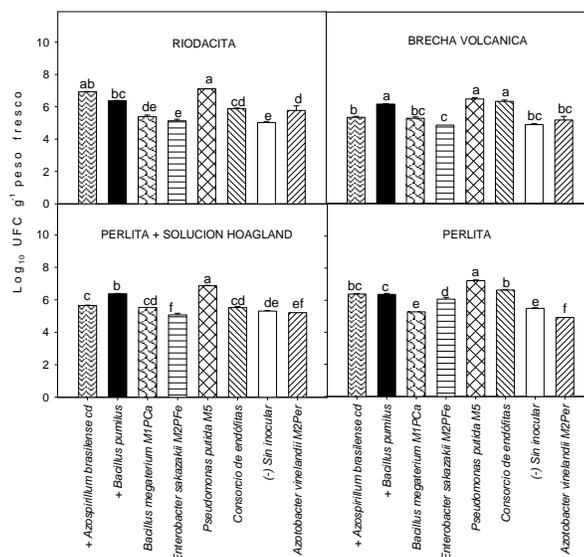


Fig. 37. Capacidad de colonización y establecimiento de bacterias endófitas después de 3.5 meses de inoculación en plantas de *M. fraileana* crecida en sustratos de roca. Los tratamientos control se indica con signo+para las cepas control positivo PGPB y con signo – para el control negativo. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA a $p < 0.001$, Tukey a $\alpha = 0.05$).

3.6.6. Efecto de bacterias endófitas en el crecimiento de *M. fraileana*

3.6.6.1. Efecto en la actividad fotosintética de *M. fraileana*

La cantidad total de ácidos orgánicos en las plantas fue utilizada como medida de la capacidad de fijación de CO₂ a través del Mecanismo Ácido Crasuláceo. Se crecieron plantas en sustrato con roca pulverizada inoculándose con bacterias endófitas.

Se encontraron, en principio, diferencias estadísticas ($p < 0.05$) en la cantidad de ácidos totales registrados por la mañana (6-8 am) respecto a los valores registrados al final día (6-8 pm). La fluctuación de la acidez (día-noche) mostró diferencias altamente significativas entre los diferentes inóculos ($F=6.80$, $p < 0.0008$, $N=30$).

Los valores más altos de acidez se obtuvieron con las endófitas *Pseudomonas putida* y *Azotobacter vinelandii*. El tratamiento control positivo representado por la bacteria PBPB *Azospirillum brasilense* Cd se ubicó en un punto intermedio entre los valores obtenidos bajo la interacción de las plantas con las endófitas y los controles negativos representados por dos tratamientos, uno con plantas sin inocular y otro con plantas inoculadas con la cepa *Bacillus subtilis*, sin capacidad reconocida como promotora del crecimiento (Fig. 37).

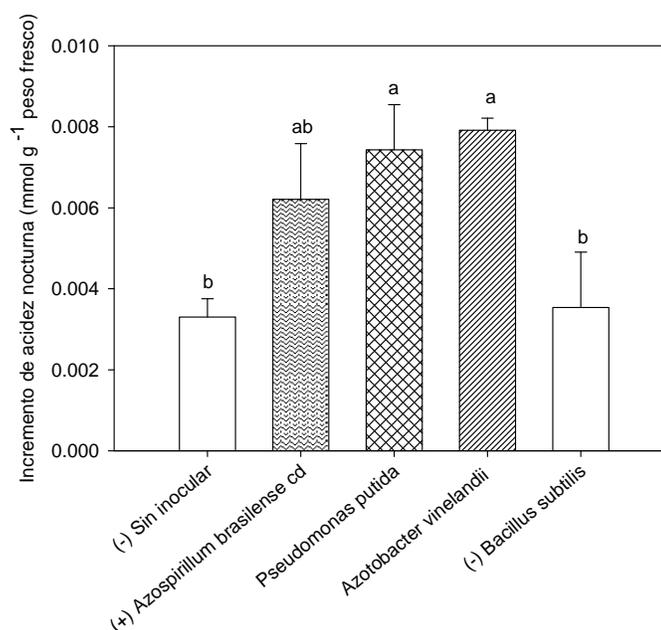


Fig. 38. Incremento de acidez nocturna (acidez nocturna menos acidez diurna) por efecto de la interacción bacterias endófitas y plantas de *M. fraileana* crecidas en roca riolacita. Los tratamientos control se indica con signo + para la cepa control positivo PGPB y con signo – para los controles negativos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía a $p=0.0008$ y Tukey a $\alpha=0.05$).

3.6.6.2. Efecto en la producción de nitrógeno total en plantas

Se determinó la producción de Nitrógeno total de plantas crecidas en sustrato con roca pulverizada e inoculadas con bacterias endófitas potenciales promotoras del crecimiento vegetal. Se encontraron diferencias significativas ($F=3.5$, $p=0.04$, $N=25$) en el nitrógeno total producido bajo el efecto de los inóculos. El tratamiento con mayor producción de nitrógeno correspondió al tratamiento de la endófito *Pseudomonas putida* mientras que la cepa control PGPB *Azospirillum brasilense* Cd y la cepa control neutral *Bacillus subtilis* mostraron valores intermedios respecto a las plantas no inoculadas cuya

respuesta fue similar a la producida bajo el tratamiento con la endófito *Azotobacter vinelandii* con capacidad de fijación de nitrógeno comprobada *in vitro* (Fig 38).

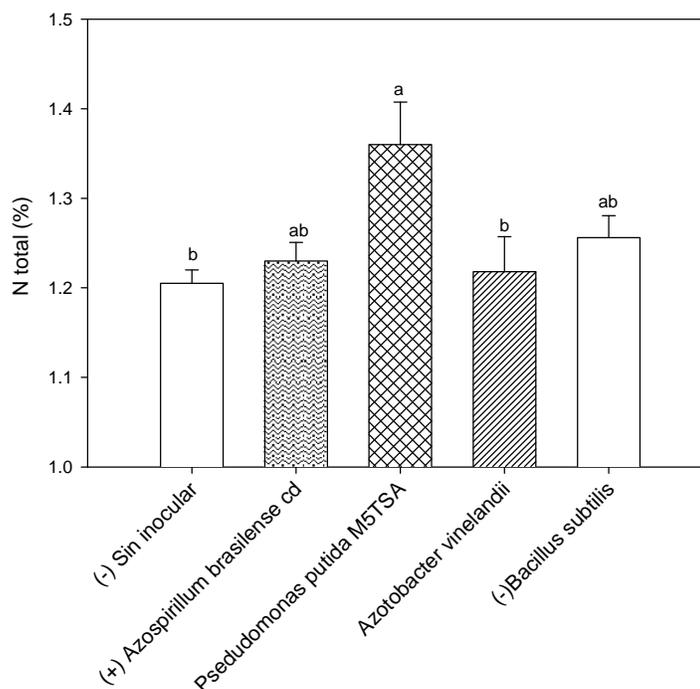


Fig. 39. Nitrógeno total (%) por efecto de la interacción bacterias endófitas y plantas de *M. fraileana* crecidas en roca riolacita. Los tratamientos control se indica con signo+para la cepa control positivo PGPB y con signo - para los controles negativos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.04$, Tukey a $\alpha=0.05$).

3.7. DISCUSIÓN

3.7.1. Colonización y establecimiento de bacterias endófitas reintroducidas en *M. fraileana*

A través de inmunotinción fluorescente se demostró el carácter endófito de las bacterias reintroducidas en plantas de *M. fraileana*. A los 3.5 meses de la inoculación se observó colonización y establecimiento exitosos de las bacterias en el interior de las plantas (Fig. 35) a niveles poblacionales entre 7.87×10^4 a 1.66×10^7 UFC g⁻¹ peso fresco). Estos valores son superiores a los referidos por diversos autores (Dong *et al.* 1994; Quadthallmann y Kloepper 1996) aunque también se tienen registros de bacterias endófitas que alcanzan poblaciones de 1×10^9 UFC g⁻¹ peso fresco sin ocasionar daño a las plantas (McInroy y Kloepper 1994). Independiente de la cantidad de inóculo inicial, es común que las poblaciones endófitas reintroducidas tienden a disminuir a través del tiempo. Aunque no se conoce mucho de su reproducción en el interior de las plantas se sugiere que alcanzan un nivel estable que representa la capacidad de carga de la planta (o tejido) hospedante (Hallman *et al.* 1997). En las observaciones de microscopía electrónica de este estudio, se obtuvo evidencia de división celular de bacterias que se presume corresponden a las bacterias endófitas reintroducidas.

