



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“EFECTO DE LA INOCULACION CON *Azospirillum
brasilense* EN EL FLUJO DE PROTONES DE LA
MEMBRANA CELULAR DE RAIZ DE MEZQUITE
(*Prosopis articulata*) EN UN SISTEMA AEROPÓNICO”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Agricultura Sustentable)**

P r e s e n t a

Cintha Guadalupe Chávez Ramos

La Paz, Baja California Sur, Marzo del 2013.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:30 horas del día 28 del Mes de Febrero del 2013, 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:

"EFECTO DE LA INOCULACION CON *Azospirillum brasilense* EN EL FLUJO DE PROTONES DE LA MEMBRANA CELULAR DE RAIZ DE MEZQUITE (*Prosopis articulata*) EN UN SISTEMA AEROPÓNICO"

Presentada por el alumno:

Cinthya Guadalupe Chávez Ramos

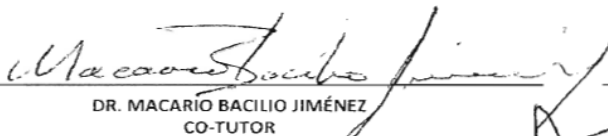
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Agricultura Sustentable**

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 COMISION REVISORA


DR. YOAV BASHAN
DIRECTOR DE TESIS


DRA. LUZ GONZÁLEZ DE BASHAN
CO-TUTOR


DR. MACARIO BACILIO JIMÉNEZ
CO-TUTOR


DRA. CECILIA MÓNICA CREUS
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial y revisor de tesis.

Dr. Yoav Bashan (Director de Tesis)

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Dra. Luz González de Bashan (Cotutora de tesis)

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Dr. Macario Bacilio Jiménez (Cotutor de tesis)

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Dra. Cecilia Mónica Creus (Cotutora de tesis)

Universidad Nacional de Mar del Plata

Buenos Aires, Argentina.

Jurado de la defensa de Tesis:

Dr. Yoav Bashan

Dra. Luz González de Bashan

Dr. Macario Bacilio Jiménez

Dra. Cecilia Mónica Creus

Suplente:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Resumen

Azospirillum es la bacteria asociativa más estudiada. Afecta positivamente una gran diversidad de plantas. No se ha definido el mecanismo principal por medio del cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, y se ha visto que la asociación planta-bacteria se comunica a través de un complejo lenguaje que apenas empezamos a descifrar. Por tal motivo esta investigación está orientada a entender cuál es el efecto que tiene la inoculación de la cepa silvestre *A. brasilense* sp245, y las cepas mutantes *A. brasilense* Faj164 y *A. brasilense* Faj009, en el mecanismo bomba de protones de la raíz del mezquite, el cual se propone como una alternativa de reforestación de zonas áridas. Estas tres cepas se caracterizan por presentar diferencias en la producción de óxido nítrico. Para estudiar este mecanismo se utilizó un sistema aeropónico, porque es una herramienta no invasiva para examinar las raíces durante su desarrollo. En esta investigación se observó que la cepa Faj009 incrementó la acidificación de la rizosfera y aumentó la superficie de raíz cuando las plántulas son nutridas con amonio como única fuente de nitrógeno, lo cual puede favorecer el establecimiento de las plántulas a terreno fijo. Además, se observó que la colonización de las cepas de *A. brasilense* se favorece cuando las plántulas son nutridas con amonio como única fuente de nitrógeno y estas son capaces de presentar morfotipos diferentes como respuesta a condiciones de temperaturas mayores a 36°C y a menores a 30°C. Estos resultados indican que el flujo de protones y la colonización de la bacteria en la raíz del mezquite depende del ion amonio y la afinidad entre una especie bacteriana y la planta hospedera.

Palabras claves: *Azospirillum brasilense*, bomba de protones, sistema aeropónico, amonio y nitrato

Abstract

Azospirillum is the most studied associative bacteria. It affects a large number of plant species positively. The mechanism by which *Azospirillum* affects plant growth is not defined and the communication among association plant-bacteria is a complex language which we are starting to decode. For this reason, research is aimed at understanding which inoculation effect of three strains sp245, Faj164, and Faj009 on proton efflux of mesquite roots a plant used for restoration in arid regions. These strains are characterized by differences in nitric oxide production. To study this mechanism an aeroponic system was used because of its noninvasive tools to examine the plant roots during development. Our research results showed that strain Faj009, enhanced rhizosphere acidification and increased root surface in the presence of ammonium. Besides, *Azospirillum* colonization increased in the presence of ammonium and these strains were presenting different morphotypes in response to temperatures over 36°C and under 30°C. These results indicate that proton efflux and colonization in mesquite roots are influence by ammonium ion and the affinity among plants-bacteria dependent.

Keywords: *Azospirillum brasilense*, proton pump, aeroponic system, ammonium and nitrate.

Dedicatoria

A mi gran amor Francisco, porque siempre estas a mi lado, brindándome todo tu amor, entrega, dedicación y sobre todo por tenerme paciencia y comprensión durante estos años de mi vida y quien ha sido una pieza clave en mi desarrollo profesional.

A mis padres. Por los ejemplos de perseverancia y constancia que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien y por su amor incondicional.

A mis hermanos. Por todo el apoyo, amor incondicional y la confianza que siempre han depositado en mí.

A mis amigos. Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Viridiana Soria, Abel López, Miguel Matus, Emanuel Vidaña y Juan A. Larrinaga.

Finalmente a los maestros y aquellos que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

*“La ciencia se compone de errores,
que a su vez,
son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

Agradecimientos

Un especial agradecimiento para el Dr. Yoav Bashan y la Dra. Luz Estela González, directores de esta tesis, gracias por su guía y paciencia a lo largo de la realización de esta tesis, ya que sin su dirección esta tesis no se hubiese realizado.

A mis asesores el Dr. Macario Bacilio y la Dra. Cecilia M. Creus por sus acertadas observaciones y sugerencias a lo largo de esta investigación.

A todo los integrantes del grupo de microbiología ambiental del CIBNOR (a mis amigos Choix, Emmanuel, Paty, Juan, Blanquita, Luis, Oscar, Edgar, Cris, Betty, Edisa, Pau, y Manolo) gracias por todos los comentarios y sugerencias que han enriquecido esta tesis muchas gracias a todos.

A la “Bashan Foundation”, USA.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro 243627 y número de beca 51082.

Al posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades y la extensión de beca otorgada.

Al financiamiento del Proyecto CONACyT 130656

A la Dirección de estudios de Posgrado, CIBNOR, y su directora Dra. Elisa Serviere Zaragoza por las correcciones y aportaciones a esta tesis.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR y sus técnicos:

M. en C. Juan Pablo Hernández Sánchez por su apoyo con el funcionamiento de equipos, por sus aportaciones en los diseños experimentales, por heredar sus conocimientos de estadística y diseño de gráficos, por ayudar en la búsqueda de bibliografía y por el apoyo en el transporte de garrafones de agua, por su amistad y apoyo incondicional.

Biol. Patricia Vázquez Correa por compartir sus conocimientos en técnicas microbiológicas, por su apoyo en diseño de gráficos, por ayudar en la búsqueda de

bibliografía, por su ayuda en la disponibilidad de equipos e ideas en el diseño experimental, por su apoyo y consejos y sobre todo por gran amistad, muchas gracias.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez responsable del Laboratorio de cómputo, gracias por su apoyo en el uso de las instalaciones de cómputo, aulas y apoyo en el uso de software.

A Jorge Cobos Anaya responsable del Taller de maquinados por su apoyo en el mantenimiento, préstamo de herramientas utilizadas e ideas en el diseño del sistema aeropónico.

A la M. C. Diana Leticia Dorantes Salas, por sus correcciones en el resumen de la tesis y por su apoyo y consejos en el aprendizaje de idioma Inglés.

Al Dr. Amaury Cordero Tapia, responsable del Bioterio del CIBNOR por su apoyo en el uso de las instalaciones del Bioterio y préstamo de equipos.

A la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro y al M en C. Mario Rojas del Laboratorio Biología Molecular de Plantas por su apoyo en el uso de equipos del laboratorio.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1 El árbol del Mezquite (<i>Prosopis articulata</i>)	3
2.2. <i>Azospirillum</i> spp. como promotora de crecimiento en plantas	4
2.3 Efecto de <i>Azospirillum</i> spp. en la inoculación de las raíces.....	5
2.4 Posibles mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i> spp. sobre el crecimiento vegetal	6
2.5 Mecanismo de extrusión de protones de la raíz inducido por <i>Azospirillum</i> spp. ...	7
2.6 Sistema aeropónico y propagación de plantas	9
3. Justificación.....	11
4. Objetivo General	12
4.1 Objetivos Particulares	12
5. Hipótesis.....	12
6. Materiales y Métodos.....	13
6.1. Recolección de la semilla de mezquite	13
6.2. Extracción y almacenamiento de las semillas.....	13
6.3 Estandarización del sistema aeropónico.....	14
6.3.1. Germinación	15
6.3.2. Posgerminación	16
6.3.3. Cepas utilizadas	16
6.3.4. Preparación del inóculo	17
6.3.5. Inoculación	17
6.3.6. Trasplante al sistema aeropónico.....	18
6.3.7. Determinación de los programas del tiempo para el riego del sistema aeropónico	18
6.3.8. Determinación de la mínima concentración de solución Hoagland requerida para el crecimiento del mezquite.....	19
6.3.9. Medición de pH.....	19
6.3.10. Medición de vástago.....	20
6.3.11. Medición de Raíz.....	20
6.4. Determinación del efecto de la inoculación con <i>A. brasilense</i> en el flujo de protones y evaluación de la colonización de <i>A. brasilense</i> en la raíz del mezquite en presencia de amonio y nitrato	20
6.4.1. Estimación de superficie de raíz por el método de analizador de imagen.....	21

6.4.2. Peso seco	22
6.4.3. Evaluación de la colonización de bacterias en la raíz de mezquite mediante la técnica de Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	22
6.4.4. Detección de <i>Azospirillum brasilense</i> en raíz por Microscopía óptica fluorescente.....	25
6.4.5. Conteo de microorganismos	26
6.4.6 Aislamientos, descripción e identificación de colonias.....	27
6.4.7. Análisis estadísticos.....	27
7. Resultados	28
7.1 Estandarización del sistema aeropónico.....	28
7.1.1 Determinación de los tiempos de programación del Timer de riego del sistema aeropónico	28
7.1.2 Determinación de la mínima concentración de solución Hoagland requerida para el crecimiento del mezquite	29
7.1.3 Medición de pH	30
7.2 Determinación del efecto de la inoculación con <i>A. brasilense</i> en el flujo de protones y evaluación de la colonización de <i>A. brasilense</i> en la raíz del mezquite en presencia de amonio o nitrato	34
8. Discusión	45
9. Conclusión	49
10. Literatura Citada	50
ANEXO 1	60
ANEXO 2	61
ANEXO 3	62

Lista de figuras

Figura 1. Sistema aeropónico.	14
Figura 2. Plan experimental objetivo 1.....	15
Figura 3. Descripción del objetivo 2.....	21
Figura 4. Plántulas no inoculadas, caja 2 alimentadas con amonio como única fuente de nitrógeno en solución nutritiva.	22
Figura 5. Representación gráfica del fundamento para la identificación de <i>A. brasilense</i> por FISH.	26
Figura 6. Crecimiento de las plántulas en las tres concentraciones de solución Hoagland.....	30
Figura 7. Mediciones de pH del control y los tres tratamientos	31
Figura 8. Medición de pH de los tratamientos con sus respectivas replicas.....	32
Figura 9. Medición de pH de los tratamientos con sus respectivas replicas.....	33
Figura 10. Medición de pH de la solución nutritiva con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato.....	35
Figura 11. Estimación de superficie de raíz de las plántulas que tienen disponible una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato..	36
Figura 12. Peso seco de raíz de las plántulas nutridas con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato.....	37
Figura 13. Micrografías de las tres cepas están ordenadas por filas.....	38
Figura 14. Micrografías de las raíces nutridas con amonio están ordenadas en filas.....	39
Figura 15. Micrografías de las raíces nutridas con nitrato ordenadas en filas.....	40
Figura 16. Conteo de <i>A. brasilense</i> de las plántulas nutridas con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato, respectivamente.....	42
Figura 17. Morfotipos coloniales encontrados en las plántulas de mezquites inoculadas con las cepas de <i>A. brasilense</i> , aisladas y sembradas en medio solido OAB.....	43

Lista de tablas

Tabla 1. Composición de buffer de lavado y buffer de hibridización.	24
Tabla 2. Evaluación de tiempos de riego del sistema aeropónico.	28
Tabla 3. Diferencias en la longitud de vástago y raíz a diferentes concentraciones de sol. Hoagland.....	29
Tabla 4. Descripción de las diferentes colonias encontradas en las raíces inoculadas. ..	44

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la pérdida de vegetación natural del desierto de Sonora en Baja California Sur se debe a una agricultura marginal dando como resultado una severa erosión del suelo y por consiguiente una contaminación por polvo cuando estos campos son abandonados después de varios años de cultivo (Bashan *et al.*, 2000). Para contrarrestar este efecto desfavorable en la salud pública, se han propuestos programas de reforestación para suelos abandonados por incidencia urbana y agrícola basados en asociaciones entre planta-bacteria.

Prosopis es un género que da buena sombra en hábitats donde otros árboles no prosperan, se ha propuesto como una planta para reforestar zonas áridas y semiáridas. Sin duda la gran importancia ecológica del mezquite se basa principalmente en su capacidad para servir como árbol nodriza es decir, facilita el crecimiento de otras plantas bajo el área que abarca su follaje como son el cardón (*Pachycreus pringlei*), cholla (*Opuntia cholla*), pitahaya (*Stenocereus thurberi*) (Carrillo-García *et al.*, 1999).

La interacción *Azospirillum*-planta se ha considerado como una asociación simbiótica mutualista que afecta a una gran diversidad de plantas de diferentes familias botánicas, sin embargo, no se ha definido el mecanismo principal por medio del cual se promueve el crecimiento o mejora de las plantas, no obstante, se han propuesto diversos mecanismos entre los más estudiados se encuentran; la fijación de nitrógeno atmosférico, efectos hormonales, incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, alteración del funcionamiento de la membrana y también se ha sugerido que este efecto puede deberse a la adición de todos los mecanismos antes mencionados (Bashan y de-Bashan, 2010).

Partiendo de esta premisa, la investigación que se realizó propone explicar el efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* sobre la bomba de protones que afecta la acidificación del apoplasto de la raíz del mezquite (*Prosopis articulata*), y que está influenciado por el tipo de cepa y la presencia de amonio o nitrato, beneficiando el crecimiento de plántulas de mezquite en un sistema aeropónico.

Para estudiar el mecanismo bomba de protones se propuso utilizar un sistema aeropónico donde las raíces se mantienen en un entorno saturado con una niebla de solución nutritiva, asegurando que las raíces se mantengan uniformemente húmedo en todo momento. El sistema aeropónico ha sido usado para el estudio de microorganismos en raíces. Además, ha sido usado en investigaciones porque es un medio no invasivo para examinar raíces durante su desarrollo (Mbiyu *et al.*, 2012) Entre los beneficios de este sistema de cultivo se encuentra la reducción de interferencias que pudieran afectar nuestro fenómeno de estudio transmitidas por el suelo, el aprovechamiento de nutrientes y agua debido a la recirculación, además de la facilidad en la recolección y manipulación del sistema de raíces del mezquite.

2. ANTECEDENTES

2.1 El árbol del Mezquite (*Prosopis articulata*)

Prosopis (mezquite) es un género de leguminosas extremadamente diverso de 44 especies de árboles de las regiones semiáridas, principalmente en Chile, Argentina, Perú, México y el suroeste de Estados Unidos. Además es una especie introducida en el oeste de África, en la región del Cáucaso y la India. (Felker, 1981).

El mezquite es una planta con múltiples usos en los lugares en los que se desarrolla. La madera es un excelente combustible. El uso y el comercio de leña y carbón es una parte importante de la economía rural en muchas partes del área de distribución natural y en algunos países donde se ha sido introducido. La madera aserrada tiene un color agradable y se utiliza para la fabricación de muebles y pisos, especialmente en EE.UU. y Argentina. La madera también se utiliza para mangos de herramientas y otros artículos para el hogar.