De manera cualitativa se observó que al igual que las endófitas nativas, las bacterias introducidas presentan una mayor densidad bacteriana en las raíces y disminuye en sentido acropétalo (Quadthallman y Kloepper 1996; Lamb *et al.* 1996). La colonización

intracelular de las endófitas reintroducidas como la encontrada en este estudio sugiere una participación funcional de las bacterias dentro de la planta (Hallmann *et al.* 1997).

A pesar de que las plantas utilizadas fueron superficialmente esterilizadas y posteriormente mantenidas en sistemas axénicos, se observaron poblaciones bacterianas en el tratamiento no inoculado (8.64×10^4 y 3.11×10^5 UFC g⁻¹ peso fresco). Estos valores asemejan los registrados para poblaciones naturales de bacterias endófitas (Dong *et al.* 1994; Quadts-Hallmann y Kloepper 1996; Lamb *et al.* 1996). Aunque experimentos de aislamientos no mostraron la presencia de bacterias cultivables, es posible que durante el desarrollo de las plantas se expresen poblaciones bacterianas no detectadas en fases previas de desarrollo por su baja densidad (Adams y Kloepper 1996).

3.7.2. Efecto de las bacterias endófitas como potenciales promotoras del crecimiento vegetal

3.7.2.1. Efecto en la producción de biomasa

El efecto benéfico promovido por la inoculación con bacterias fue verificado para la endófita *Enterobacter sakazakii* en plantas creciendo en el sustrato con riodacita. La presencia endofítica de *E. sakazakii* ha sido reportada solo para el cultivo de soya (Kuklinsky-Sobral *et al.* 2005), sin embargo, se desconocen los mecanismos mediante los cuales promueve el crecimiento vegetal. En los resultados de este trabajo se encontró que la endófita *E. sakazakii* fue superior al resto de inóculos en la solubilización de fosfato de calcio inorgánico pero no resultó tener efecto considerable en la degradación de rocas *in vitro*.

Los niveles de producción de biomasa semejantes en los tratamientos control sin bacterias respecto a los inoculados sugiere la participación de las bacterias endófitas nativas con origen probable en la semilla.

3.7.2.2. Efecto en la actividad fotosintética

La determinación de los cambios diarios en acidez tisular ha sido una medición confiable de la actividad CAM (Andrade 2007) pero no se ha analizado bajo interacciones asociativas entre plantas y microorganismos. Se sabe que el incremento en la acidez tisular es proporcional a la concentración de ácido málico en vacuolas de las células y que por cada molécula de CO₂ fijada por una planta CAM se produce una molécula de ácido málico y dos iones de hidrógeno (Nobel 1988). En este trabajo, las fluctuaciones en la acidez titulable fueron indicativas de la acumulación y subsecuente consumo de ácido málico que ocurren durante la fijación de CO₂ por vía del Metabolismo Ácido Crasuláceo (Winter y Smith 1996).

En las plantas de *M. fraileana* creciendo sobre sustrato de roca se comprobó que bajo el efecto de las bacterias aumenta la actividad fotosintética. El mayor efecto fue observado en interacción con las endófitas *Pseudomonas putida* y *Azotobacter vinelandii* aisladas de raíz de la misma especie vegetal.

Respecto a los valores de acidez encontrados, no se tienen estudios de referencia en especies del mismo género. Hernández-González y Briones (2007), encontraron valores de casi 10 veces más altos respecto a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo sus resultados fueron obtenidos en plántulas de especies columnares (*Pachycereus weberi*, *Neobuxbaumia tetetzo*, *Stenocereus stellatus*, *Myrtillocactus geometizans* y *Escontria chiotilla*), cuyas tasas

de crecimiento entre las cactáceas es relativamente alta. Es probable que la baja intensidad de luz a la que se crecieron las plantas de este estudio ($10\pm 2 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 6h) se refleje en baja actividad fotosintética y por lo tanto en la extremada lenta tasa de crecimiento que se reporta en especies del mismo género (Ruedas et al 2000). Sin embargo, en las pruebas preliminares para el crecimiento de *M. fraileana* en este estudio se ha observado que la intensidad de luz utilizada es adecuada para estas plantas que crecen entre fisuras de rocas (Lopez et al. 2009).

3.7.2.3. Efecto en el nitrógeno total en plantas

La inoculación con la endófito fijadora de nitrógeno *Azotobacter vinelandii* suponía la producción endofítica de formas asimilables de nitrógeno, sin embargo, la cantidad de nitrógeno total fue más alta en plantas inoculadas con *Pseudomonas putida*.

Se ha sugerido que la participación de algunas bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno puede verse disminuída cuando las bacterias no alcanzan a colonizar el tejido adecuado (*i.e.* sistema vascular) donde pueden realizar su función de fijación de nitrógeno, o bien que su efecto benéfico se refleje en una mejor absorción de nutrientes para la planta (Cocking 2003). Esto tiene sentido si se considera que en los resultados previos *Azotobacter vinelandii* exhibió una alta degradación de roca lo cual puede dar lugar a una mayor disponibilidad de nutrientes para las plantas.

Por otro lado el efecto benéfico de *P. putida*, puede ser explicado por la producción de fitohormonas como citoquininas o auxinas (Mercado y Bakker 2007) mas que por la

fijación de nitrógeno, que aunque se presenta en este género (Desnoues *et al.* 2003), no fue detectada en los experimentos *in vitro* realizados como parte del presente estudio.

3.7.3. Efecto de la inoculación con bacterias endófitas en la movilización de elementos de rocas para la intemperización de rocas.

En los resultados previos de este capítulo se demostró que las bacterias endófitas *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter sakazakii*, aisladas de raíz de *M. fraileana* pueden degradar rocas o solubilizar fosfato inorgánico *in vitro*. En el presente capítulo se encontró que al inocular dichas bacterias en plantas se promueve la movilización de algunos elementos minerales hacia las plantas.

En las diversas interacciones entre inóculos y variantes de sustrato se observaron diversas combinaciones de elementos en proporciones variables sugiriendo que la movilización es un proceso complejo que entre otros factores depende de la composición química de las rocas, la proporción relativa y la disponibilidad de los elementos minerales. Aparentemente, en el sustrato enriquecido con solución nutritiva la disponibilidad de cationes favoreció la participación de ciertas bacterias endófitas. Sin embargo, esto no condujo necesariamente a una mayor movilización de elementos hacia las plantas.

En condiciones de deficiencia de nutrientes en el tratamiento con perlita, se observó la participación de *P. putida* M5TSA en la movilización de la elementos y su efecto fue más notorio para el Na, Si y K. Curiosamente, estos elementos fueron correlacionados positivamente con la abundancia de *M. fraileana* en el campo. Es necesario indagar más sobre la función de Na y Si en cactáceas ya que estos elementos no son considerados

esenciales para las cactáceas y particularmente para el Na se presumen efectos negativos sobre el proceso fotosintético (Nobel 1988).

En los sustratos con riodacita o brecha volcánica donde crece de manera natural *M. fraileana* se encontró que los patrones de movilización de elementos muestran un grado de asociación con la abundancia de *M. fraileana* colonizando rocas. El Na y P fueron notablemente más movilizados de las rocas donde *M. fraileana* crece en abundancia, mientras que el Fe fue mayormente movilizado de las rocas con muy baja abundancia. En el sustrato con brecha volcánica se observó una movilización de elementos por efecto de varias cepas endófitas, sin que se distinguiera claramente el efecto de alguna en particular.

Dado que el sustrato representa un sitio con baja abundancia de plantas, el efecto observado puede indicar una participación equiparable o balanceada entre inóculos lo cual podría permitir la supervivencia de las plantas en un sustrato rico en elementos como el Fe, Al, Cu, Mn, los cuales se relacionaron negativamente con la abundancia de la planta en brecha volcánica (Lopez *et al.* 2009).

El aumento en la movilización de algunos elementos minerales bajo la acción específica de alguna endófito no produjo en apariencia algún efecto por toxicidad en las plantas. Esto puede hallar explicación en la relativa tolerancia que exhiben muchas plantas de zonas áridas a la presencia de elementos que resultan tóxicos para otras especies. En particular las cactáceas muestran una amplia gama de respuestas ante diferentes condiciones de nutrientes en el sustrato, generalmente muestran una baja respuesta a la aplicación de ciertos nutrientes como P o K y al igual que otras suculentas exhiben cierta tolerancia a elementos como el Cu y Zn logrando acumularlos en sus tejidos (Nobel 1988).

3.7.4. Participación de los exudados radicales en la intemperización de rocas para la formación de suelos

La liberación de elementos de la matriz mineral de rocas donde crecen plantas inoculadas puede ser atribuida a la actividad solubilizadora de las bacterias que colonizan las raíces de cactáceas y a los ácidos orgánicos (*i. e.* malato, citrato y oxalato) presentes en los exudados radicales (Carrillo *et al.* 2002, Puente *et al.* 2009a).

Los ácidos orgánicos de los exudados radicales se involucran en muchos procesos, entre los que destacan la movilización y absorción de nutrientes por las plantas y microorganismos, desintoxicación de metales por plantas, proliferación microbiana en la rizosfera y la disolución de minerales que conducen a la pedogénesis (Marchner 1995).

De acuerdo con Jones (1998), los ácidos orgánicos en las plantas están gobernados primariamente por el tipo de fijación de carbono (C3, C4 ó CAM) y pueden ser transportados del citoplasma de las células de las raíces hacia la solución del suelo. Esto sugiere que los ácidos orgánicos producidos durante el metabolismo CAM (malato) puedan participar activamente en la disolución de minerales. Por lo tanto, el incremento en la producción de ácidos totales (vía CAM, Fig. 21) en *M. fraileana* por efecto de las endófitas aceleraría la intemperización de rocas y eventualmente conduciría a la formación de suelos.

CONCLUSIONES FINALES

- El estudio ecológico de la abundancia de especies saxícolas resaltó la importancia de *M. fraileana* como colonizadora de rocas e indicó que las variaciones locales de su abundancia se pueden explicar por la interacción de varios elementos, más que por el efecto aislado de alguno de ellos. Se ha provisto evidencia de que existe correlación entre la composición mineral y elemental de las rocas con la abundancia de *M. fraileana*.
- A través de métodos cultivo-dependientes y cultivo-independientes se confirmó la presencia de bacterias endófitas de *M. fraileana*.
- Se realizaron múltiples ensayos con diversos esquemas de desinfección y medios de cultivo sin obtener bacterias cultivables en semillas, frutos y plántulas.
- El uso de técnicas cultivo-independientes como amplificación del gen 16S rDNA, hibridación fluorescente *in situ* y tinción de bacterias viables indicó la presencia de bacterias endófitas en semillas a niveles poblacionales mayores a lo reportado en otras cactáceas. Las evidencias cualitativas indicaron una distribución de las bacterias endófitas en el interior del tejido de la semilla.
- Se obtuvieron cepas cultivables de tallo y raíz obteniendo niveles poblacionales en raíz semejantes a los presentados en otros estudios.
- Se aislaron 14 morfotipos de raíz entre los que destacaron *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter sakazakii* por su capacidad para degradar compuestos inorgánicos y por su potencial como fijadoras de nitrógeno. Dichas bacterias fueron identificadas a través de la secuenciación total del gen 16S rRNA.

- Se comprobó la presencia y capacidad de bacterias endófitas fijadoras de nitrógeno en raíces de *M. fraileana*. *Azotobacter vinelandii* M2Per fue la única cepa que endófito capaz de reducir acetileno. Dada la eficiencia de dicha cepa se considera de alto potencial para promover el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno.
- Se verificó la presencia de bacterias endófitas de *M. fraileana* capaces de solubilizar fosfatos inorgánicos entre las que destacaron *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe y *Bacillus megaterium* M2PCa.
- Se comprobó la capacidad de las endófitas *Azotobacter vinelandii* M2Per *Pseudomonas putida* M5TSA y *Bacillus megaterium* M2PCa para degradar rocas riodacitas. Esto se observó a través del aumento de partículas *in vitro* pero se encontró que el efecto de fragmentación de roca se puede deber no sólo a acción de compuestos ácidos sino también por compuestos básicos.
- Se demostró la presencia de bacterias endófitas en *M. fraileana* y que éstas poseen capacidad para promover el crecimiento vegetal a través de la fijación de nitrógeno y/o la liberación de nutrientes producto de la degradación de rocas.
- La reintroducción de bacterias endófitas en plantas de *M. fraileana* reflejó colonización y establecimiento exitosos en donde la densidad bacteriana es mayor en la raíz y disminuye en sentido acropétalo.
- El efecto en el crecimiento vegetal de plantas crecidas en sustrato rocoso fue promovido por la inoculación con bacterias endófitas, en el caso de *Enterobacter sakazakii* a través del aumento en el peso seco de plantas y en el caso de *Pseudomonas putida* y *Azotobacter vinelandii* a través de un aumento en la actividad fotosintética. Se propone que los ácidos

orgánicos producidos durante el metabolismo CAM (malato) puedan participar activamente en la disolución de minerales.

- Se demostró que la intemperización de rocas puede acelerarse mediante la inoculación con bacterias endófitas en plantas produciéndose un aumento en la movilización de elementos minerales hacia plantas.
- De las 4 cepas endófitas probadas *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida* y *Enterobacter sakazakii* participaron de manera consistente en el incremento de la movilización de elementos minerales hacia las plantas. El aumento en la movilización de elementos minerales bajo la acción específica de alguna endófitas no produjo, en apariencia, algún efecto por toxicidad en las plantas.
- En las múltiples interacciones entre inóculos y variantes de sustrato se observaron diversas combinaciones de elementos en proporciones variables sugiriendo que la movilización es un proceso complejo que entre otros factores depende de la composición química de las rocas, la proporción relativa y la disponibilidad de los elementos minerales.
- Los patrones de movilización de elementos muestran un grado de asociación con la abundancia de *M. fraileana* colonizando rocas, siendo el Na y P fueron notablemente más movilizados de las rocas donde *M. fraileana* crece en abundancia, mientras que el Fe fue mayormente movilizado de las rocas con muy baja abundancia.

LITERATURA CITADA

- Adams JB, Palmer R, Stanley JT. 1992. Rock weathering in deserts: mobilization and concentration of ferric iron by microorganisms. *Geomicrobiol J* 10:99–114
- Adams PD, Kloepper JW. 1996. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars: *Phytopathology*, 86–S97(abstr)
- Akter M, Akagi T. 2005. Effect of fine root contact on plant-induced weathering of basalt. *Soil Sci Plant Nutr* 51:861–871.
- Aldor LS y Keasling JD. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* 14: 475–483
- Amman RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56: 1919–1925
- Anderson EF. 2001. The cactus family. Timber Press, Portland, OR, USA
- April R y Keller D. 1990. Mineralogy of the rhizosphere in forest soils of the eastern United States. *Biogeochemistry* 9:1–18
- Araujo WL, Marcon J, Maccheroni W Jr, Van Elsas JD, Van Vuurde JW y Azevedo JL. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4906–4914
- Ashbolt NJ y Inkerman PA. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug *Saccharococcus sacchari*, and its environs. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:707–712
- Asis CA y Adachi K. 2003. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:19–23
- Azevedo JL, Maccheroni W Jr, Pereira JO, Araujo WL. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *J. Biotechnol.* 3:40–65
- Babenko YS, Tyrygina GI, Grigor'ev EF, Donglma LM, Bomsow TI. 1984. Biological activity and physiological-biochemical properties of phosphate dissolving bacteria. *Microbiologiya* 53, 533–539
- Baldani JJ, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Döbereiner J. 1997. Recent Advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* 29: 911–922
- Bangera MG, Thomashow LS. 1996. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Mol. Plant Microbe Interact.* 9:83–90
- Barber SA. 1995. Soil nutrient bioavailability: a mechanistic approach. John Wiley & Sons, New York, NY, USA
- Barbour B, Burk J, Pitts W, Gilliam FS, y Schwartz WM. 1999. Terrestrial plant ecology, 3rd ed. Addison-Wesley Longman, Menlo Park, CA, USA
- Barraquio WL, Revilla L y Ladha JK. 1997. Isolation of endophytic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194:15–24
- Bashan Y y Holguin G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43, 103–121
- Bashan Y, Khaosaad T, Salazar BG, Ocampo J A, Wiemken A, Oehl F, and Vierheilig H (2007) Mycorrhizal characterization of the boojum tree, *Fouquieria columnaris*, an endemic ancient tree from the Baja California Peninsula, México. *Trees Struct Funct* 21:329–335
- Bashan Y, Rojas A, Puente ME. 1999. Improved establishment and development of three cacti species inoculated with *Azospirillum brasilense* transplanted into disturbed urban desert soil. *Can. J. Microbiol.* 45:441–451.
- Bashan Y, Li CY, Lebsky VK, Moreno M, de-Bashan LE. 2002. Primary colonization of volcanic rocks by plants in arid Baja California, México. *Plant Biology* 4:392–402
- Bashan Y, Vierheilig H, Salazar BG, de-Bashan LE. 2006. Primary colonization and breakdown of igneous rocks by endemic, succulent elephant trees (*Pachycormus discolor*) of the deserts in Baja California, México. *Naturwissenschaften* 93:344–347