Además de su importancia económica (Felker y Guevara, 2003), también debemos considerar su gran importancia ecológica basada principalmente en su capacidad para servir como árbol nodriza, es decir, facilita el crecimiento de otras plantas bajo el área que abarca su follaje. Es común en lugares semidesérticos encontrar árboles de mezquite y apreciar que bajo su sombra crecen, protegidas, diferentes especies de plantas que incluyen cardón (*Pachycreus pringlei*), cholla (*Opuntia cholla*), pitahaya (*Stenocereus thurberi*) y garambullo (*Lophocereus schottii*). Cabe destacar que la capacidad de ser nodriza, cualidad que comparte con otras leguminosas como el palo fierro (*Olnella tesota*), se presenta casi exclusivamente en árboles maduros; los árboles jóvenes sólo ocasionalmente presentan este fenómeno (Carrillo- García *et al.*, 1999). Mejores condiciones de nutrientes y humedad, así como la disminución de temperaturas extremas, han sido citadas como parte de los efectos benéficos de una planta nodriza (Franco y Nobel, 1989; Carrillo- García *et al.*, 2000). Otros autores han hecho énfasis en la importancia de los árboles nodriza como perchas para aves favoreciendo así la dispersión de semillas (Olin *et al.*, 1989). Sin embargo, no hay un acuerdo sobre cuál de estas contribuciones es la más importante para mejorar la sobrevivencia de plántulas bajo su dosel. Otra importancia de *Prosopis* es la capacidad que

tienen de producir raíces profundas, lo que permite a los árboles llegar a las capas freática, crecer y fructificar incluso en años seco, lo que funciona como un tampón durante las sequías dando un servicio de un valor incalculable. Muchas especies parecen requerir el acceso a una mesa de agua para sobrevivir, y algunos creen que son responsables del agotamiento de las reservas de agua subterránea.

El suelo de mezquite es rico en nutrientes y materia orgánica (Tiedemann y Klemmedson, 1973; Virginia y Jarrel, 1986). Además, posee una gran cantidad de retención de agua debido a los materiales finos que lo componen (arcillas) (Bashan *et al.*, 2000) en contraste con otros suelos de leguminosas con menor cantidad de estos materiales (suelo de palo fierro, *Olneya tesota*). Por lo tanto, la inoculación con microorganismos promotores del crecimiento, como reformadores del suelo (Fauci y Dick, 1994), pudiera ser una buena estrategia para la aceleración artificial de su desarrollo como parte de un programa de restauración. Se ha sugerido al género *Azospirillum* como una alternativa a la fertilización química.

2.2. *Azospirillum* spp. como promotora de crecimiento en plantas

La primera especie de *Azospirillum* fue aislada en Holanda por Beijerinck (1925) a partir de suelos arenosos pobres en nitrógeno, y fue originalmente llamada *Spirillum lipoferum*. En la actualidad se han reportado 10 especies para este género: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopreferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereinae*, *A. oryzae*, *A. melinis* y *A. canadense* (Menhaz *et al.*, 2007). Las bacterias del género *Azospirillum* han sido aisladas de la superficie de la raíz de una muy amplia variedad de plantas y de su rizosfera, incluyendo generalmente cereales como maíz, trigo, arroz, sorgo, avena y pastos forrajeros (Bashan y Levanovy, 1990).

El interés científico por esta bacteria está principalmente basado en su habilidad para mejorar el crecimiento de numerosos cultivos de interés agrícola (Rothballer *et al.*, 2003) y ecológico de ahí que se le conozca como bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB por sus siglas en inglés) (Bashan y Holguín, 1998). La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede resultar en un cambio significativo en diversos parámetros de crecimiento de la planta, los cuales pueden o no afectar el cultivo. Entre tales parámetros se

pueden mencionar: incremento en el peso seco total de la planta, cantidad de nitrógeno en granos, germinación temprana y alta tasa de germinación, incremento del peso del grano, mayor altura de la planta y tamaño de la hoja, etc. (Bashan y Levanovy, 1991).

2.3 Efecto de *Azospirillum* spp. en la inoculación de las raíces

El efecto más sobresaliente de la inoculación de las plantas con *Azospirillum* se ha observado en el desarrollo de la raíz, principalmente en cambios morfológicos del sistema radicular, como son incremento en la longitud de la raíz (zona de elongación), incremento en el número y longitud de raíces laterales, incremento en el peso seco de la raíz, incremento en el área del sistema radicular, y estimulación de exudados de la raíz (Hadas y Okon, 1987; Levanony y Bashan, 1989).

Estos cambios se encuentran directamente relacionados con la concentración del inóculo; cuando éste es superior a los niveles óptimos tiene efectos inhibitorios, mientras que dosis bajas no causan efecto. El nivel de inoculación óptimo en semillas y plántulas para muchos cereales, y en vegetales y plantas de cultivo comerciales, se ha observado que es de alrededor de 10^5 - 10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1989c; Smith *et al.*, 1984). Una concentración de inóculo de 10^8 - 10^{10} UFC/mL generalmente inhibe el desarrollo radicular (Bashan, 1986). Estos datos no han revelado cuántas células bacterianas por semilla o plántula se requieren para obtener una respuesta vegetal positiva.

Para la identificación de *Azospirillum* en la raíz se ha considerado la complementariedad de técnicas para alcanzar un mejor argumento en la identificación. Durante años se ha trabajado con la aplicación de técnicas dependientes de cultivo y el uso de microscopía convencional. En los últimos años, la identificación de *Azospirillum* en raíz así como su efecto en la rizosfera se ha reportado a partir del uso de técnicas moleculares ó independientes de cultivo, acompañadas por diversos tipos de microscopías. Entre ellas se pueden mencionar la técnica llamada hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés). En ecología microbiana, la hibridación fluorescente *in situ* permite la visualización de células procariontas en su ambiente natural, y además pueden ser identificadas sin ser cultivadas, utilizando regiones específicas del 16S ó 23S r RNA

(Mutter y Göbel, 2000). La técnica utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA, y consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas son marcadas con moléculas fluorescentes. Las sondas se hibridizan o unen al DNA complementario y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran (Zwingrmaier, 2005; Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1995). La visualización de la sonda, que se encuentra en cada una de las células microbianas, se realiza mediante el apoyo de microscopía fluorescente ó microscopía confocal. Rothballer *et al.* (2003) evaluó el potencial endofítico de 2 cepas de *Azospirillum brasilense* (Sp245 y Sp7) utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* en raíces de 3 diferentes variedades de trigo (*Triticum aestivum*). Se analizaron los efectos benéficos de la inoculación de la bacteria sobre las plantas combinando la visualización con microscopía confocal. Por otra parte Assmus *et al.* (1995), utilizaron además etiquetas fluorescentes como DAPI, principalmente para visualizar la región complementaria del 16S r RNA específica para el dominio Bacteria, la región 18S r RNA específica para el dominio *Eucarya*, la región 16S r RNA conservada para la subclase alfa de *Proteobacteria* y la región 23S r-RNA complementaria para *Azospirillum brasilense* con el propósito de visualizar la colonización de tres cepas de *A. brasilense* (Sp7, Sp245 y Wa3) en raíces de trigo, utilizando la técnica de hibridación fluorescente *in situ* y visualizando las muestras con microscopía de barrido laser confocal.

2.4 Posibles mecanismos de acción de *Azospirillum* spp. sobre el crecimiento vegetal

Si bien no se ha definido el mecanismo por el cual *Azospirillum* promueve el crecimiento vegetal, existe literatura donde se reportan diversos modos de acción relacionados con este parámetro, como son fijación de nitrógeno en donde se demostró cuales aminoácidos liberados en las raíces de las plantas pueden estimular o inhibir la actividad de la nitrogenasa de *Azospirillum* y la osmotolerantes de cepas de *A. brasilense* y *A. halopraeferens* (Hartmann, 1998; Holguín y Bashan, 1996); efectos hormonales como la producción de ácido indolacético (AIA) por *Azospirillum* es capaz de alterar la morfología

de la raíz esto se demostró utilizando diferentes cepas modificadas genéticamente variando la biosíntesis de la auxina (Dobbelaere *et al.*, 1999; Croizer *et al.*, 1998); El ácido abscísico (ABA) se ha reportado que es producido por *A. brasilense* Sp245 cuando se le adiciona NaCl al medio de cultivo. Estos resultados contribuyen a explicar, al menos en cierta medida, los efectos beneficiosos de *Azospirillum* spp. previamente inoculado a plantas sometidas a condiciones ambientales adversas (Cohen *et al.*, 2008); ácido índol butírico, también producido por *A. brasilense*, fue detectado por la técnica HPLC y evaluado en plántulas de maíz induciendo actividad biológica a lo largo de la raíz (Martínez *et al.*, 2003). Giberelinas de varios tipos se identificaron en cultivo aséptico de *A. lipoferum* (Bottini *et al.*, 1989), observándose un incremento en el crecimiento del sistema completo de raíces, lo cual puede estar relacionado con cambios hormonales favoreciendo una mayor capacidad de absorción de agua y minerales; alteración del funcionamiento de la membrana por medio de moléculas de comunicación celular (moléculas de este tipo de bajo peso molecular, pueden ser responsables de alterar actividad y funciones de membrana relacionadas con la absorción de iones); y una hipótesis aditiva que propone la intervención de todos los mecanismos mencionados (Bashan *et al.*, 2004; Bashan y de Bashan, 2010)

2.5 Mecanismo de extrusión de protones de la raíz inducido por *Azospirillum* spp.

Sin importar el mecanismo utilizado por *Azospirillum*, el resultado será la afectación del metabolismo celular de las plantas desde la superficie de la células, es decir sin entrar en las células vegetales y esto sugiere que estas bacterias son capaces de excretar y transmitir una o varias moléculas señales que atraviesan la pared celular vegetal y son reconocidas por las membranas de las raíces de plantas causando una alteración en el funcionamiento de la membrana (Bashan, 1986; Bashan y Levanony, 1989a; Bashan *et al.*, 1989b; Bashan, 1990; Bashan, y Levanony, 1991). Esta interacción puede iniciar una cadena de eventos que resulta en la alteración del metabolismo de la planta inoculada y en la modificación de la arquitectura de las raíces. Dado que las membranas vegetales son extremadamente sensibles a cualquier cambio, su respuesta puede servir como un preciso indicador de la actividad de *Azospirillum* en el nivel celular. Por ejemplo, en segmentos de hipocótilos de pepino se ha demostrado una mayor extensibilidad de la pared debido a la inoculación con *A. brasilense* (Pereyra *et al.*, 2010).

La mejora en el crecimiento de la planta por la de extrusión de protones (bomba de protones) y ácidos orgánicos inducido por la inoculación con *Azospirillum* spp.. Una bomba de protones es una proteína integral de membrana que es capaz de mover protones (H) a través de la membrana celular, mitocondrial u otro compartimento subcelular. Los protones se mueven desde el espacio encerrado por las dos membranas en el organelo y se liberan en el espacio intermembranal, creándose un gradiente de pH y carga eléctrica a través de la membrana plasmática que actúa como un depósito de energía almacenada por la célula. (Gaxiola *et al.*, 2007).

En general, la extrusión de protones provee la fuerza necesaria para el transporte de cationes, iones, aminoácidos y azúcares (Marshner *et al.*, 1986). Por lo tanto, la presencia del ion NH_4^+ dentro de las células de la raíz y su incorporación dentro de los aminoácidos y amidas produce una liberación simultánea de protones para compensar cargas (Marshner *et al.*, 1986). Toda esta liberación de protones acidifica la rizosfera cambiando, posiblemente, el estado de oxidación de importantes nutrientes como el fósforo, movilizándolo hacia una forma más disponible para la planta. Por lo tanto, compuestos (o microorganismos) que promuevan la extrusión de protones deberían estimular el crecimiento de plantas (Taiz y Zeiger, 1998). En el estudio del flujo de protones de raíces de trigo se encontró que es dependiente de la luz, aereación, y fuente de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-) debido a que el ion amonio activa la bomba de protones y el ion nitrato disminuye la actividad (Bashan y Levanony *et al.*, 1989). También en plántulas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Deganit) se ha reportado que la mayor actividad en el flujo de protones se encuentra en las primeras 20h después de la inoculación con *A. brasilense* Cd. (Bashan *et al.*, 1989).

Más tarde se demostró que exposiciones cortas de *A. brasilense* Cd en plántulas de trigo pueden causar mayor actividad en el flujo de protones y esto puede estar relacionado con el nivel óptimo de inoculación (10^5 - 10^7 UFC/mL) y el estado fisiológico de la bacteria (Bashan, 1990).

El cambio en el potencial de membrana también fue estudiado en plántulas de soya encontrándose que disminuye a lo largo de la raíz, sin embargo, es mayor en la zona de elongación (Bashan y Levanony, 1991). En otros estudios se encontró que las plántulas de cactus (cardón gigante, *Pachycereus pringlei*) mejoran su crecimiento cuando son inoculadas con *A. brasilense* y tiene como fuente de nitrógeno amonio esto debido al

incremento de la acidificación de la rizosfera lo que facilita la solubilidad del fosfato, mejorando el crecimiento de la raíz (Carrillo *et al.*, 2002).

2.6 Sistema aeropónico y propagación de plantas

La aeroponía o crecimiento de plantas en aire ha sido reportado desde hace mucho tiempo. Uno de los primeros experimentos en aeroponía fue realizado por W.A Carter quien propuso un aparato para el cultivo de plantas en vapor de agua (Carter, 1942). Más tarde Zobel *et al.*, (1976) propusieron una caja experimental de crecimiento empleando una ruleta giratoria para la generación de vapor. Las publicaciones anteriores, se extiende por más de 30 años, todas se relacionan con los dispositivos experimentales diseñados para permitir el examen y el acceso relativamente libre a la raíz de la planta para su tratamiento, todo ello en un contexto de investigación. Existen varias razones por las cuales se ha propuesto cultivar a las plantas fuera del ambiente del suelo. Un problema de gran importancia es el crecimiento de las flores debido a que presentan enfermedades que llegan a las plantas a través del suelo. Por ejemplo, las especies del genero *Fusarium*, presentes en ciertos suelos, causan enfermedades en la plantas de clavel, y bananos (Severn-Ellis *et al.*, 2003). Otros ejemplos de enfermedades de plantas que surgen del contacto con la tierra son *Botrytis*, *Sclerotium*, *Verticilium* y *Rhizoctonia*. Otra dificultad relacionada con el ambiente del suelo se plantea en relación con las plantas que requieren un tratamiento especial y específico para mejorar su crecimiento. Por ejemplo, en el caso de las orquídeas, la aeroponía se ha encontrado deseable para poder suministrar ciertas hormonas de crecimiento con el fin de mejorar su desarrollo. La aplicación de hormonas de plantas en un ambiente del suelo se hace difícil y relativamente costosa debido a la cantidad relativamente grande que se debe aplicar además de que deben ser administradas indirectamente las hormonas a través del suelo.

Por otra parte, se ha probado su uso potencial en estudios de crecimiento de las plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivadas en el sistema de la etapa de cotiledón hasta la floración y la fructificación obteniéndose un crecimiento rápido de la raíz con buena ramificación (Peterson y Krueger, 1988).

La aeroponía comparada con la hidroponía o el crecimiento de plantas en agua presenta ventajas como una adecuada ventilación en las raíces debido a que el agua no las rodea continuamente, es un sistema más avanzado y de tecnología más sofisticada que el sistema hidropónico tradicional. En el sistema aeropónico las raíces no están sumergidas en la solución nutritiva (como ocurre en un sistema de raíz flotante) sino que la solución es suministrada periódicamente a las raíces en forma de nebulización a través de nebulizadores o aspersores. Esta comparación se aplicó en la producción de minitubérculos de papa y se obtuvo un 70% más en la producción total en las papas (Ritter *et al.*, 2001). La productividad de plantas medicinales y tubérculos bajo sistema aeropónico ha presentado una mayor eficiencia en la optimización de espacio en invernaderos (Hayden, 2006).