- Bashan Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *Jo.Gen. Microbiol.* 132: 3407–3414
- Bastian F, Cohen A, Piccoli P, Luna V, Baraldi R y Bottini R. 1998. Production of indole acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined cultura media. *Plant Grow Regul.* 24:7–11
- Bell CR, Dickie GA, Harvey WLG y Chan JWYF. 1995. Endophytic bacteria in grapevine. *Can. J. Microbiol.* 41: 46–53
- Belnap JO, Lange L. 2003. Biological soil crusts. Characteristics and distribution. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Benhamou N, Kloepper JW, Quadt-Hallmann A, Tuzun S. 1996. Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. *Plant Physiol* 112:919–929
- Benitez RJL, Orozco SA, Rojas AM. 2004. Light effect on seed germination of four *Mammillaria* species from the Tehuacan-Cuicatlan Valley, central México. *Southwest Nat* 49:11–17
- Bevivino A, Sarrocco S, Dalmastrì C, Tabacchioni C., Cantale C, Chiarin L. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment of disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:225–237
- Bormann BT, Wang FH, Bormann G, Benoit RA y Snyder MC. 1998. Rapid, plant-introduced weathering in an aggrading experimental ecosystem. *Biogeochemistry* 43:129–155
- Boyle C, Götz M, Dammann-Tugend U, Schulz B. 2001. Endophyte–host interactions III. Local vs. systemic colonisation. *Symbiosis* 31:259–281
- Boyle JR, Voight GK, Sawhney BL. 1974. Chemical Weathering of biotite by organic Acids. *Soil Sci.* 117:42–45
- Bravo-Hollis H, Sanchez-Mejorada H. 1991. Las cactaceas de México III. Universidad Autonoma de México, México, DF, México
- Buttner D y Bonas U. 2006. Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 193–200
- Carrillo AE, Li CY, Bashan Y. 2002. Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. *Naturwissenschaften* 89:428–432
- Carroll GC. 1999. The foraging Ascomycete. XVI International Botanical Congress, St Louis, MN
- Cavalcante, VA y Döbereiner J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* 108:23–31
- Chadwick DH, Steinmetz G. 2006. Songs of the Sonoran. *National Geographic* 210:124–149
- Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Ba A, Gillis M, de Lajudie P, and Dreyfus B. 2000. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5437–5447
- Chang TT, Li CY, 1998. Weathering of limestone, marble, and calcium phosphate by ectomycorrhizal fungi and associated microorganisms. *Taiwan J. Forest Sci.* 13:85–90
- Chelius MK y Triplett EW. 2000. Diazotrophic endophytes associated with maize. pp. 779–791. In: Prokaryotic Nitrogen Fixation; A Model System for Analysis of a Biological Process. Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- Chelius, M. K., y Triplett, E. W. 1999. Rapid detection of arbuscular mycorrhizae in roots and soil of an intensively managed turf grass system by PCR amplification of small subunit rDNA. *Mycorrhiza* 9:61–64
- Chen C, Bauske EM, Musson G, Rodríguez-Kábana R, Kloepper JW. 1995. Biological control of *Fusarium* wilt of cotton by use of endophytic bacteria. *Biol. Control* 5:83–91
- Cocking EC. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil.* 1:169–175
- Colman SM. 1982. Chemical weathering of basalt and andesites: evidence from weathering rinds. US Geological Survey Professional Paper 1246, Washington, DC, USA
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clement C y Ait Barka E. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia sp.* strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1685–1693

- Conn, VM y Franco CMM. 2004. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1787–1794
- Cooley MB, Miller WG y Mandrell RE. 2003. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4915–4926
- Coombs JT, Franco CMM. 2003. Isolation and identification of actinobacteria from surface sterilised wheat roots. *Appl Environ. Microbiol.* 69:5603–5608
- Cramer GR, Lynch J, Läuchli A, Epstein E. 1987. Influx of Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ into roots of salt-stressed cotton seedlings. *Plant. Physiol.* 83:510–516
- Crawley MJ. 1986. Ecology. Blackwell Scientific, Oxford, UK
- Daims H, Stoecker K, Wagner M. 2005. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection of prokaryotes. pp. 213–239. In *Advanced Methods in Molecular Microbial Ecology*. Osborn AM y Smith CJ (eds.). Bios-Garland, Abingdon, UK.
- Dalton DA, Kramer S, Azios N, Fusaro S, Cahill E y Kennedy C. 2004. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 49:469–479
- Danhorn T., Fuqua C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 401–22
- Dawson TE, Pate, JS. 1996. Seasonal water uptake and movement in root systems of Australian phreatophytic plants of dimorphic root morphology: a stable isotope investigation. *Oecologia* 107:13–20.
- Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño-Lopez R y Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149:2251–2262
- Di Fiore S y Del Gallo M. 1995. Endophytic bacteria: their possible role in the host plants. pp. 169-187. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms. Fendrik I, Del Gallo M, Vanderleyden J y De Zamaroczy M (eds.). Springer Verlag, Berlin.
- Djordjevic MA, Gabriel DW y Rolfe BG. 1987. *Rhizobium*: the refined parasite of legumes. *Annu. Rev. Phytopathology* 25: 339 – 358
- Dong Y, Iniguez AL y Triplett EW. 2003. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Plant Soil* 257:49 – 59
- Dong Z, Canny MJ, McCully ME, Roboredo MR, Cabadilla CF, Ortega E y Rodes R. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105:1139 – 1147
- Duijff BJ, V Gianinazzi-Pearson y Lemanceau P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol.* 135:325–334
- Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K. 2001. Endophytic Colonization and in planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285–5293
- Elvira-Recuenco M y Vuurde van JW. 2000. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Can J Microbiol* 46:1036–1041
- Franklin JF, Dyrness CT. 1973. Natural vegetation of Oregon and Washington. General Technical Report PNWS-8.417, USDA Forest Service, USA
- Fry SM, Milholland RD. 1990. Multiplication and translocation of *Xylella-fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. *Phytopathology* 80:61–65
- Gagné S, Richard C, Rousseau H y Antoun H. 1987. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Can. J. Microbiol.* 33:996–1000.
- Gardner JM, Feldman AW, Zablutowicz RM. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl Environ Microbiol* 43:1335–1342
- Germaine K., Keogh E., Garcia-Cabellos G., Borremans B., van der Lelie D., Barac T., Oeyen L., Vangronsveld J., Moore F.P., Moore E.R.B., Campbell C.B., Ryan D., Dowling D.N. 2004. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.*, 48, 109–118

- Germida JJ y Siciliano SD. 2001. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biol. Fertil. Soils* 33:410-415
- Germida JJ, Siciliano SD, De Freitas JR y Seib AM. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 26:43-50
- Gibbs RJ, Reid JB. 1988. A conceptual model of changes in soil structure under different cropping systems. *Adv Soil Sci* 8:123-149
- Gibson AC, Nobel PS. 1986. The cactus primer. Harvard University Press. Cambridge, MA, USA
- Glenn-Lewin DC, Peet RK, Veblen TT. 1992. Plant succession. Chapman Hall Press, London, UK
- Glick BR. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol* 41:911-915
- Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B y Ladha JK. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183:2634-2645
- Hallmann J, Berg G y Schulz B. 2006. Isolation procedures for endophytic microorganisms. p. 299-319. *In: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T. (eds). Microbial Root Endophytes. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.*
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF y Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol* 43:895-914
- Hartmann A, Chatzinotas A, Assmus B, Kirchhof G. 2000. Molecular microbial ecology studies on diazotrophic bacteria associated with non-legumes with special reference to endophytic diazotrophs. pp 1-14. *In: Subba Rao NS, Dommergues YR (eds) Microbial interactions in agriculture and forestry, vol II. Science, Enfield.*
- Hartmann A, Chatzinotas A, Assmus B, Kirchhof G. 2000. Molecular microbial ecology studies on diazotrophic bacteria associated with non-legumes with special reference to endophytic diazotrophs. pp 1-14. *In: Subba Rao NS, Dommergues YR (eds.) Microbial interactions in agriculture and forestry, vol II. Science, Enfield.*
- Hausback BP. 1984. Cenozoic volcanic and tectonic evolution geology of the Baja California Peninsula. *In: Frizzell VA Jr (ed). Geology of the Baja California Peninsula. Society of Economic Paleontologists and Mineralogists. Pacific Section. Los Angeles, CA, USA* 39:219-236
- Heath MC. 1986. Evolution of parasitism in the fungi. pp. 149 - 160. *In ADM Rayner, CM Brasier y D. Moore (eds)., Evolutionary Biology of the Fungi. Cambridge University Press. NY.*
- Heidelberg. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895-914
- Henderson, M. E. K. and Duff, R. B. 1963. The release of metallic and silicate ions from minerals, rocks, and soils by fungal activity. *J. Soil Sci.* 14: 236-246
- Hernández-González O y Briones-Villarreal O. 2007. Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence *Am. J. B.* 94:1344-1351
- Hiebert FK y Bennett PC. 1992. Microbial control of silicate weathering in organic-rich ground water. *Science* 258: 278-281
- Hinsinger P. 1998. How do plants acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv Agron* 64:225-265
- Hinton DM y Bacon CW. 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia.* 129:117-125
- Hoffland E, Kuyper TW, Wallander H, Plassard C, Gorbushina AA, Haselwandter K, Holmström S, Landeweert R, Lundström U, Rosling A, Sen R, Smits M, van Hees P, Van Breemen N. 2004. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ* 2:258-264
- Holguin G y Bashan Y. 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) *Soil Biol. Biochem.* 28: 1651-1660
- Holland MA y Polacco JC. 1994. PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plants? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:197-209
- Hurek T y Reinhold-Hurek B. 2003. *Azoarcus* sp. strain BH72 as a model for nitrogen-fixing grass endophytes. *J. Biotechnol.* 106:169-178

- Hurek T, Handley LL, Reinhold-Hurek B y Piche Y. 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15:233–242
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, Van Montagu M y Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176:1913–1923
- Hurek T, Reinhold-Hurek B, van Montagu M y Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.*, 176, 1913–1923
- Illmer P y Schinner F. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphate solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27: 257–263
- Illmer P, Barbato A y Schinner F. 1995. Solubilization of hardy-soluble AIPO4
- Islam M, Morgan J, Doyle MP, Phatak SC, Millner P y Jiang X. 2004. Fate of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2497–2502
- Jain N, Sharma DK. 2004. Biohydrometallurgy for nonsulfidic minerals—a review. *Geomicrobiol. J.* 21, 135–144
- James EK y Olivares FL. 1998. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 17, 77–119
- James, E. K., Olivares, F. L., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. 1997. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *J. Exp. Bot.* 48:785–797
- Jargeat P, Cosseau C, Ola'h B, Jauneau A, Bonfante P, Batut J y Becard G. 2004. Isolation, free-living capacities, and genome structure of "*Candidatus Glomeribacter gigasporarum*," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *J. Bacteriol.* 186:6876–6884
- Johnson DM, Hooper PR, Conrey RM. 1999. XRF analysis of rocks and minerals for major and trace elements on a single low dilution Li-tetraborate fused bead. *Adv X-ray Anal* 41:843–867
- Jones D. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205: 25–44
- Jones LD. 1998. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205:1849–1859
- Kado CI. 1992. Plant pathogenic bacteria. pp 660–662. *In* The prokaryotes. Edited by Bellows HG, Dworkin M, Harder W y Schleifer H. Springer, New York.
- Khammas KM y Kaiser P. 1991. Characterization of a pectinolytic activity in *Azospirillum irakense*. *Plant Soil* 137:75–79
- King EO, Ward MK y Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clinl. Med.* 44:301–307
- Klopper JW, Schippers B y Bakker PAHM. 1992. Proposed elimination of the term endhorrhizosphere. *Phytopathology.* 82:726–727
- Kluepfel DA. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Annu Rev Phytopathol* 31:441–472
- Klumar V y Narula N. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergente of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils* 28:301–305
- Klumar, V. y N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergente of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biol. Fert. Soils* 28:301–305
- Kobayashi DY, Palumbo JD. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. pp 199–236. *In*: Bacon CW, White JF (eds.) *Microbial endophytes*. Dekker, New York
- Kovach WL. 1998. MVSP – A multivariate statistical package for Windows, ver. 3.0. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK
- Krause A, Ramakumar A, Bartels D, Battistoni F, Bekel T, Boch J, Böhm M, Friedrich F, Hurek T, Krause L, Linke B, McHardy A, Sarkar A, Schneiker S, Syed AA, Thauer R, Vorhölter F, Weidner S, Pühler A, Reinhold-Hurek B, Kaiser O y Goesmann A. 2006. Genomic insights into the lifestyle of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Nat. Biotechnol* 24:1385–1391
- Krumbein WE. 1983. *Microbial geochemistry*. Blackwell Scientific, Oxford, UK
- Kuklinsky-Sobral HL, Araujo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2005. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil* 273:91–99

- Lamb TG, Tonkyn DW y Kluepfel DA. 1996. Movement of *Pseudomonas aureofasciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. *Can. J. Microbiol.* 42:1112–1120
- Levanony H y Bashan Y. 1990. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunosorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. *Curr. Microbiol.* 20:91–94
- Leyval C, Laheurte F, Belgy G y Berthelin J. 1990. Weathering of micas in the rhizospheres of maize, pine and beech seedlings influenced by mycorrhizal and bacterial inoculation. *Symbiosis* 9: 105–109
- Liermann LJ, Kalinowski BE, Brantley SL, Ferry JG. 2000. Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Ac. Geochim. Cosmochim.* 64, 587–602
- Lodewyckx C, Taghavi S, Mergeay M, Vangronsveld J, Clijsters H y van der Lelie D. 2001. The effect of recombinant heavy metal resistant endophytic bacteria in heavy metal uptake by their host plant. *Int J Phytoremediation* 3: 173–187
- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mergeay M y Van der Lelie D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21: 583–606
- Lopez BR, Bashan Y y Bacilio M. 2009. Rock colonization plants: abundance of the edemic cactus *Mammillaria fraileana* related to rock type in the southern Sonoran Desert. *Plant Ecol* 201:575–688
- Lutz, E. H. 1981. Geomicrobiology. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 393 pp.
- Mahaffee WF, Kloepper JW. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Microb Ecol* 34:210–223
- Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaga H, Okunishi S y Morisaki H. 2006. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes Environ.* 21:86–100
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd ed. Acad. Press, London.
- Martinez CE. 1999. Saxicolous and riparian vegetation of a piedmont in central-western Argentina. *J Arid Environ* 42:305–317
- Martínez-Aguilar L, Caballero-Mellado J., Orozco J y Martínez-Romero E. 2003. "Diazotrophic Bacteria Associated with Banana (*Musa spp.*). *Plant Soil.* 257:35–47
- Martre P, North GB, Bobich EG, Nobel PS. 2002. Root deployment and shoot growth for two desert species in response to soil rockiness. *Am J Bot* 89:1933–1939
- McInroy JA y Kloepper JW. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* 173:337–342
- McInroy JA, Kloepper JW. 1994. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. pp 19–28. In: O’Gara F, Dowling DN, Boesten B (eds.) Molecular ecology of rhizosphere microorganisms. VCH, Weinheim, Germany *Medicine* 44:301–307
- Miché L y Balandreau J. 2001. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3046–3052
- Misaghi IJ y Donndelinger CR. 1990. Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. *Phytopathology* 80:808–811
- Miyamoto T, Kawahara M y Minamisawa K. 2004. Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:6580–6586
- Mueller-Dombois D, Ellenberg H. 1974. Aims and methods of vegetation ecology. John Wiley and Sons, New York, NY, USA
- Mulyanto B, Stoops G, Van Ranst E (1999) Precipitation and dissolution of gibbsite during weathering of previous andesitic boulders in humid tropical West Java, Indonesia. *Geoderma* 89:287–305.
- Mundt JO y Hinkle FN. 1976. Bacteria with ovules and seeds. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 694–698
- Murphy CP 1986 Thin-section preparation of soils and sediments. AB Academic Publishers. Berkhamsted, Herts, UK
- Nagy L, Proctor J. 1997. Soil Mg and Ni as causal factors of plant occurrence and distribution at the Meikle Kilrannoch ultramafic site in Scotland. *New Phytol* 135:561–566.
- Narisawa K, Usuki F y Hashiba T. 2004. Control of Verticillium Yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3. *Phytopathology* 94:412–418