Este método alternativo favorece el estudio de procesos que mejoran el crecimiento de plantas por ejemplo en la inoculación de *Acacia mangium* con cepas de *Bradyrhizobium* spp. y el estudio de la nodulación por *Rhizobium leguminosarum* y *Pisum sativum* (Martin-Laurent *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 1980).

También se ha empleado este sistema para la medición de tasas de absorción de agua y de iones en arándanos, midiendo concentraciones y volúmenes de entrada y salida al sistema. Los resultados muestran un potencial de la aeroponía como herramienta de investigación, para control de la salud vegetal y la optimización de los cultivos en ambientes cerrados (Barak *et al.*, 1996).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los estudios en Microbiología Ambiental se han desarrollado progresivamente y gran parte de ellos se están aplicando en beneficio de la sociedad y el medio ambiente. En la presente tesis se persigue comprobar que la inoculación con *Azospirillum brasilense* produce cambios en la bomba de protones del apoplasto de la raíz de *Prosopis articulata*, especie que posee una gran importancia ecológica basada principalmente en su capacidad como árbol nodriza, facilitando el crecimiento de otras plantas bajo el área que abarca su follaje, mediante el incremento de nutrientes y humedad, así como disminuyendo las temperaturas extremas bajo su dosel. Asimismo, tiene la función de perchas para aves favoreciendo la dispersión de semilla. *Prosopis articulata* tiene la capacidad de producir raíces profundas, lo que le permite llegar a las capas freáticas, crecer y fructificar incluso en años de sequía dándole un valor incalculable a esta especie.

Cabe mencionar que para poder realizar este estudio se pretende utilizar el cultivo aeropónico debido a que disminuye la posibilidad de tener interferencias por sustancias presentes en el suelo y facilita la manipulación de las raíces que es nuestro sistema de estudio además el gasto de agua y nutrientes es sumamente bajo con respecto a otros como el sistemas hidropónicos, y finalmente presenta mayor rendimiento por área y por planta.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el flujo de protones del apoplasto de raíz del mezquite (*Prosopis articulada*) en presencia de amonio o nitrato, bajo condiciones de un sistema aeropónico.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Estandarización de un sistema aeropónico.

- ❖ Definir el efecto de la inoculación con *A. brasilense* en el flujo de protones y evaluar la colonización de *A. brasilense* en la raíz del mezquite (*P. articulata*), en presencia de amonio o nitrato.

5. HIPÓTESIS

Si *A. brasilense* afecta el metabolismo celular de las plantas, causando alteración en el flujo de protones del apoplasto de la raíz del mezquite (*P. articulata*) entonces una mayor actividad del flujo de protones puede estar influenciada por las características de la cepa de *A. brasilense* y la presencia de amonio o nitrato, promoviendo un mayor desarrollo del sistema radical.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Recolección de la semilla de mezquite

Las semillas se recolectaron en los terrenos del Comitán, La Paz, Baja California Sur, México, en un área localizada en los 24°07'36''N, 110° 25'48''W. Geomorfológicamente es una planicie aluvial formada por la deposición de aluvión granítico derivado de la erosión de las montañas de la Sierra de la Laguna. El clima es cálido con una precipitación media anual de 180 mm, con lluvias principalmente a finales del verano. La temperatura media varía desde 18°C en enero (periodo frío) a 35°C en agosto (periodo cálido) con grandes variaciones durante el día-noche. Las temperaturas mínimas y máximas son: 26°C y 44°C en verano; 12°C y 24°C en invierno. La flora se caracteriza por ser una transición entre el matorral xerófilo y el bosque tropical seco; muestra una relativamente modesta diversidad de plantas, incluyendo 136 especies de angiospermas (Carrillo-García *et al.*, 1999).

Las vainas de mezquite se recolectaron en julio-agosto 2010 y 2011, época donde las plantas presentan casi la totalidad de las vainas maduras. Las vainas se colocaron en bolsas de plástico. Se llevaron al laboratorio para extraer las semillas y seleccionarlas debido a que algunas presentan infección por la larva de un escarabajo de la familia Bruchidae, identificado como *Acanthoscelides obtectus* (Laboratorio de Entomología, CIBNOR, S.C., 2006) un parásito natural muy común en Baja California Sur, conocido comúnmente como gorgojo del frijol.

6.2. Extracción y almacenamiento de las semillas

La extracción de las semillas se realizó con un molino mecánico para carne adaptado con una malla con perforaciones de alrededor de 1 centímetro. Se colocaron las vainas en la tolva del molino y se hizo girar el tornillo sinfín, las semillas que pasaron por la malla después fueron recogidas en una charola y se les retiró la vaina molida. Seleccionando las semillas y eliminando aquellas que presentan la larva del escarabajo; en ocasiones la presencia es fácilmente detectada a simple vista, caso contrario se debe poner atención a un pequeño punto negro en alrededor de un tercio de la longitud de la semilla. La presencia de este punto indica contaminación con la larva. Una vez seleccionadas las semillas se

colocarán en un recipiente de cristal color ámbar con tapa hermética y se refrigerarán a unos 2-6°C. Estas semillas fueron utilizadas posteriormente.

6.3 Estandarización del sistema aeropónico

El sistema aeropónico (representado en la **Figura 1**) consiste de cuatro cajas de acrílico negro con dimensiones 61 x 61 x 60 cm (ancho, largo y alto), con perforaciones en la parte superior por donde se coloca las plántulas en el momento del trasplante. En el interior se encuentra una tubería interna impulsada por un equipo hidroneumático TRUPER modelo: HIDR- 1/2X24; potencia 373W(1/2Hp), corriente 6,5 A, altura máxima 38m, tensión 120V, velocidad 3450r/min, flujo máximo 50L/min, capacidad del tanque 24L; la cual distribuye la solución nutritiva de manera homogénea en forma de una fina neblina proporcionando un microambiente adecuado para el crecimiento de las raíces; los tiempos de riego son controlados por un válvula eléctrica para agua, la cual a su vez está controlada por 2 Timers acoplados. El primero controla los tiempos de encendido y apagado y el segundo controla los ciclos realizados mientras esta encendido.



Figura 1. Sistema aeropónico.

Para alcanzar el objetivo 1 se decidió realizar un plan experimental (**Figura 2**).

1. Determinación de los tiempos de programación del timer de riego del sistema aeropónico.
2. Determinación de la mínima concentración de solución Hoagland requerida para el crecimiento del mezquite.
3. Determinación de los tiempos medición de pH.

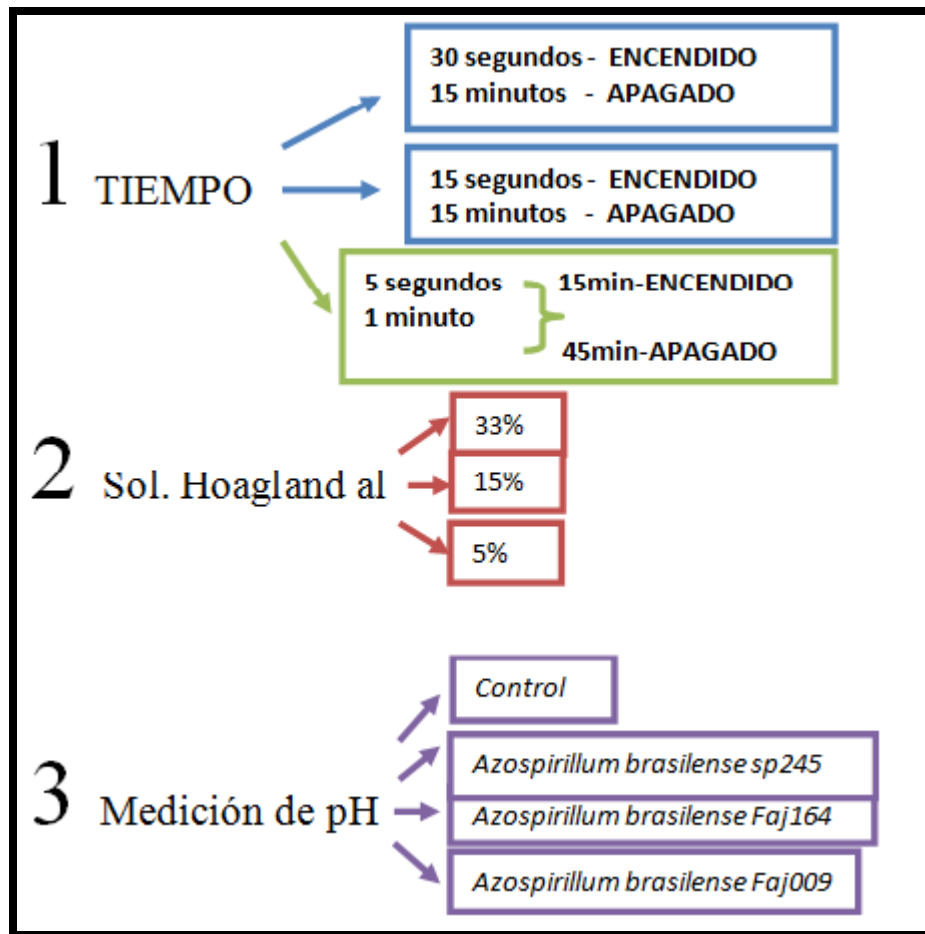


Figura 2. Plan experimental objetivo 1.

6.3.1. Germinación

Para la germinación las semillas de mezquite se higienizaron mediante un lavado de tween 20 al 2% en agitación constante por 5 minutos, posteriormente se decantó el tween 20 y se adicionó la solución de NaClO_3 al 3% manteniéndolas en agitación

constante durante 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se decanto el NaClO_3 al 3% y se procedió a hacer 5 lavados con agua destilada y 1 minuto de agitación por cada lavado. Terminado los 5 lavados, las semillas embebieron en agua por 4 h. Posteriormente se germinaron en charolas de plástico que contenían en su interior papel toalla húmedo, posteriormente se cubrieron con papel aluminio para finalmente colocarse en la cámara de cultivo Conviron a 30°C , permaneciendo en obscuridad alrededor de tres días.

6.3.2. Posgerminación

Después de transcurridos los tres días del proceso de germinación, se colocaron las plántulas en tubos de 50mL con agua destilada y se dejaron a la luz por fotoperiodos de 12-12 luz-obscuridad, con intensidad luminosa de $96 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $27-30^\circ\text{C}$, durante un período de 3 días, tiempo en que aparecen las primeras hojas verdaderas.

6.3.3. Cepas utilizadas

Se utilizaron tres cepas de la α -proteobacteria *Azospirillum brasilense*, la cepa Sp245 esta se caracteriza por favorecer el desarrollo de pelos radicales y se ha encontrado repetidamente en altas densidades en el interior de células de pelos radiculares en plantas de trigo (Assmus *et al.*, 1995), además se ha demostrado su sobrevivencia en distintas regiones geográficas (Bashan *et al.*, 1995b,c); la cepa *A. brasilense* Faj009 que presenta una enzima indol 3-piruvato descarboxilasa negativa lo que reduce la síntesis de AIA en un 90% (Costacurta *et al.*, 1994; Dobbelaere *et al.*, 1999) y la cepa *A. brasilense* Faj164 que presenta una nitrato reductasa periplasmica negativa lo que disminuye su producción de oxido nítrico (Steenhoudt *et al.*, 2001), ambas cepas son mutantes genéticamente modificadas de la cepa *A. brasilense* Sp245.

6.3.4. Preparación del inóculo

Las cepas se mantienen conservadas en nitrógeno líquido. Para reactivarlas, se tomo un tubo eppendorff de cada cepa y sembró por la técnica de estría cruzada en cajas Petri con agar nutritivo o con medio OAB, incubando a 30°C, durante 48 hrs. Posteriormente se seleccionó una colonia aislada y se verificó pureza por morfología colonial y celular (macro y microscópicamente). Se transfirió una asada abundante a matraces Erlenmeyer de 125mL con 50mL de medio de cultivo líquido BTB- 1 (medio mineral con triptona, extracto de levadura y gluconato, Bashan *et al.*, 2011, *ANEXO 2*), y se incubaron a 30°C, 130 rpm durante 24 horas. Después de transcurrido este tiempo se tomaron 5mL del cultivo celular y se transfirieron a un matraz con medio BTB-1 y se incubaron a las mismas condiciones durante 16 horas para tener un cultivo en su fase exponencial de crecimiento. Es importante respetar los tiempos debido a que la bacteria tiene un tiempo de duplicación corto, por lo que una o dos horas de diferencia pueden representar una gran diferencia en la cantidad y fisiología de las células.

6.3.5. Inoculación

Para la inoculación se transfirieron 50mL del inóculo a un tubo de centrifuga y se hicieron dos lavados con 20mL de solución salina al 0.85% centrifugando a 4500g por 10 minutos. Finalmente se resuspendió el botón celular en 10mL de solución salina al 0.85%. Antes de resuspender el botón celular por última vez se adicionaron únicamente 5mL de solución salina al 0.85%, se resuspendió y se midió la densidad celular (óptica) a 540nm. La lectura debe ser cercana a 1 en absorbancia. El valor de 1 de D.O nos indica que la muestra del inóculo tiene aproximadamente 1×10^9 UFC/mL. Se transfirió 1mL de inóculo ajustado, a un tubo de ensaye con 9mL de solución salina para diluirlo a 1×10^8 UFC/mL. La dilución de 1×10^7 UFC/mL se prepara transfiriendo 5mL de la dilución anterior a 45mL de solución salina al 0.85%.

Para la inoculación de las plántulas de mezquite se prepararon 300mL de la suspensión de *Azospirillum brasilense* ajustada a 10^7 UFC por mL, de esta suspensión se vertieron 50mL

en 6 vasos de precipitado de 100mL, y posteriormente se colocaron 20 plántulas en cada vasos y se embebieron las raíces durante 4 horas.

6.3.6 Trasplante al sistema aeropónico

El sistema aeropónico está conformado por 4 cajas de acrílico negro, cada una funcionando como réplicas de bioensayo.

El trasplante de las plantas no inoculadas se realizó después del proceso de la germinación, para el caso de las plántulas inoculadas con *Azospirillum brasilense*, el trasplante se realizó después de la incubación de 4 horas, tomándolas del tallo con cuidado para no lastimar las raíces, colocando espuma de poliuretano alrededor de la plántula, entre la parte inferior del tallo y el cuello de la raíz. Posteriormente se insertó una plántula en cada orificio del sistema aeropónico. Se colocaron 30 plántulas en cada una de las cajas, después de la trasplantación se inicio el monitoreo de pH cada hora durante el tiempo del bioensayo.

6.3.7. Determinación de los programas del tiempo para el riego del sistema aeropónico

Para la determinación de los tiempos de riego adecuados para el crecimiento del mezquite se evaluaron 3 tiempos; el primero fue de 30 segundos encendido y 15 minutos apagados; el segundo fue de 15 segundos encendido y 15 minutos apagados; y en el tercero se acoplaron dos Timer, uno que mantenía un ciclo de 15 minutos encendido y 45 minutos apagado y el otro que controlaba el riego de los 15 minutos encendidos en pequeños ciclos de 5 segundos encendido y 1 minuto apagado. La evaluación para estos ciclos fue de 9:00 a 17:00 hrs durante un día y los criterios fueron humedad de la raíz, apariencia saludable de la plántula, es decir turgencia, coloración de hojas verdaderas y hojas cotiledonares, además de presentar volumen suficiente de muestreo para la medición de pH.

6.3.8. Determinación de la mínima concentración de solución Hoagland requerida para el crecimiento del mezquite

Para evaluar que concentración de solución Hoagland debería ser utilizada en la nutrición de las plántulas de mezquite se propusieron tres concentraciones: 5, 15 y 33% (*ANEXO 2*); estas concentraciones fueron evaluadas en tres bioensayos, con duración de 19 días. En estos experimentos no se utilizaron la misma cantidad de plántulas; en 33% se utilizaron 23 plántulas, en 15% se utilizaron 30 plántulas, en 5% se utilizaron 22 plántulas. Esto debido a la variación de la germinación, ya que *Prosopis* es un árbol silvestre por lo que se requiere considerar el porcentaje de germinación para tener un número considerable de plántulas. En estos experimentos se utilizaron tres criterios de evaluación; apariencia saludable de la plántula es decir turgencia, pigmentación (en hojas verdaderas y cotiledones), y crecimiento (altura de vástago y longitud de raíz) de las plántulas mezquite. Este experimento se realizó con la finalidad de conocer la dinámica de crecimiento de plántulas (relación vástago-raíz) en los tres bioensayos y para poder evaluar correctamente el efecto la inoculación por *Azospirillum brasilense*.