- Nobel PS, Loik ME. 1999. Form and function of cacti. *In: Robichaux RH (ed) Ecology of Sonoran Desert plants and plant communities.* The University of Arizona Press. Tucson, AZ, USA, pp 143–163.
- Nobel PS, Zutta BR. 2007. Rock associations, root, depth, and temperature tolerances for the “rock live-forever” *Dudleya saxosa*, at three elevations in the north-western Sonoran Desert. *J Arid Environ* 69:15–28.
- Nobel PS. 1983. Nutrient levels in cacti-relation to nocturnal acid accumulation and growth. *Am J Bot* 70:1244–1253.
- Nobel PS. 1988. *Environmental Biology of Agaves and Cacti.* Cambridge University Press, New York
- Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI y Dobereiner J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biol. Fertil. Soils* 21:197–200
- Perret X, Staehelin C y Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180–201
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. pp 179–197. *In: Andrews J, Hirano S (eds) Microbial ecology of leaves.* Springer, New York Berlin.
- Phillips DA, Martínez-Romero E, Yang GP y Joseph CM. 2000. Release of nitrogen: A key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation. pp 205–217 *In: The Quest for Nitrogen Fixation in Rice.* JK. Ladha y PM Reddy (eds.). International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.
- Pikoskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphates in soil in relation with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362–370 (En ruso).
- Pillay VK y Nowak J. 1997. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Can. J. Microbiol.* 43:354–361
- Pirttilä AM, Pospiech H, Laukkanen H, Myllylä R y Hohtola A. 2005. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. *Tree Physiol.* 25:289–297
- Poole RJ. 1971. Effect of sodium on potassium fluxes at the cell membrane and vacuole membrane of red beet. *Plant Physiol.* 47:731–734.
- Preston GM, Bertrand N y Rainey PB. 2001. Type III secretion in plant growthpromoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Mol. Microbiol.* 41:999–1014
- Puente M.E., Li C.Y., Bashan Y. 2009a. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ. Exp. Bot.* 66:389–401
- Puente M.E., Li C.Y., Bashan Y. 2009b. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 66:402–408
- Puente M.E., Rodríguez-Jaramillo M.C., Li C.Y., Bashan Y. 2006. Image analysis for quantification of bacterial rock weathering. *J Microbiol Meth.* 64:275–286
- Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK . 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6:629–642.
- Puente ME, Li CY, Bashan Y. 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants, II. Growth promotion of cactus seedling. *Plant Biology* 6:643–650.
- Puente ME. 1994. Poblaciones bacterianas endófitas y del rizoplano de plantas del desierto degradadoras de roca y su efecto sobre el crecimiento del cardón (*Pachycereus pringlei* [S. Wats] Britt. & Ross). Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC. 141 pp.
- Quadt-Hallmann A y Kloepper JW. 1996. Immunological detection and localization of a cotton endophyte, *Enterobacter asburiae*, strain JM22 in different plant species. *Can. J. Microbiol.* 42: 1144 – 1154
- Quadt-Hallmann A, Hallmann J, Kloepper JW. 1997. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. *Can J Microbiol.* 43:254–259
- Quispel A. 1992. A search of signals in endophytic microorganisms. pp. 471–491. *In D. P. S. Verma, Ed. Molecular signals in plant-microbe communications.* Boca Raton, FL: CRC Press, Inc.
- Raghothama KG. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:665–93
- Rahme LG, Mindrinos MN y Panopoulos NJ. 1991. Genetic and transcriptional organization of the hrp cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *J. Bacteriol.* 173:576–586

- Rainey PB. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Env Microbiol.* 1: 243–257
- Raven JA. 2003. Cycling silicon: the role of accumulation in plants. *New Phytol.* 158:419–421
- Reinhold-Hurek B y Hurek T. 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 29–54
- Reinhold-Hurek B, Hurek T, Gillis M, Hoste B, Vancanneyt M, Kersters K y De-Ley J. 1993. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:574–584
- Reiter B, Bürgmann H, Burg K y Sessitsch A. 2003. Endophytic nifH gene diversity in African sweet potato. *Can. J. Microbiol.* 49:549–555
- Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl Environ Microbiol* 68:2261–2268
- Rennie RJ. 1981. A single medium for the isolation of acetyllyene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol* 27:8–14
- Robert P, Ryan I, Germaine K, Franks A, Ryan DJ y Dowling DN. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett* 278:1–9
- Rodriguez H., Fraga, T. y Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 287: 15–21
- Rosenblueth M Martínez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant microbe in.. MPMI* 19(8):827–37
- Rosenblueth M, Martinez L, Silva J y Martinez-Romero E. 2004. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:27 – 35
- Ruedas M, Valverde T, Castillo SA. 2000. Respuesta germinativa y crecimiento de plántulas de *Mammillaria magnimamma* (Cactaceae) *Stenocereus beneckeii* seedling response to water deficit 3173 bajo diferentes condiciones ambientales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:25–35
- Ryti RT (1984) Perennials on rock islands: testing for patterns of colonization and competition. *Oecol.* 64:184–190.
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Munagala SR, Kloepper JW, Paré PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 134:1017–1026
- Sandhiya GS, Sugitha TCK, Balachandar D y Kumar K. 2005. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *Indian J. Exp. Biol.* 43:802–807
- Sardi P, Sarachhi M, Quaroni S, Petrolini B, Borgonovi GE, Merli S. 1992. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilised roots. *Appl Environ Microbiol* 58:2691–2693
- SAS Institute (1989) JMP version 5.1.2, SAS Institute, Cary, NC, USA
- Schulz B, Boyle C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res.* 109:661–687
- Schulz B, Boyle C. 2006. What are endophytes? p. 1–13. In: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T (eds). *Microbial Root Endophytes*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 367 pp.
- Schulz B, Guske S, Dammann U, Boyle C. 1998. Endophyte-host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* 25:213 – 227
- Schulz B, Römmert AK, Dammann U, Aust HJ, Strack D. 1999. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycol Res.* 103:1275 – 1283
- Schulz B, Wanke U, Draeger S, Aust HLJ. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilisation methods. *Mycol Res.* 97:1447–1450
- Schulze ED, Beck E, Müller-Hohestein K. 2005. *Plant ecology*. Springer, Heidelberg
- Schwartzman DW y Volk T. 1989. Biotic enhancement of weathering and the habitability of Earth. *Nature* 340: 457–460
- Sharrock FR, Parkes SL, Jack HK, Rees-George J y Hartwhorne BT. 1991. Involvement of bacterial endophytes in storage rots of buttercup squash (*Cucurbita maxima* D hybrid ‘Delica’). *N. S. J. Crop Hortic. Sci.* 19:157–165