6.3.9. Medición de pH

La medición de pH se realizó después trasplante al sistema aeropónico en el invernadero. Cada hora durante el período de experimentación de cada tratamiento, se tomó una alícuota de 20mL por quintuplicado de solución nutritiva del flujo de retorno de cada caja que conforma el sistema; posteriormente se introdujo el electrodo en cada uno de estos vasos precipitados de los muestreos para medir el pH en los diferentes tiempos determinados. El bioensayo tuvo una duración de 2 días y se evaluaron los diferentes tratamientos, estos fueron plántulas no inoculadas, inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245, *Azospirillum brasilense* Faj164 y *Azospirillum brasilense* Faj009.

6.3.10. Medición de vástago

Al finalizar cada bioensayo se tomó un grupo de 5 plántulas de cada uno de los tratamientos de cada caja y se realizó la medición directa de la parte aérea de las plántulas. Se colocó el vástago sobre un plano de cristal encima de una hoja milimétrica. El vástago previamente humedecido con agua destilada se estiró con fuerza para lograr la medición precisa (Böhm, 1979).

6.3.11. Medición de Raíz

En las 5 plántulas tomadas para medir el vástago se les midió también la raíz. Se colocó la raíz previamente humedecida con agua destilada sobre un plano de cristal encima de una hoja milimétrica y se estiró con fuerza para lograr la medición precisa (Böhm, 1979).

6.4. Determinación del efecto de la inoculación con *A. brasilense* en el flujo de protones y evaluación de la colonización de *A. brasilense* en la raíz del mezquite en presencia de amonio y nitrato

Para definir el efecto de las tres cepas de *A. brasilense* en el flujo de protones, se evaluaron seis parámetros los cuales fueron pH de la solución nutritiva del flujo de retorno del sistema aeropónico, longitud de vástago, longitud de la raíz, superficie de raíz y peso seco de raíz, además la colonización de las diferentes cepas en el sistema radical de las plántulas de mezquite nutridas con dos fuentes de nitrógeno, 0.5Mm (NH₄)SO₄ y 2 mM Ca(NO₃)₂.NO₃ (**Figura 3**).

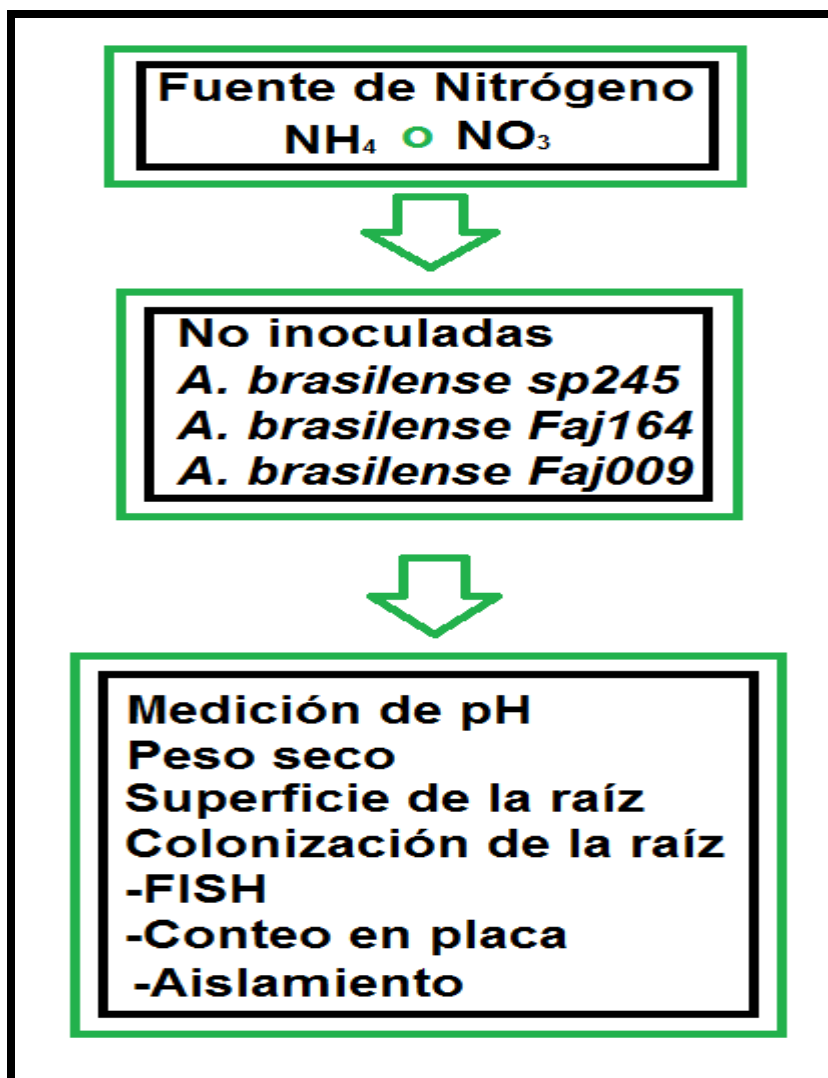


Figura 3. Descripción del objetivo 2.

6.4.1. Estimación de superficie de raíz por el método de analizador de imagen

La medición de superficie de raíz se realizó mediante un equipo fotodocumentador Bio Rad Molecular Imager Gel Doc XR Imaging System, por medio del cual se tomó la imagen de las raíces y posteriormente se midió el contorno de la raíz. Esta medición fue ajustada mediante un coeficiente que se calculó a partir de la calibración del equipo en cm^2 y posteriormente se realizó la conversión a mm^2 (**Figura 4**).

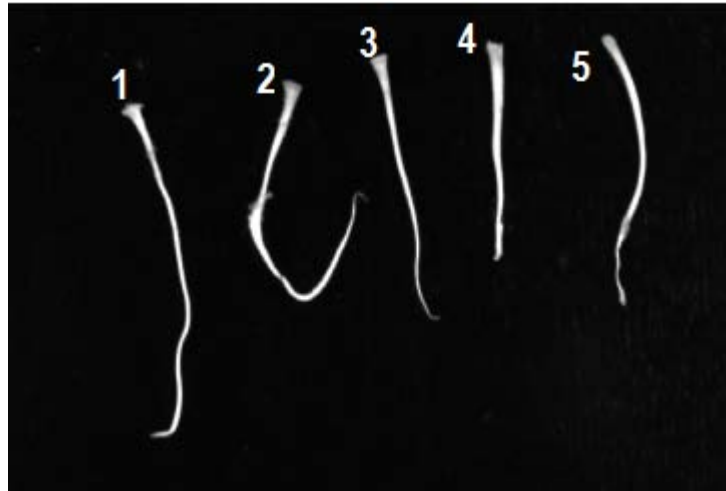


Figura 4. Plántulas no inoculadas, caja 2 alimentadas con amonio como única fuente de nitrógeno en solución nutritiva.

6.4.2. Peso seco

Para determinar el peso seco de la raíz de la plántula, se tomó un grupo de 5 plántulas, se enjuagó cada una con agua destilada y se colocaron en bolsitas individuales de papel estraza, se dejaron secar en una mufla eléctrica a temperatura de 60 a 72 °C por un periodo de 72 horas (Schuurman and Goedewaagen, 1971), transcurrido el tiempo se pesaron las raíces en una balanza analítica.

6.4.3. Evaluación de la colonización de bacterias en la raíz de mezquite mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH)

Al finalizar los bioensayos de cada tratamiento con las dos fuentes de nitrógeno (NH_4^+ , NO_3^-), se tomó un grupo de 5 sistemas de raíces por cada una de las cajas del sistema y se les realizó el procedimiento de la técnica de FISH el cual consistió en los siguientes pasos:

Fijación del cultivo puros: Para tener la referencia de la visualización de cada cepa de *Azospirillum brasilense*, se realizó la fijación de los cultivos puros, por lo que se realiza el proceso del apartado 6.6 hasta tener una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL. Se

transfirieron 5mL de inóculo ajustado, a un tubo eppendorff de 50mL con 45mL de solución salina para diluirlo a 1×10^8 UFC/mL. Se hicieron sucesivos lavados con 1x PBS (Buffer de fosfatos salino) y la pastilla celular se resuspendió en 1mL de PFA (- formaldehído al 4%) frío y se dejó en refrigeración por 3 horas.

Las muestras se lavaron 3 veces con 1x PBS para eliminar el PFA ((ρ -formaldehído al 4%), luego se resuspendieron en una mezcla de etanol y 1xPBS en proporción 1:1. Se preservaron en congelador a -20°C hasta que fueron utilizadas.

Fijación las muestras de raíz: se utilizaron 5 plántulas al azar para ser analizadas por la técnica de FISH. A cada plántula se le cortó el último tercio de la raíz (aproximadamente 3cm) es decir de la zona pilífera a la cofia y se colocaron en un tubo eppendorff de 1.5mL. Se lavaron tres veces con 1mL de PBS. Una vez lavados se resuspendieron en 1 mL de PFA en frío y se dejaron en incubación por 3 horas como mínimo. Cada raíz que se encontraban en incubación se lavó 3 veces con 1X PBS para eliminar el PFA, luego se resuspendieron cada una de las 5 raíces en una mezcla de etanol y 1X PBS en proporción 1:1 y se preservaron en el congelador a -20°C hasta su posterior análisis.

Montaje los cultivos puros: Las tres diferentes cepas de *A. brasilense* se retiraron del congelador y se realizaron dos lavados con 1mL 1xPBS y se centrifugaron 3500 rpm durante 5 minutos; después de los lavados, se disolvieron en 10mL de solución salina al 0.85%, finalmente se tomaron 5 μL y se colocaron en cada lamina por triplicado. Las laminillas se prepararon y limpiaron previamente con solución de KOH etanólico, y cubrieron con una solución de gelatina (0.1% de gelatina p/v y 0.01% de sulfato crómico de potasio p/v), finalmente las laminillas se dejaron secar en una mufla eléctrica a 30°C por 15 min.

Montaje de las muestras de raíz: Las raíces se retiraron del congelador y lavaron tres veces con 1mL 1xPBS. Después de los lavados, se realizaron cortes histológicos en la raíz, seleccionando la cofia y la zona pilífera. Estos fragmentos fueron adheridos a portaobjetos de vidrio con agarosa al 0.25%.

Deshidratación: Después de el montaje de las raíces o el cultivo puro según el caso, se deshidrataron utilizando tres concentraciones de etanol: 50, 80 96%(v/v), dejando las

muestras por tres minutos en cada solución de etanol, consecutivamente. Una vez concluido este proceso, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

Hibridación: Las muestras deshidratadas se hibridaron con 4 sondas de oligonucleótidos; tres de estas sondas se mezclaron de forma equimolar EUB-338 I (Amann *et al.*, 1990), II y III (Daims *et al.*, 1999) las cuales combinadas tienen una especificidad para casi todo el dominio *Bacteria*. Estas sondas de oligonucleótidos tienen adheridas el fluorocromo Cy3 que tiene fluorescencia de color rojo. La otra sonda utilizada fue la Abras 1420 (Stoffels *et al.*, 2001) con especificidad para *Azospirillum brasilense*, la cual tiene adherido un fluorocromo FITC que tiene fluorescencia de color verde. Se añadieron 4µL de la mezcla equimolar, y 4µL de Abras 1420 para posteriormente combinarse con 40µL de buffer de hibridación (**Tabla 1**) y finalmente se agregó a la muestra, y estas se colocaron dentro de tubos de 50mL que contenían papel secante humedecido con buffer de hibridación, los tubos se introdujeron en la cámara de hibridación VWR (Modelo 5430) por un periodo de 2-3 horas a una temperatura constante de 46°C y en condiciones mínimas de intensidad luminosa.

Tabla 1. Composición de buffer de lavado y buffer de hibridación.

% Formamida	35%		45%	
	Buffer de hibridación	Buffer de lavado	Buffer de hibridación	Buffer de lavado
5M NaCl	360 µL	700 µL	360 µL	300 µL
1M Tris/HCl pH 8.0	40 µL	1000 µL	40 µL	1000 µL
Formamida	700 µL	-----	900 µL	-----
0.5 M EDTA pH 8.0	-----	500 µL	-----	500 µL
10% SDS	2 µL	50 µL	2 µL	50 µL
ddH₂O	900 µL	Completar a 50 ml	700 µL	Completar a 50 ml

Lavado de la hibridación: Al terminar el tiempo en la cámara de hibridación, las laminillas fueron sumergidas en el buffer de lavado (**Tabla 1**) durante 10 minutos, el cual se calentó previamente en baño maría a 48°C. Posteriormente, se detuvo la hibridación agregando a las laminillas agua desionizada a una temperatura de 4°C; después las laminillas se secaron

y se guardaron en una caja hermética para almacenarse hasta su posterior análisis. Previo a su observación en el microscopio, se adicionó una gota de protector de fluorescencia Citrifluor AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA), para la observación en microscopio óptico de epifluorescencia.

6.4.4. Detección de *Azospirillum brasilense* en raíz por Microscopía óptica fluorescente

La detección de *A. brasilense* en las muestras de raíz se llevó a cabo empleando un microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41), realizando la observación con un lente de inmersión en aceite con una magnificación de 100x. La fluorescencia fue detectada por un canal o filtro de los tres que componen el microscopio: el filtro **Cy3** con un rango máximo de excitación de luz de 552nm y un rango máximo de emisión de luz de 565nm que presenta la fluorescencia detectada en color rojo y el filtro **FITC** con un rango máximo de excitación de luz de 395-475nm y un rango máximo de emisión de luz de 510nm el cual presenta la fluorescencia detectada en color verde. La captura de la imagen se realizó con una cámara digital (Evolution VF) integrada al microscopio, y las micrografías se procesaron con el apoyo de un analizador de imágenes (Image Pro Plus 6.3.1.542). El procesamiento de las imágenes consistió en la sobreposición de las imágenes tomadas con el filtro **Cy3 (rojo)** y **FITC (verde)**. Debido a la especificidad de las sondas utilizadas para FISH, la fluorescencia detectada con el filtro **Cy3** corresponde a todas las bacterias presentes en la muestras, mientras que la fluorescencia detectada con el filtro **FITC** corresponde solo el género *Azospirillum* y especie *brasilense*. Partiendo de esta premisa entonces la sobreposición de las dos imágenes nos darán como resultado la identificación de *Azospirillum brasilense* en color amarillo mientras que el resto de las bacterias en color rojo (**Figura 4**).

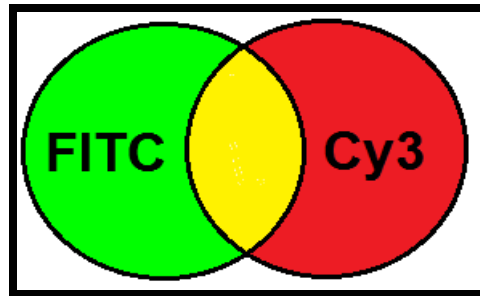


Figura 5. Representación gráfica del fundamento para la identificación de *A. brasilense* por FISH. La sobreposición de las imágenes de los filtros FITC y Cy3, muestran el color amarillo que indica la identificación de *A. brasilense*.

6.4.5. Conteo de microorganismos

Se realizaron conteos de microorganismos en la raíz del mezquite, al finalizar los bioensayos de cada una de las tres cepas de *Azospirillum brasilense* evaluadas y nutridas con dos fuentes de nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-). El tipo de conteo seleccionado fue el de conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en caja petri. Para esta determinación se utilizaron un grupo de 9 raíces por cada tratamiento de las tres cepas de *Azospirillum brasilense*, a este grupo de raíces se les realizó un corte de el último tercio de la raíz (aproximadamente 3cm) es decir de la zona pilífera a la cofia y se colocaron en un tubo eppendorff de 1.5mL, para posteriormente adicionarles un 1mL de solución salina 0.85%. Se agitó vigorosamente durante 20 segundos para desprender las bacterias de la raíz de esta suspensión y se hicieron diluciones desde 10^{-1} a 10^{-5} , para las raíces inoculadas con las tres cepas de *Azospirillum brasilense* y nutridas con NH_4^+ como única fuente de nitrógeno, se seleccionaron las diluciones 10^{-3} a 10^{-5} . Para las raíces inoculadas con las tres cepas de *Azospirillum brasilense* y nutridas con NO_3^- como única fuente de nitrógeno, se seleccionaron la suspensión sin dilución y la dilución 10^{-3} . Posteriormente se tomó una alícuota de 100 μL de cada suspensión para verterse sobre una placa de caja petri con medio de cultivo solido selectivo OAB con rojo Congo para el género *Azospirillum* (Bashan y Levany, 1985). Esto se realizó por triplicado, incubándose finalmente las cajas petri a 30°C durante 14 días.

6.4.6 Aislamientos, descripción e identificación de colonias

De las cajas petri con medio selectivo utilizadas para el conteo microbiano se realizaron aislamientos de las colonias que presentaran diferentes morfologías y se describió su forma, color, elevación y margen.

6.4.7. Análisis estadísticos

Para evaluar los resultados obtenidas de cada parámetro se realizaron análisis de varianza de una vía ANDEVA con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba *a posteriori* de Fisher de DMS, con el fin de detectar las diferencias entre los efectos de las tres cepas de *Azospirillum brasilense* con respecto al control. Además se realizó una prueba de *T de Student* con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ para ver si existían diferencias significativas entre las dos fuentes de nitrógeno (NH_4^+ y NO_3^-). Para ello se utilizó el software ESTATISTICA 7.0 de Windows, mientras que para la realización de las gráficas se utilizó el programa SIGMA PLOT 10.0. En los gráficos se representa el promedio de los tratamientos y el error estándar.

7. RESULTADOS

7.1 Estandarización del sistema aeropónico

Los resultados obtenidos con respecto a la estandarización del sistema aeropónico se evaluaron en función del crecimiento de las plántulas de mezquite y se consideró: a) tiempos de riego de las plántulas; b) concentración mínima requerida para la evaluación del crecimiento del mezquite; y c) estandarización del muestreo de pH, estos se muestran a continuación.

7.1.1 Determinación de los tiempos de programación del Timer de riego del sistema aeropónico

Los resultados obtenidos en los tres experimentos mostraron que las raíces se mantuvieron húmedas durante todo el día; además se observó apariencia saludable en las plántulas; sin embargo en el experimento 3, donde las condiciones de riego fueron controladas por dos Timers, uno que mantenía un ciclo de 15 minutos encendido y 45 minutos apagado y el otro que controlaba el riego de los 15 minutos encendidos en pequeños ciclos de 5 segundos encendido y 1 minuto apagado, se encontró que el volumen de muestreo fue mayor a 20mL lo que nos facilita hacer mediciones hasta por quintuplicado cada hora (**Tabla 2**).

Tabla 2. Evaluación de tiempos de riego del sistema aeropónico.

Criterio de evaluación			
Experimentos	1	2	3
Humedad de la raíz	SI	SI	SI
Suficiente Volúmen*	20mL	10mL	20mL +
Apariencia saludable de la plántula	SI	SI	SI

*Volúmen evaluado cada hora.

7.1.2 Determinación de la mínima concentración de solución Hoagland requerida para el crecimiento del mezquite

Al determinar la mínima concentración requerida para el crecimiento del mezquite se evaluó la longitud de la raíz y la longitud del vástago (**Tabla 3**).

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en la longitud de las raíces y los vástagos de los tres tratamientos (**Tabla 3** y **Figura 6**). El tratamiento con solución Hoagland al 5% presenta un rango más amplio en crecimiento de las plántulas y una relación vástago- raíz de 0.9, es decir que tanto vástago como raíz presentan un valor cercano a la unidad y es adecuado para evaluar la respuesta en la inoculación con las cepas de *Azospirillum brasilense*, es decir, de esta manera podemos determinar con claridad en que parte de la planta es más notorio el efecto si en la parte aérea o en la parte de la raíz.

Tabla 3. Diferencias en la longitud de vástago y raíz a diferentes concentraciones de sol. Hoagland.

Experimentos			
Sol. Hoagland	33%	15%	5%
Vástago	10-13cm	5-14cm	8-15.5cm
Raíz	13-30cm	3-14cm	4-24.5cm
Vástago/Raíz	0.6	1.2	0.9

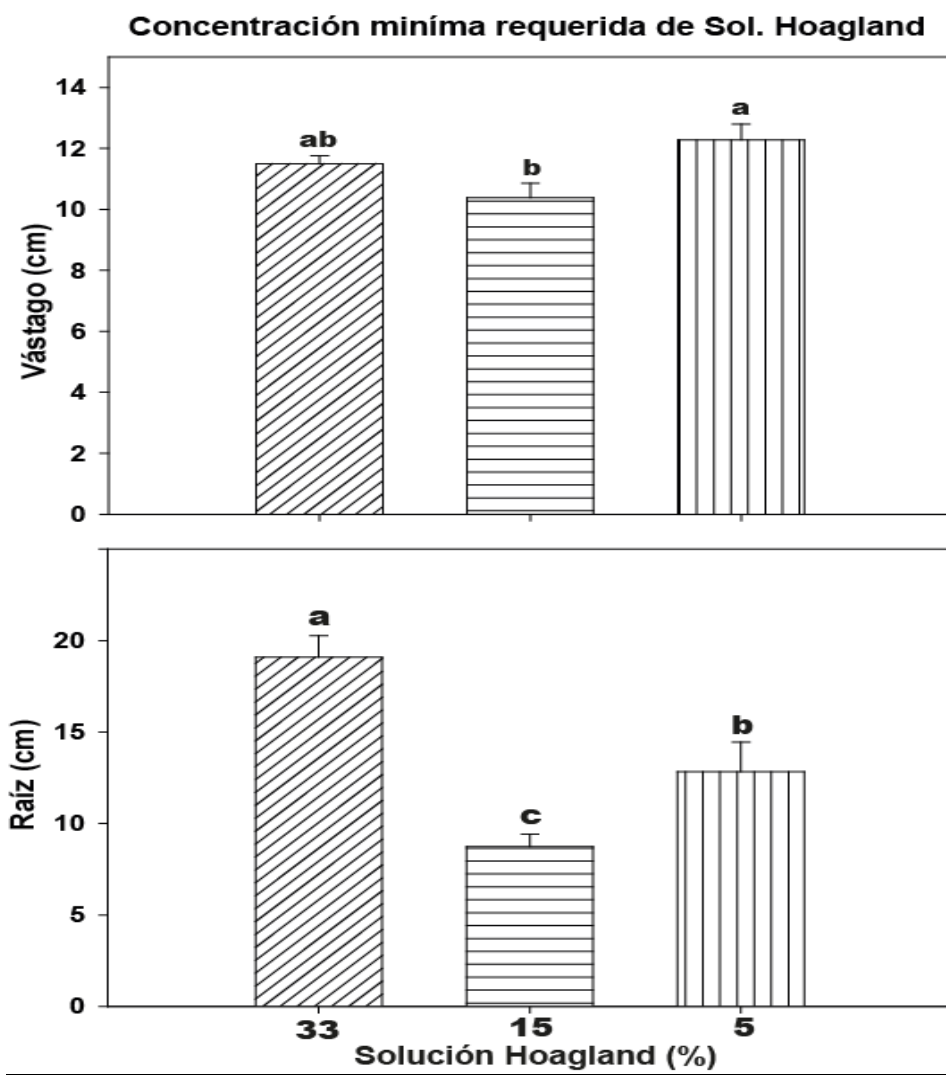


Figura 6. Crecimiento de las plántulas en las tres concentraciones de solución Hoagland. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANDEVA de una vía seguida de un análisis *a posteriori* de DMS de Fisher a $p \leq 0.05$.

7.1.3 Medición de pH

Al analizar los resultados obtenidos en las mediciones de pH realizadas al flujo de retorno que irriga las raíces de las plántulas no inoculadas (control) se observó un pH promedio de 7.9; seguido por el tratamiento de las plántulas inoculadas con *Azospirillum brasilense* Sp245 en donde se observó un pH de 7.7 ligeramente menor al reportado por las plántulas control; contrario a este resultado las plántulas tratadas con *Azospirillum*

brasiliense Faj164 presentaron un pH de 5.7 y con el pH menor se observó a las plántulas tratadas con *Azospirillum brasiliense* Faj009 con 5.3 (*Figura7*).

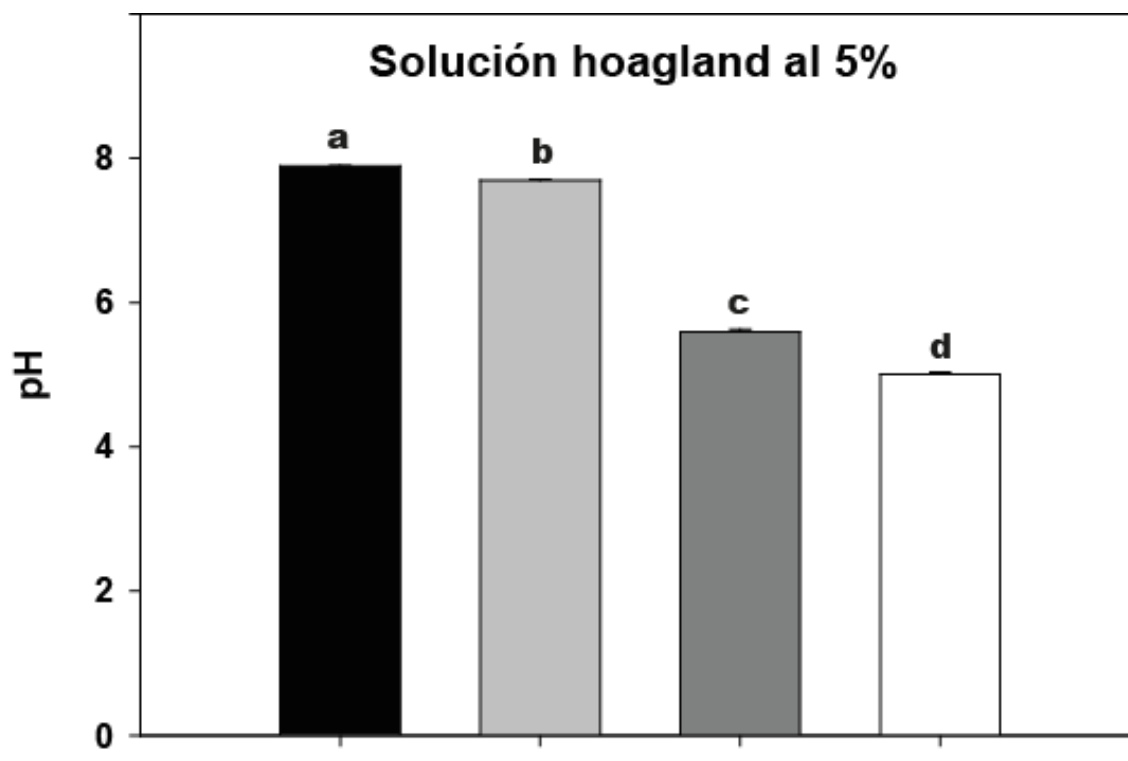


Figura 7. Mediciones de pH del control y los tres tratamientos ■ No inoculadas; □ *A. brasiliense* Sp245; ■ *A. brasiliense* Faj164; □ *A. brasiliense* Faj009. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos, según pruebas ANDEVA de una vía seguida de un análisis a posteriori de DMS de Fisher a $p \leq 0.05$

Cabe mencionar que las dos últimas cepas están modificadas genéticas en cuanto a la producción de óxido nítrico (Faj164) y a la producción de AIA (Faj009), ambas a partir de la cepa silvestre *Azospirillum brasiliense* Sp245 y que las plántulas son nutridas con dos fuentes de nitrógeno, ion amonio que es un activador del flujo de protones y el ion nitrato que es un inhibidor del flujo de protones (Molina- Favero *et al.*, 2008; Bashan y Levanony, 1989).

Estos datos también se analizaron con el fin de saber si las cuatro cajas que conforman el sistema aeropónico pueden ser utilizadas como replicas de los experimentos, siendo

analizado de acuerdo a un análisis de varianza (ANDEVA) por una vía a $P < 0.005$, y no se encontró diferencias significativas entre las cajas, esto nos indica que las cajas pueden ser consideradas replicas de experimento (**Figura 8**).

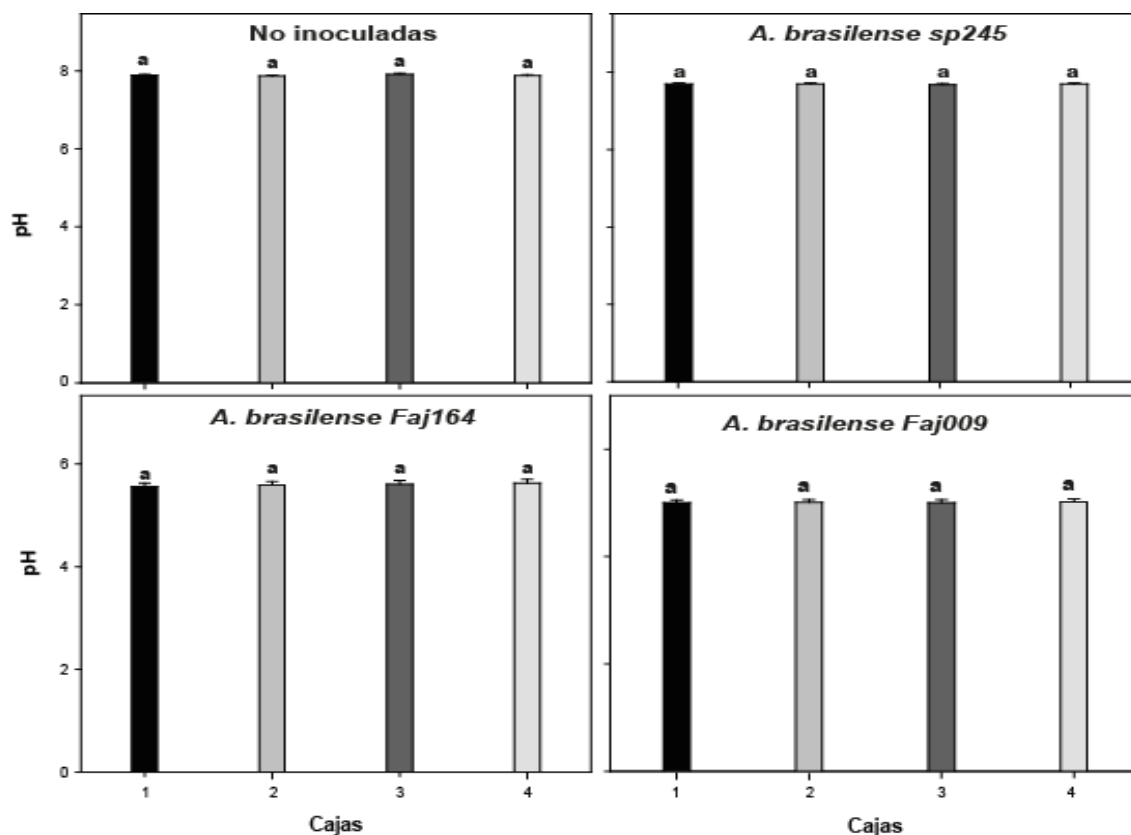


Figura 8. Medición de pH de los tratamientos con sus respectivas replicas. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Estos datos de pH también se analizaron con respecto a las horas de medición, observando que hay diferencias significativas; entre las mediciones realizadas al flujo de retorno que irriga las plántulas no inoculadas (control) y las tratadas con las tres cepas de *Azospirillum brasilense*; en el control estas diferencias se deben principalmente a la fenología (eventos periódicos naturales involucrados en la vida de las plantas) de *Prosopis articulata* y en el caso de las plántulas inoculadas con *Azospirillum brasilense* podemos decir que se deben a la fenología y al efecto que cada una de las cepas evaluadas causa en las plántulas de mezquite (*Prosopis*).