- Shishido M, Loeb BM, Chanway CP. 1995. External and internal root colonisation of lodgepole pine seedlings by two growth-promoting *Bacillus* strains originated from different root microsites. *Can J Microbiol* 41:707–713
- Sessitsch A, Reiter B, Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Can. J. Microbiol.* 50:239–249
- Siciliano S, Fortin N, Himoc N. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl Environ Microbiol* 67: 2469–2475
- Siciliano SD, Theoret CM, Freitas JR de, Hucl PJ y Germida JJ. 1998. Differences in the microbiol communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol* 44:844 – 851
- Silverman MP y Munoz EF. 1970. Fungal attack on rock: solubilization and altered infrared spectra. *Science* 169: 985–987
- Söderström, B. E. 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil Biol. Biochem.* 9:59 – 63
- Sprent JI y de Faria SM .1987. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. pp. 3–11. *In: Nitrogen Fixation with Non-legumes.* FA Skinner, RM Boddey y I Fendrik (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Sprent JI y Sprent P. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects.* Chapman and Hall, London. 256 pp.
- Sriskandarajah S, Kennedy IR, Yu DG, Tchan YT. 1993. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. *Plant Soil* 153:165–178
- Sturz AV. 1995. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant Soil* 175:257–263
- Sturz, A., and Kimpinski, J. 2004. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes spp.*) can decrease soil population densities of rootlesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262:241–249
- Sturz AV y Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Appl. Soil Ecol.* 15:183–190
- Sturz AV, Christie BR y Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Crit Rev Plant Sci.* 19: 1 – 30
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR y Nowak J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 253:381–390
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Plant physiology*, 4th edn. Sinauer, Sunderland, MA, USA
- Tan Z, Hurek T y Reinhold-Hurek B. 2003. Effect of N-fertilization, plant genotype and environmental conditions on nifH gene pools in roots of rice. *Environ. Microbiol.* 5:1009–1015
- Tsiantos J, Stevens WA. 1986. The population dynamics of *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganensis* and other selected bacteria in tomato leaves. *Phytopathol Mediterr* 25:160–162
- Turner RM, Bowers JE, Burges TL.1995. *Sonoran desert plants, an ecological atlas.* University of Arizona Press. Tucson, AZ, USA
- Ulrich K, Stauber T y Ewald D. 2008. *Paenibacillus*—a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell, Tiss Org.* 93:347–351
- Valverde T, Quijas S, Lopez-Villavicencio M, Castillo S. 2004. Population dynamics of *Mammillaria magnimamma* Haworth (Cactaceae) in a lava-field in central México. *Plant Ecol.* 170:167–184.
- Van Aken B, Peres C, Doty S, Yoon J y Schnoor J. 2004. *Methylobacterium populi* sp. nov., a novel aerobic, pinkpigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilising bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). *Evol Microbiol* 54: 1191–1196
- Van Overbeek L, Van Vuurde J y Van Elsas JD. 2006. Molecular fingerprinting of endophytic communities. p. 337 – 354. *In: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T., editors. Microbial Root Endophytes.* Heidelberg, Germany: Springer-Verlag. 367 pp.
- Van Peer R, Punte HLM, de Weger LA y Schippers B. 1990. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2462–2470

- Verma SC, Singh A, Chowdhury SP y Tripathi AK. 2004. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea sp.* and *Ochrobactrum sp.* using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol. Lett.* 26:425–429
- Viles HA. 1995. Ecological perspectives on rock surface weathering: Towards a conceptual model. 13:21–35
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, von Wettstein D, Franken P y Kogel KH. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13386–13391
- Watteau F y Berthelin J. 1990. Iron solubilization by mycorrhizal fungi producing siderophores. *Symbiosis* 9, 59–67
- Weber OB, Baldani VLD, Teixeira KRS, Kirckhof G, Baldani JI y Dobereiner J. 1999. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil* 210:103–113
- Wiggins IL (1980) *Flora of Baja California*. Stanford University Press. Stanford, CA, USA
- Winter K, Holtum JAM. 2005. The effects of salinity, crassulacean acid metabolism and plant age on the carbon isotope composition of *Mesembryanthemum crystallinum* L., a halophytic C3-CAM species. *Planta* 222:201–209
- Winter K, Smith JAC (1996) Crassulacean acid metabolism. Current status and perspectives. In K Winter, JAC Smith, eds, *Crassulacean Acid Metabolism* pp 389–426. Springer, Berlin.
- Winter K, Ziegler H 1992 Induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* increases reproductive success under conditions of drought and salinity stress. *Oecologia* 92:475–479
- Yamanaka T, Li CY, Bormann B, Okabe H, 2003. Tripartite associations in an alder: effects of Frankia and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant Soil* 254:179–186
- Yanni YG, Rizk RY, Corich V, Squartini A, Ninke K, Philip-Hollingsworth S, Orgambide G, De Bruijn F, Stoltzfus J, Buckley D, Schmidt TM, Mateos PF, Ladha JK y Dazzo FB. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of potential to promote rice growth. *Plant Soil* 194:99–114
- You C y Zhou F. 1989. Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Can J Microbiol* 35: 403–408
- You C, Lin M, Fang X, Song W. 1995. Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. *Soil Biol Biochem* 27:463–466
- You CB, Song HX, Wang JP, Lin M y Hai WL. 1991. Association of *Alcaligenes faecalis* with wetland rice. *Plant Soil* 137:81 – 85
- Zar JH (1999) *Biostatistical Analysis*. 4th edn. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA
- Zavala-Hurtado JA, Valverde PL. 2003. Habitat restriction in *Mammillaria pectinifera*, a threatened endemic Mexican cactus. *J Veg Sci* 14:891–898
- Zhang H.W., Song Y.C., Tan R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat.l Prod. Rep.* 23:753–771
- Zinniel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmariski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG y Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2198 – 2208
- Zwieniecki M, Newton M. 1995. Roots growing in rock fissures: their morphological adaptation. *Plant Soil* 172:181–187.

ANEXO I

Producción de anticuerpos policlonales contra bacterias endófitas de *M. fraileana* para la detección de bacterias endófitas inoculadas en plantas.

Obtención de animales para experimentación

Se adquirieron 12 conejos hembra, de 2.5 meses de edad, línea F1 proveniente de la cruce entre las razas Nueva Zelanda×California. Los animales se mantuvieron en cuarentena bajo condiciones semicontroladas. Dos semanas antes a la primera inmunización los animales se transfirieron al interior del Bioterio del CIBNOR, manteniéndose a condiciones constantes de temperatura a 22°C y 60% de humedad relativa. Cada animal fue colocado en jaulas individuales. El manejo veterinario fue de acuerdo a las especificaciones recomendadas.

Protocolo para la elaboración de vacunas de bacterias endófitas de *M. fraileana*

A partir de cultivos puros de cada cepa bacteriana se prepararon pre-inóculos en cultivos con caldo de soya tripticasa incubados durante 24 h a 130 rpm y 36±1°C. Para obtener el inóculo se transfirió 1mL del preinóculo en nuevo medio de caldo soya tripticasa y se mantuvo en incubación a 130 rpm, 36°C±1°C durante 24 horas para obtener poblaciones bacterianas en crecimiento exponencial. El inóculo obtenido de esta forma, fue centrifugado 3 veces a 4000 rpm durante 20 min. y lavado con *PBSNa* (0.02 M a pH 7). Para atenuar a las bacterias el botón celular fue resuspendido en 5 mL de glutaraldehído al 2.5% y se mantuvo en agitación moderada durante 12 h a 4 °C. Se eliminó el glutaraldehído mediante 3 lavados con *PBS* frío y centrifugación a 4000 rpm durante 20 min. cada lavado. El botón celular fue resuspendido en *PBS* y ajustado a $DO_{540\text{ nm}}=1$ equivalente a 1×10^9 bacterias.

Inmunización

Las vacunas se prepararon con proporciones iguales de antígeno (bacterias endófitas) y adyuvante. Para aumentar la inmunogenicidad de las bacterias se aplicó en la primera inmunización el adyuvante de Freud completo. A partir de la segunda inmunización, 15 días después de la primera, se sustituyó el adyuvante Freud por aceite mineral (acarreador). Cada inmunización consistió en 1 ml de suspensión bacteriana aplicada subcutáneamente en el dorso, a la altura de las patas delanteras o en ancas. El calendario de inmunización aplicado consistió en 11 inmunizaciones semanales.

Se inmunizaron dos conejas por cada morfotipo bacteriano, siendo un total de 5 morfotipos: *Pseudomonas putida* M5TSA, *Enterobacter sakazakii* M2PFe, *Bacillus megaterium* M1PCa, *Bacillus pumilus* y *Azospirillum brasilense* cd. Las primeras tres cepas corresponden a bacterias endófitas de raíz de *M. fraileana*, las dos últimas cepas son bacterias utilizadas como control en diversos experimentos de este estudio. Se consideró un testigo negativo que consistió de dos conejas inmunizadas con una solución sin bacterias.