Por otra parte, se observa que el efecto es más notorio dentro de las primeras 20 horas del monitoreo (**Figura 9**) esto es consistente con lo observado por Bashan *et al*, 1989 en plántulas de trigo.

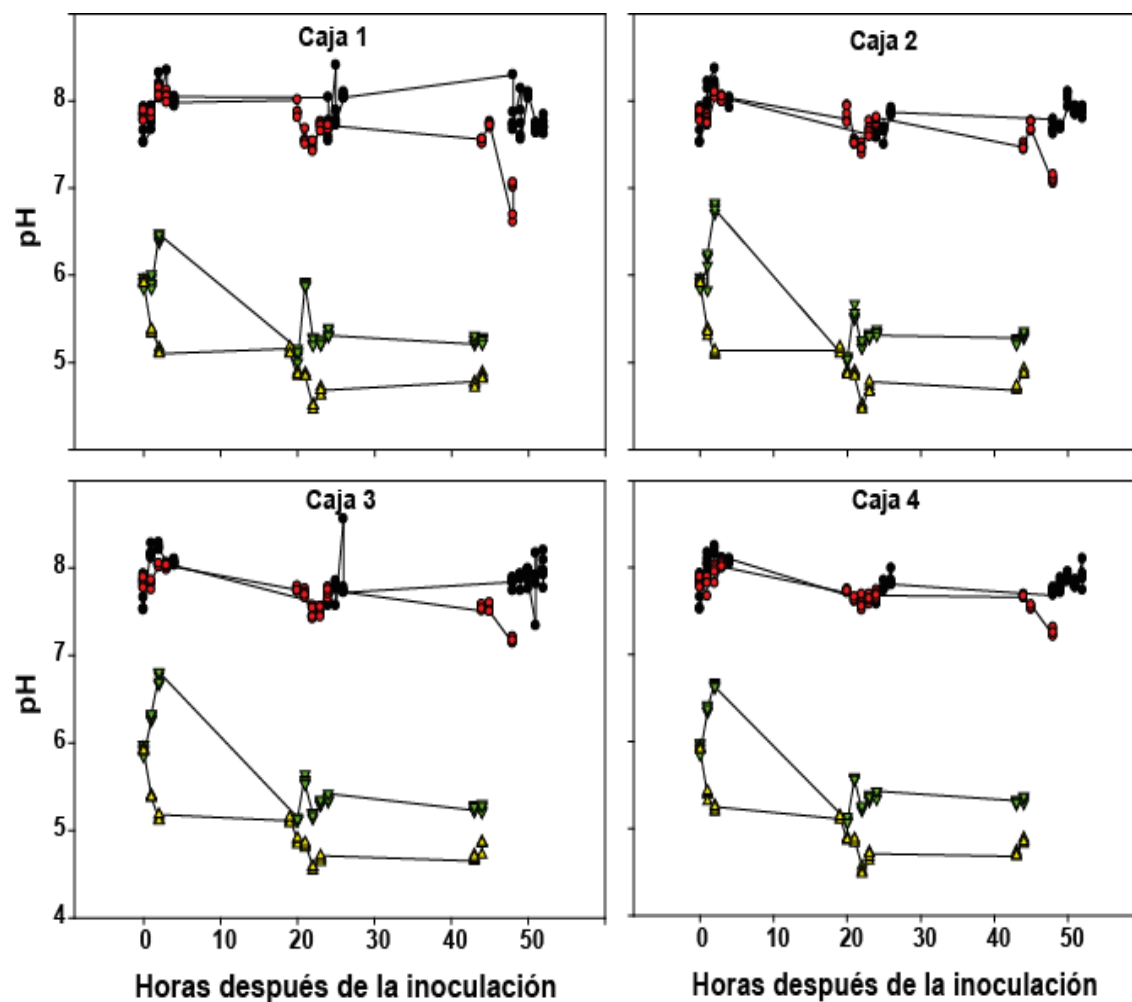


Figura 9. Medición de pH de los tratamientos con sus respectivas replicas. El control y los tratamientos están representados con colores diferentes a) —●— plántulas no inoculadas, b) —●— plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245, c) —▼— plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj164, d) —▲— plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj009.

7.2 Determinación del efecto de la inoculación con *A. brasilense* en el flujo de protones y evaluación de la colonización de *A. brasilense* en la raíz del mezquite en presencia de amonio o nitrato

El efecto que presentan las tres cepas de *A. brasilense* inoculadas a las plántulas de mezquite cultivadas en un sistema aeropónico con dos fuentes de nitrogenadas (NH_4^+ o NO_3^-), se evaluó en función del crecimiento de las plántulas de mezquite y se consideró; a) la medición de pH del flujo de retorno que rocía las raíces de las plántulas de mezquite control y las tratadas con *A. brasilense*, b) estimación de la superficie de la raíz, c) peso seco de la raíz y d) colonización de las cepas de *A. brasilense* en la raíz, continuación se muestran siguiendo este mismo orden.

7.2.1.1 Medición de pH

Al comparar los datos obtenidos en el monitoreo de pH del flujo de retorno que rocía las raíces de las plántulas de mezquite, se determinaron si existían diferencias entre las plántulas no inoculadas (control) y las plántulas inoculadas con las cepas de *A. brasilense*, encontrándose diferencias significativas, siendo más notorias en las plántulas inoculadas con las cepas mutantes Faj164 y Faj009, porque muestran comportamiento opuesto dependiendo la nutrición nitrogenada.

Cuando las plántulas tienen disponible amonio como única fuente de nitrógeno la cepa Faj009 presenta el menor pH, sin embargo cuando las plántulas tienen disponible nitrato como única fuente de nitrógeno la cepa Faj164 presenta el menor pH (**Figura 10**).

Estos resultados sugieren que la nutrición de la planta influye en el efecto de las cepas sobre las plántulas de mezquite. Por otra parte estos resultados sugieren que existen compatibilidad entre *Azospirillum brasilense* y las plántulas de mezquite. Esto es consistente a lo reportado por otros autores que surgieron especificidad de las cepas *Azospirillum brasilense* por las plantas con metabolismo C_3 como el mezquite (Baldani y Döbereiner, 1980; Baldani *et al.*, 1986)

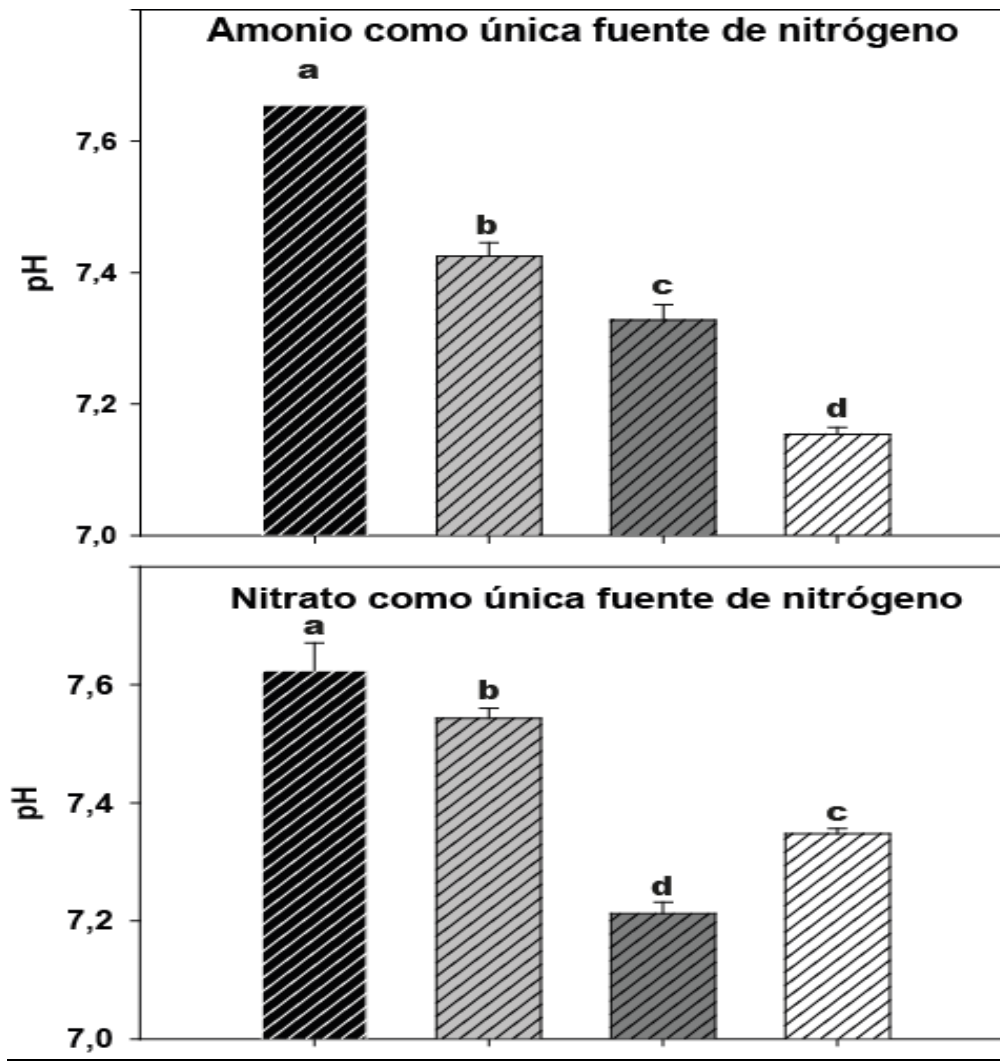


Figura 10. Medición de pH de la solución nutritiva con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato. El control y los tratamientos están representados con colores diferentes. a) plántulas no inoculadas; b) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245; c) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj164; d) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj009. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

7.2.1.2 Determinación de superficie de raíz

Los resultados obtenidos en superficie de raíz de las plántulas no inoculadas y plántulas inoculadas de cada tratamiento, nutridas con amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno, mostraron que en los cuatro experimentos con fuente de amonio como única fuente de nitrógeno existen diferencias significativas entre los tratamientos y el control,

principalmente en el tratamiento con *A. brasilense* Faj009, el cual presentó mayor rango en superficie de raíz (**Figura 11**), seguido de la cepa *A. brasilense* Sp245, y la cepa *A. brasilense* Faj164. En último lugar encontramos las plántulas no inoculadas que presentaron menor superficie de raíz.

Por otra parte, observamos que las plántulas que tienen disponible nitrato como única fuente de nitrógeno, no presentaron diferencias significativas con respecto al control (plántulas no inoculadas), es decir que la inoculación con *A. brasilense* no presentó efectos en superficie de raíz (**Figura 11**).

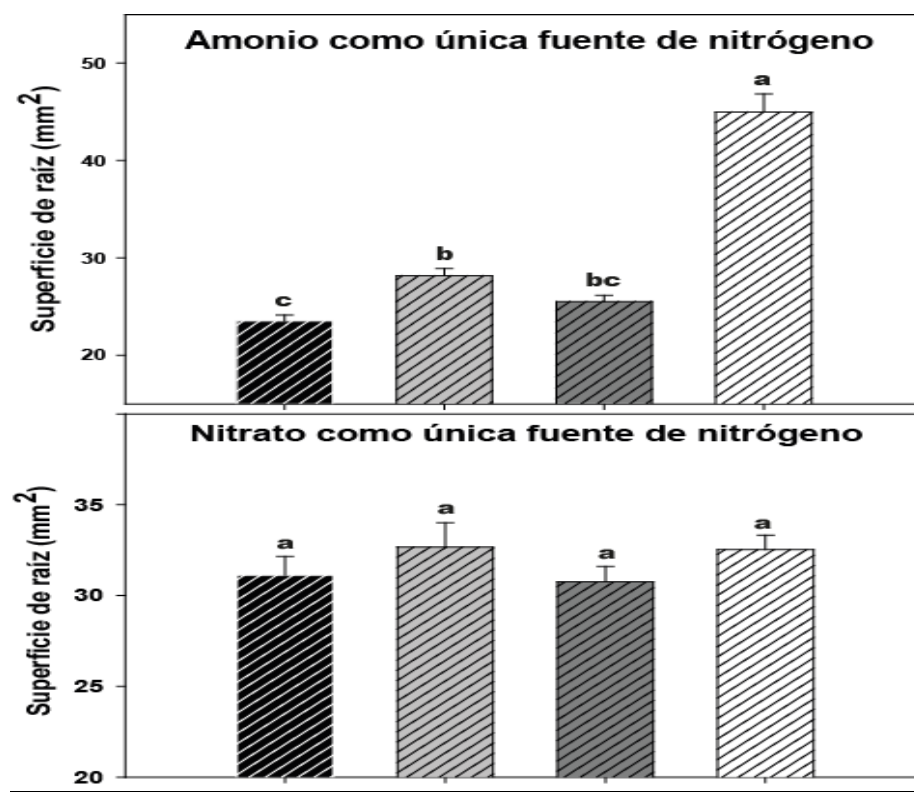


Figura 11. Estimación de superficie de raíz de las plántulas que tiene disponible una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato. El control y los tratamientos están representados con colores diferentes. a) plántulas no inoculadas; b) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245; c) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj164; d) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj009. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

7.2.1.3 Determinación de peso seco de la raíz

Al analizar los datos obtenidos en las plántulas no inoculadas y plántulas de cada tratamiento, nutridas con amonio o nitrato como única fuente de nitrógeno, se observó que las plántulas nutridas con amonio e inoculadas con *A. brasilense* Faj164 presentaron diferencias significativas respecto al control (**Figura 12**).

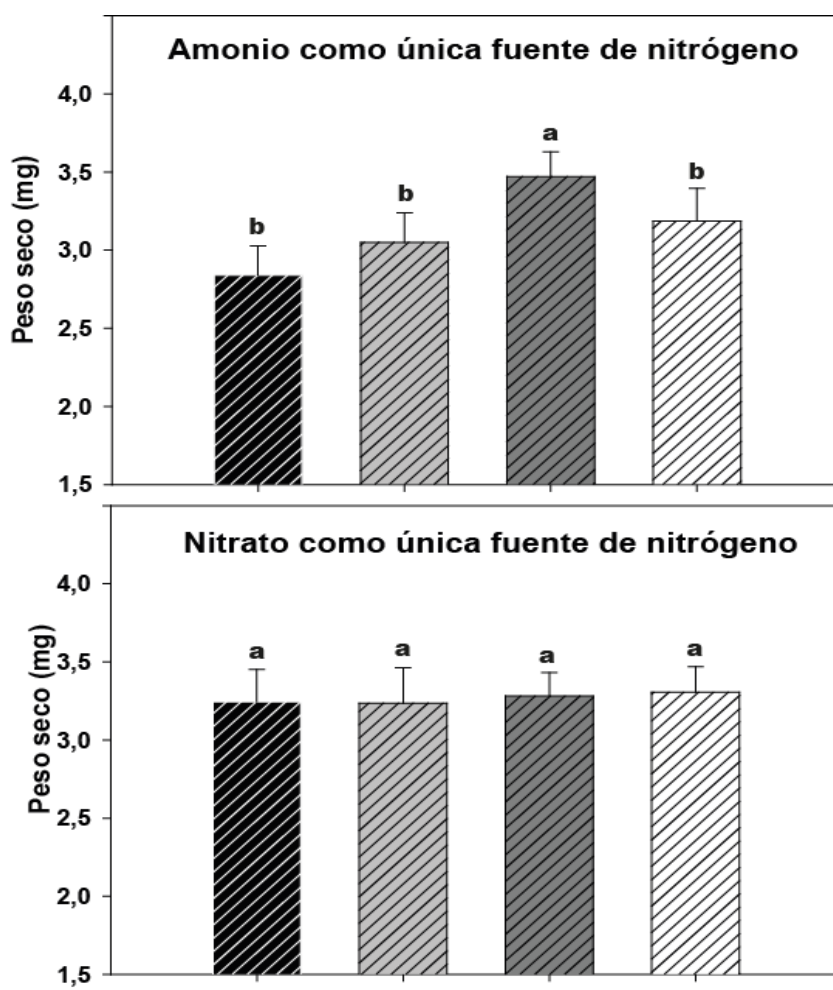


Figura 12. Peso seco de raíz de las plántulas nutridas con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato. El control y los tratamientos están representados con colores diferentes. a) plántulas no inoculadas; b) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245; c) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj164; d) plántulas inoculadas con *A. brasilense* Faj009. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

Sin embargo, las plántulas nutridas con nitrato no presentaron diferencias significativas con respecto a las plántulas no inoculadas, mostrando que la inoculación con *A. brasilense* no tiene efecto en las plántulas nutridas con esta fuente de nitrógeno.

7.2.1.4 Evaluación de la colonización de *A. brasilense* en la raíz de mezquite

Para la evaluación de la colonización de *A. brasilense* se estandarizó la técnica de FISH con cultivos axénicos de las tres cepas con el propósito de obtener un patrón de referencia de las bacterias y poder ubicarlas con facilidad sobre la raíz (**Figura 13**).

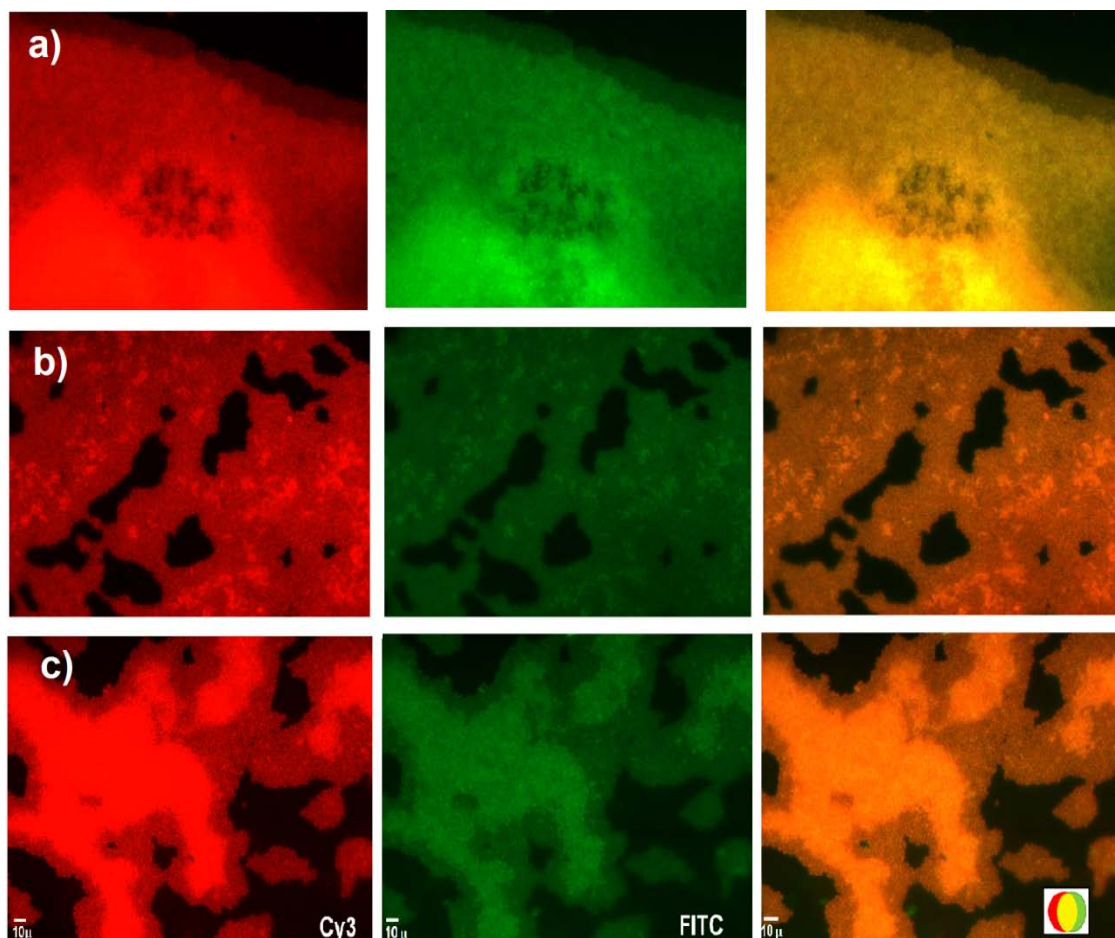


Figura 13. Micrografías de las tres cepas están ordenadas por filas; a) *A. brasilense* Sp245, b) *A. brasilense* Faj164 y c) *A. brasilense* Faj009 obtenidas con el filtro rojo Cy3 que determina al dominio bacteria, el filtro verde FITC que es específico para visualizar *A. brasilense* y la sobreposición de las imágenes de ambos filtro en color amarillo, que indica que el microorganismo es una bacteria que pertenece al género y especie *A. brasilense*.

Después de estandarizar la técnica se evaluó la colonización de las cepas en las raíces de mezquite nutridas con amonio, encontrando las tres cepas de *A. brasilense* al finalizar los bioensayos (**Figura 14**)

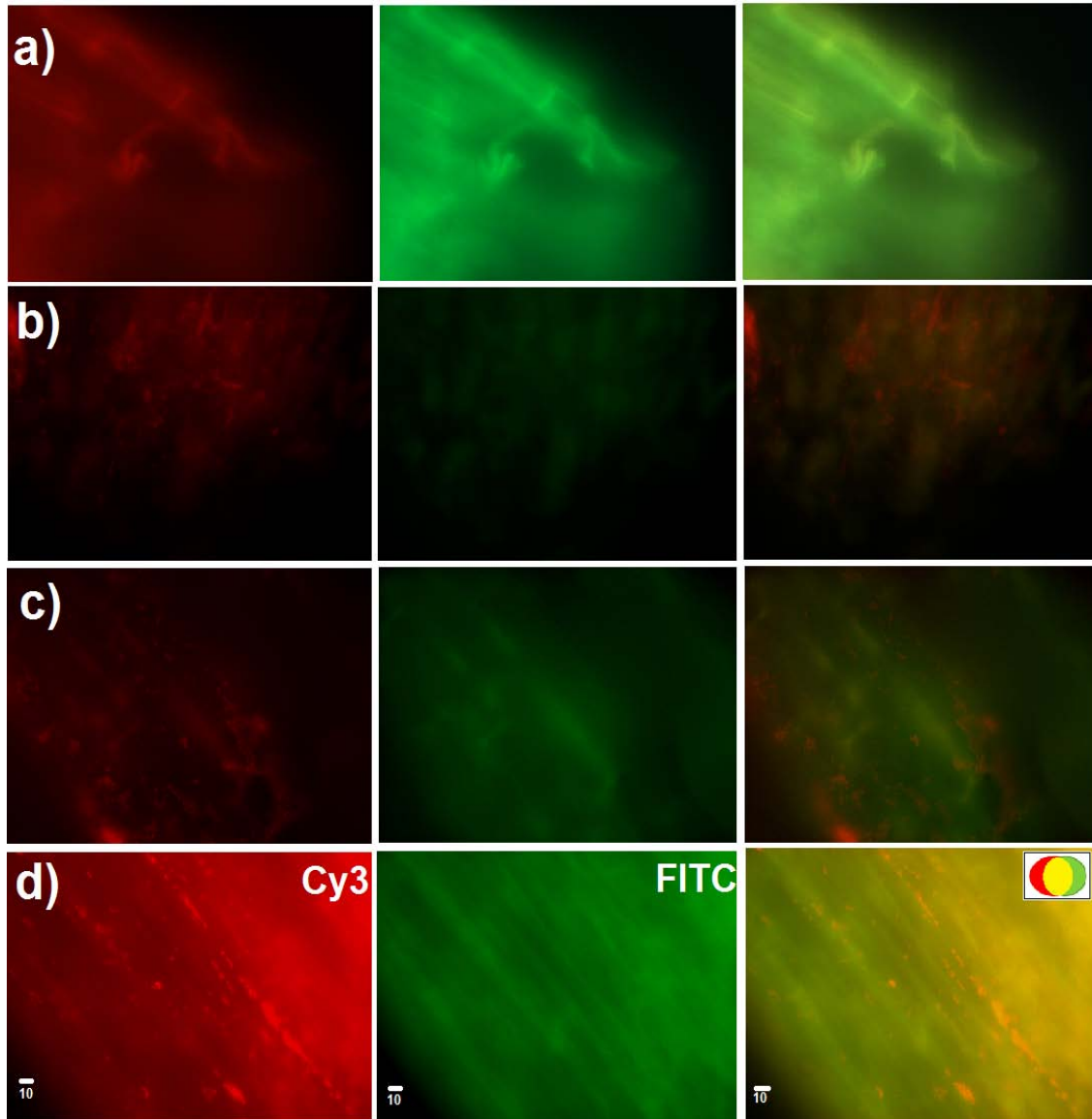


Figura 14. Micrografías de las raíces nutridas con amonio están ordenadas en filas a) Raíces no inoculadas b) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Sp245, c) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Faj164 y d) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Faj009, obtenidas con el filtro rojo Cy3 que determina al dominio bacteria, el filtro verde FITC que es específico para visualizar *A. brasilense* y la sobreposición de las imágenes de ambos filtro en color amarillo, que indica que el microorganismo es una bacteria que pertenece al género y especie *A. brasilense*.

Por otra parte, se evaluó la colonización de las tres cepas de *A. brasilense* en las raíces de las plántulas nutridas con nitrato y no encontramos presencia de las cepas sobre la superficie de la raíz en ninguno de los dos filtros, al finalizar los bioensayos. (**Figura 15**).

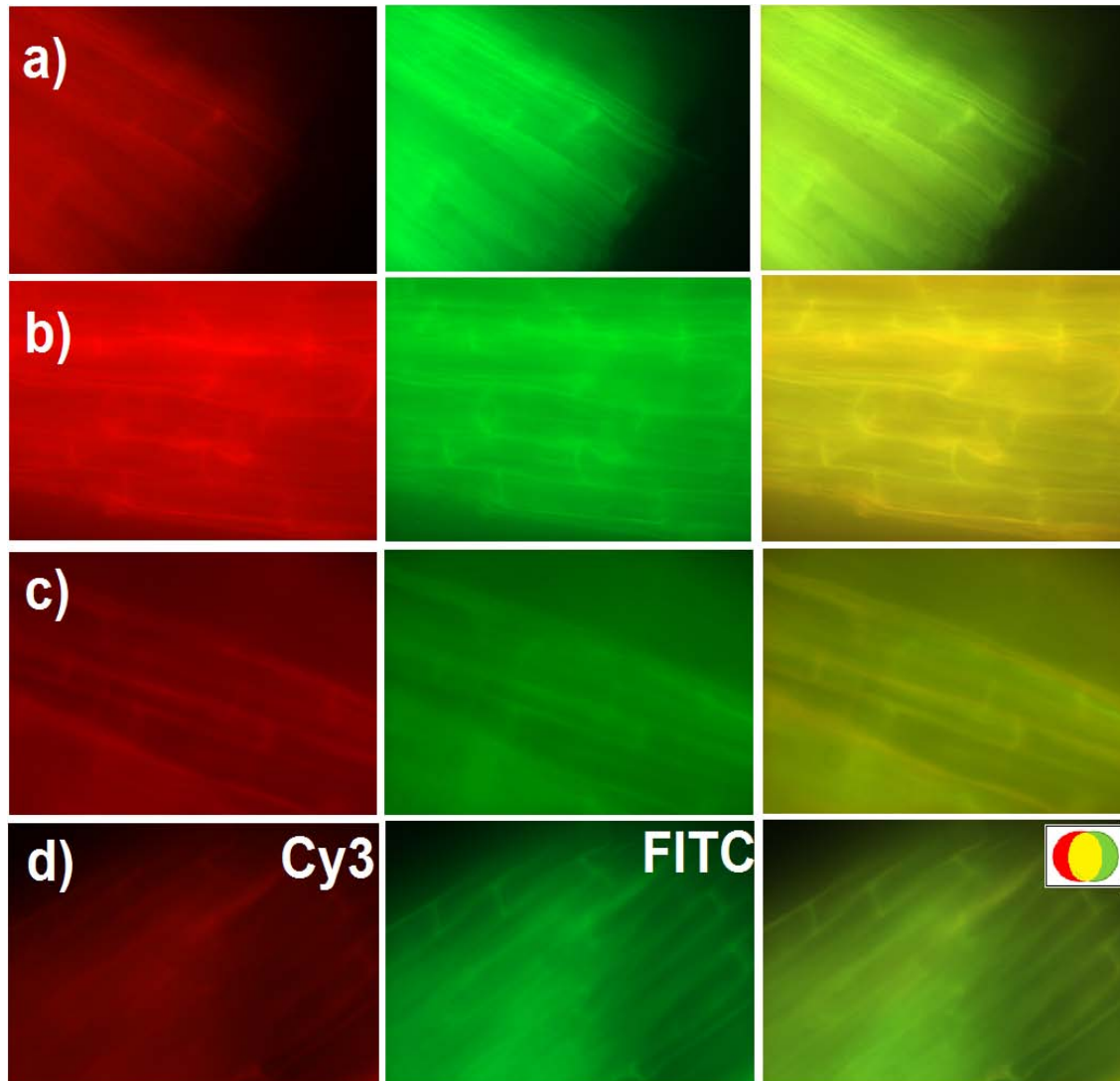


Figura 15. Micrografías de las raíces nutridas con nitrato ordenadas en filas; a) Raíces no inoculadas b) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Sp245, c) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Faj164 y d) Raíces inoculadas con *A. brasilense* Faj009 obtenidas con el filtro rojo Cy3 que determina al dominio bacteria, el filtro verde FITC que es específico para visualizar *A. brasilense* y la sobreposición de las imágenes de ambos filtro en color amarillo, que indica que el microorganismo es una bacteria que pertenece al género y especie *A. brasilense*.

La presencia de las tres cepas de *A. brasilense* no se visualizan claramente en el filtro FITC específico para *A. brasilense*, debido a que la concentración de la sonda se encontraba disponible solo a 30nmoles y la concentración óptima es de 50nmoles, y la autofluorescencia de la raíz impide la visualización de esta sonda, además de que las raíces de mezquite presentan estructura robusta es decir presentan demasiada lignina, por lo que se sugiere que para mejorar la visualización de la sonda específica para *A. brasilense* se requiere realizar cortes histológicos.

7.2.1.2 Conteo de las cepas de *A. brasilense*

La inoculación de las plántulas de mezquite con cada una de las cepas de *A. brasilense* fue con 1×10^7 UFC/mL equivalente a 7 Log (UFC/mL). Al finalizar el bioensayo, se realizó el conteo de bacterias presentes en la raíz como se describe en el punto 6.4.5, obteniéndose diferencias significativas entre los tratamientos en ambas fuentes de nitrógeno.

En las plántulas nutridas con amonio la cepa *A. brasilense* Faj164 presentó aproximadamente 6.5 Log (UFC/mL). Este número es muy cercano al inicial, mientras que las cepas *A. brasilense* Sp245 y Faj009 presentaron un valor de 5.7 Log (UFC/mL) aproximadamente. Por otra parte, en las plántulas nutridas con nitrato la cepa *A. brasilense* Sp245 presentó aproximadamente 5.3 Log (UFC/mL) siendo el mayor número de bacterias con respecto a los otros tratamientos. La cepa *A. brasilense* Faj164 presentó aproximadamente 4.8 Log (UFC/mL) y la cepa *A. brasilense* Faj009 presentó aproximadamente 4.2 Log (UFC/mL) el menor número de bacterias de los tratamientos (**Figura 16**).

Estos resultados mostraron que las plántulas nutridas con nitrato (inoculadas con la cepa *A. brasilense* Sp245) disminuyó la colonización en un 22%; la cepa *A. brasilense* Faj164 disminuyó en un 28% y la cepa *A. brasilense* Faj009 disminuyó en un 36%. Estos resultados se calcularon estimando que *Azospirillum brasilense* es capaz de colonizar la raíz en un 90% cuando embebimos la raíz durante 4 hrs a una concentración de 1×10^7 UFC/mL.