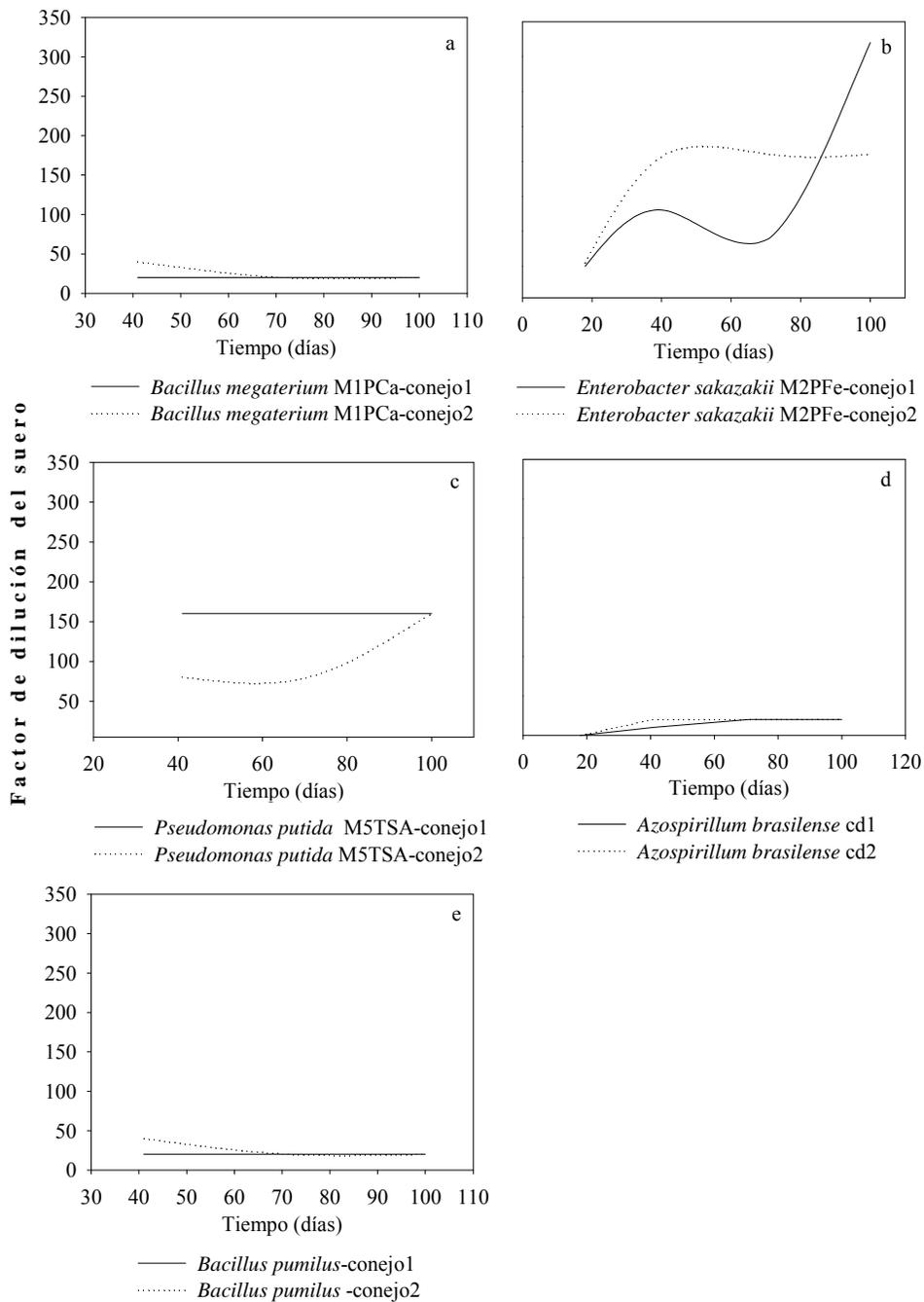
Pruebas de inmunoaglutinación

Se realizaron sangrados mensuales para verificar la presencia de anticuerpos y para su determinación semicuantitativa por inmunoaglutinación. Los sangrados parciales fueron obtenidos de oreja y el último directamente del corazón. La sangre obtenida fue centrifugada a 2655 g durante 10 min. a 4°C, el suero fue separado y conservado en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf para las pruebas de aglutinación. El suero del último sangrado fue almacenado en congelación a -80°C.

Los sueros provenientes del último sangrado fueron descongelados a temperatura ambiente y colocados en baño María hasta una temperatura de 40°C. Se realizaron 9 diluciones en PBS (pH 7.0) de los sueros en microplacas de 100µL. La primera dilución fue 1:5 y las

subsecuentes 1:1 para completar la serie 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280. Los cinco antígenos consistieron en una suspensión bacteriana en PBS ajustada a densidad óptica 1 (540 nm). Para la prueba de aglutinación se colocó un volumen de 25 µL de cada dilución del suero proveniente de cada muestreo de sangre y la misma cantidad del antígeno. Se colocaron testigos con bacteria y PBS y se incubaron las placas en baño María a 40°C durante aproximadamente 10 min. Se observaron las placas a través de un contador de colonias. La prueba se consideró positiva cuando se observó claramente la formación de grumos dispersos. La dilución a la cual se observó respuesta positiva fue registrada como el nivel de título de anticuerpos.

Todas las pruebas de aglutinación para los conejos inmunizados con bacterias demostraron la presencia de anticuerpos contra el antígeno correspondiente. De manera opuesta los conejos inmunizados con PBS no aglutinaron con la mayoría de los antígenos. De acuerdo con las pruebas realizadas se observó que la mayoría de los conejos mostró un pico de producción de anticuerpos aunque la respuesta es diferente contra cada antígeno e incluso entre conejos del mismo tratamiento. De acuerdo con las pruebas de aglutinación la mayor producción de anticuerpos se observó en los conejos inmunizados con los antígenos *Pseudomonas putida* M5TSA y *Enterobacter sakazakii* M2PFe cuyos máximos valores de título fueron 160 y 320, respectivamente. Mientras el resto de los antígenos (*Bacillus megaterium* M1PCa, *Bacillus pumilus* y *Azospirillum brasilense* cd.) produjo niveles de título menores a 20.



Título de anticuerpos producidos por conejos inmunizados con bacterias. Los antígenos de a, b y c corresponden a bacterias endófitas de *M. fraileana*, d y e fueron antígenos utilizados como controles en experimentos de promoción de crecimiento vegetal y degradación de roca.

ANEXO II

Formulación de los medios de cultivo utilizados

Medio de cultivo modificado para el aislamiento de organismos solubilizadores de fosfato de acuerdo a (Henderson y Duff, 1963).

| | g·L ⁻¹ |
|---|-------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 0.4 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.5 |
| *FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.0166 |
| Peptona | 1 |
| Extracto de levadura | 1 |
| Glucosa | 10 |
| Agar | 32 |
| pH = 7.0 | |

Medio de cultivo modificado para el aislamiento de organismos solubilizadores de fosfato de acuerdo a (Pikoskaya, 1948).

| | g·L ⁻¹ |
|---|-------------------|
| Glucosa | 10 |
| KCl | 0.26 |
| Extracto de levadura | 0.5 |
| NaCl | 0.2 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.5 |
| Ca ₃ (PO ₄) ₂ | 3.8 |
| FeSO ₄ | 0.05 |
| Agar | 20 |
| *MnSO ₄ ·4H ₂ O | 0.2 mg/L |
| pH = 7.2-7.3 | |

Medio para el aislamiento de bacterias fijadoras de nitrógeno (reducción de acetileno), según Rennie (1981)

| | g·L ⁻¹ |
|---------------------------------|-------------------|
| Solución I | |
| K ₂ HPO ₄ | 0.8 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g |
| NaCl | 0.1 g |
| Na ₂ Fe EDTA | 0.028 g |

| | |
|---|---------|
| Na ₂ Mo O ₄ · 2H ₂ O | 0.025 g |
| * Extracto de Levadura | 0.100 g |
| Manitol | 5 g |
| Sacarosa | 5 g |
| Lactato de sodio | 0.5 mL |
| Agua destilada | 900 mL |

Solución II

| | |
|---------------------------------------|--------|
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2 g |
| CaCl ₂ | 0.06 g |
| Agua destilada | 100 mL |

* Sustituido por NH₄ Cl al 2% en medio mínimo

Esterilizar en autoclave ambas soluciones por separado, enfriar y mezclar. Adicionar biotina (5 µg/L) y ácido para-amino benzoico (PABA) (10 µg·L⁻¹) previamente esterilizados por filtración. Ajustar el pH a 7.0. Para preparar medio semisólido se agrega 0.35 % de agar a la solución I. En caso de requerir medio sólido se agrega 2 % de agar.