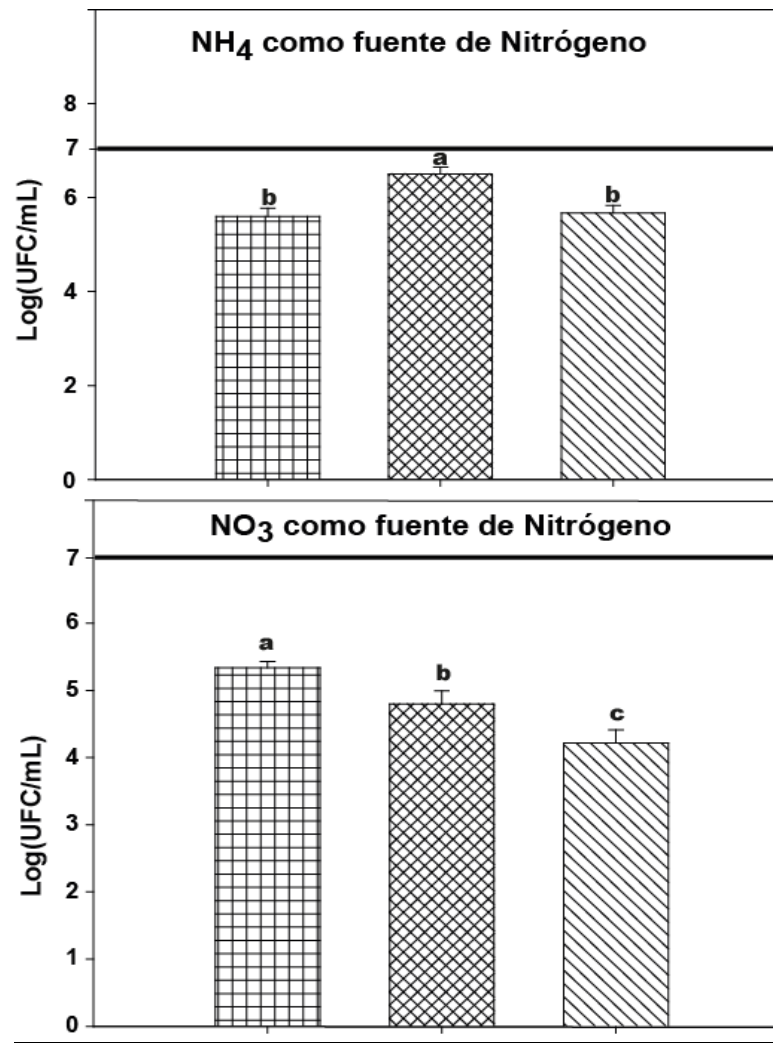


Figura 16. Conteo de *A. brasilense* de las plántulas nutridas con una sola fuente de nitrógeno, amonio o nitrato, respectivamente. Los tratamientos están representados con diseños diferentes para las plántulas inoculadas con *A. brasilense* Sp245; inoculadas con *A. brasilense* Faj164; inoculadas con *A. brasilense* Faj009, y la línea — dentro las gráficas indica la cantidad de la inoculación de las cepas al inicio del experimento. Las barras representan las medias de las muestras y los bigotes el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

7.2.1.3 Aislamientos, descripción e identificación de colonias de *A. brasilense*

Se obtuvieron 8 morfotipos coloniales de los cuales solo 7 se pudieron aislar y resembrar en medio solido, OAB medio selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno como el género *A. brasilense* y posteriormente fueron resembradas en agar nutritivo medio solido para descartar alguna posible contaminación (**Figura 17**).

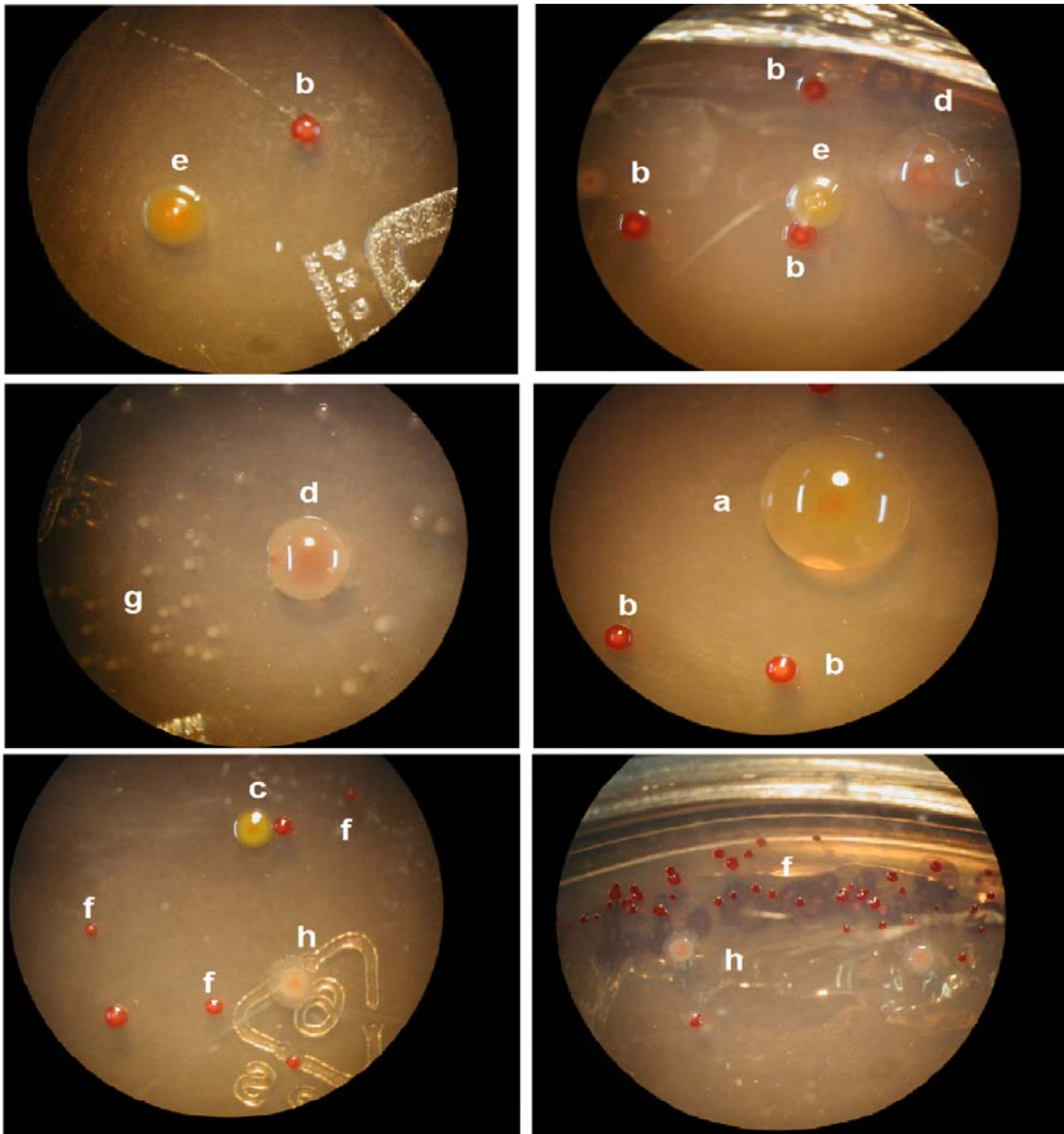


Figura 17. Morfotipos coloniales encontrados en las plántulas de mezquites inoculadas con las cepas de *A. brasilense*, aisladas y sembradas en medio solido OAB. La descripción de las colonias se encuentra en la **Tabla 4**.

Los 8 morfotipos se encontraron en las raíces inoculadas con las tres cepas de *A. brasilense*, al finalizar el bioensayo con duración de tres días en las plántulas nutridas con amonio y nitrato, respectivamente (**Tabla 4**).

Tabla 4. Descripción de las diferentes colonias encontradas en las raíces inoculadas.

Cepas	Forma	Elevación	Margen	Color
<i>A. brasilense</i>	Circular	Convexo	Entero	Amarillo ^a
◆ <i>Sp245</i>	Circular	Convexo	Entero	Rojo congo ^b
◆ <i>Faj164</i>	Circular	Convexo	Entero	Centro naranja y margen amarillo ^c
◆ <i>Faj009</i>	Circular	Pulvinado	Entero	Rojo tenue ^d
	Circular	Similar umbonado	Ondular	Punto rojo y margen naranja ^e
	Puntiforme	Convexo	Entero	Rojo congo ^f
	Puntiforme	Convexo	Entero	Rosa tenue ^g
NO AISLADA	Irregular	Plano	Entero	Rosa tenue ^h

* Las letras minúsculas indican su ubicación en la **Figura 6**.

8. DISCUSIÓN

El sistema aeropónico es una herramienta que ofrece un medio no invasivo para examinar las raíces de plantas durante su desarrollo. También permite utilizar un gran número de parámetros (Stoner, 1993), como la capacidad de controlar con precisión los niveles de humedad en la zona de las raíces lo que hace ideal la aeroponía para el estudio de plantas endémicas de zonas áridas como el mezquite.

Este estudio demuestra que el sistema aeropónico puede ser utilizado para cultivar plántulas de mezquite como alternativa de reforestación y mejorar su crecimiento con la adición de microorganismos rizosféricos promotores de crecimiento en plantas como *Azospirillum brasilense*, el cual es capaz de desarrollar diversos mecanismos entre los cuales se encuentra la bomba de protones (Bashan y Levanony, 1989a, 1989b, 1991; Bashan *et al.*, 2004), que puede acidificar el apoplasto de la raíz del mezquite (*Prosopis articulata*) y favorecer el crecimiento de esta planta.

Como parte de la estandarización del sistema se seleccionó la solución Hoagland al 5%, porque la relación vástago-raíz indica que crecen en la misma proporcionalidad en esta solución nutritiva, por lo que se puede evaluar el efecto de la inoculación con *Azospirillum brasilense*, más claramente y su potencialidad para su establecimiento a terreno definitivo.

La inoculación de plantas con *Azospirillum* puede dar como resultado cambios significativos en varios parámetros de crecimiento, entre los que se encuentran el incremento en el peso seco total, incremento en el tamaño de planta e incremento en el desarrollo del sistema de raíces, tanto en longitud como en volumen. Sin embargo, dos factores pueden contribuir a la complejidad de la respuesta de la planta a la inoculación: la variedad de la planta cultivada, ya que cada una responde distinto a la inoculación (Arsac *et al.*, 1990; Bouton *et al.*, 1979; Millet *et al.*, 1986) y la nutrición de la planta ya que puede modificar la acidificación de la rizósfera como se ha demostrado en varias especies de plantas tales como cacahuete, maíz (Schaller y Fischer, 1985) y en girasol (Römheld *et al.*, 1984). En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación con

Azospirillum brasilense en plántulas de mezquite nutridas con amonio y nitrato. Considerando que el ion amonio puede incrementar en el flujo de protones y de esta manera favorecer el desarrollo de la raíz, se desarrollaron pruebas experimentales que sustenten esta hipótesis.

Los resultados obtenidos en el monitoreo de pH en plántulas de mezquite nutridas con amonio y nitrato, presentaron un incremento en la acidificación del apoplasto de la raíz dentro de las primeras 24 horas después de la inoculación. Este efecto es similar al reportado en plántulas de trigo (Bashan *et al.*, 1989). Las plántulas inoculadas con las tres diferentes cepas presentaron una disminución de pH en comparación con de las plántulas no inoculadas. Esto indica que la presencia de las tres cepas de *A. brasilense* en la raíces aumentó el flujo de protones en el apoplasto de la raíz del mezquite; esto es consistente con lo reportado por Bashan y Levanony (1989a) en plántulas de trigo y Carrillo *et al.* (2002) en plántulas de cactus. Sin embargo, las dos cepas mutantes de *A. brasilense* Sp245 incrementan la acidificación dependiendo de la fuente de nitrógeno que tenga disponible la planta. La cepa mutante Faj164, que tiene una nitrato reductasa negativa periplasmica y que por lo tanto, no puede producir óxido nítrico a partir de nitrato pero sí puede producir Acido Indolacético (AIA) como intermediario, en condiciones de nitrato como fuente de nitrógeno; aumentó en la acidificación. Por otra parte la cepa Faj009, que tiene atenuada la descarboxilasa indol-3-piruvato y por lo tanto, reducida la síntesis de AIA en un 90%, presenta aumento en la acidificación del apoplasto cuando la planta es nutrida con amonio, y este incremento es mayor que el producido por la Faj164. Molina-Favero *et al.* (2008) propusieron que la cepa Faj164 es capaz de producir 5.6nmolNO/g y la cepa Faj009 es capaz de producir 120nmolNO/g, bajo condiciones aeróbicas y con nitrato como la única fuente de nitrógeno. Estos resultados sugieren que la cepa Faj009 que produce mayor acidificación cuando la plántulas son nutridas con amonio, es capaz de producir mayor oxido nitrito, el cual favoreció el desarrollo en la arquitectura de la raíz de tomate, independientemente de la capacidad de la bacteria para sintetizar AIA (Molina-Favero *et al.*, 2008). Esto es consistente con lo que obtuvimos en superficie de raíz del mezquite nutrido con amonio, donde la cepa Faj009 presento mayor superficie de raíz pero de menor densidad. Sin embargo la cepa Faj164 presentó mayor peso seco, es decir son más densas pero de

menor superficie de raíz. Esto podría ser una desventaja para las plántulas de mezquite porque estas necesitan poseer un sistema radical lo suficientemente desarrollado en longitud, para lograr establecerse en condiciones áridas, especialmente en suelos arenosos (Dalmasso *et al.*, 1994).

Por otra parte, las plántulas de mezquite nutridas con nitrato no presentaron diferencias significativas con respecto al control tanto en superficie de raíz como en peso seco. En este sentido Mantelin y Touraine (2003) mencionan que el desarrollo de la raíz y la captación del ion nitrato son independientes uno de otro y por lo tanto los efectos de inoculación con bacteria promotoras de crecimiento en plantas (siglas en PGPB) son más altos en plantas con niveles bajo de fertilización de nitrógeno en forma de nitrato, esta observación es coherente con lo sugerido por Okon (1985); Dobbelaere *et al.* (2002).

Mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH) se logró detectar la presencia de *A. brasilense* sobre la raíz de mezquite nutridas con amonio pero no en las que fueron nutridas con nitrato. Estos resultados contrastan con lo que Kapulnik *et al.* (1985) sugieren que la inoculación con *Azospirillum Cd*, mejora el desarrollo de las raíces y la cantidad de absorción con NO_3^- (en sistema hidropónico). Algunos estudios demuestran que ciertas plantas (de muchas variedades probadas) respondieron a la inoculación con una cepa de *Azospirillum* en particular (Bouton *et al.*, 1979; García de Salomone y Döbereiner, 1996; Millet *et al.*, 1986; Wani *et al.*, 1985). Además se sugiere que la especificidad no es a nivel especie sino a nivel cepa como lo reportan Caballero-Medallo *et al.* (1992), donde encontraron que los incrementos en rendimiento de trigo dependieron de la cepa de *Azospirillum brasilense* utilizada.

Además, se sugiere que la colonización de la bacteria puede estar determinada por la nutrición de la planta. En este sentido, Bashan y Holguin (1993) mencionan que las células crecidas sin manganeso se anclaron a raíces de trigo en mayor concentración que células crecidas con manganeso. Sin embargo, si no se encuentran firmemente adheridas, las bacterias pueden ser fácilmente desprendidas de la raíz por el agua,

provocando que mueran ya que se ha demostrado que *Azospirillum* no sobrevive bien sin plantas (Bashan y Levanony, 1990; Bashan y Holguin, 1995).

Con el fin de corroborar la ausencia de bacterias en la raíz de mezquite de plántulas nutridas con nitrato, se realizó el conteo bacteriano de las plántulas inoculadas con las tres cepas de *A. brasilense*, en ambas fuentes de nitrógeno teniendo como resultados que las plántulas nutridas con nitratos reducen su colonización, y esta es menor en la cepa Faj009, la cual reduce en un 36% la colonización al finalizar el bioensayo de tres días.

En el aislamiento, descripción e identificación de colonias de *A. brasilense* se aislaron las 8 morfotipos, probablemente se deba a condiciones de estrés por temperatura. En este sentido Peoples y Craswell (1992), mencionan que *Azospirillum* spp. presenta mayor crecimiento entre 32 y 36°C y no se conoce su respuesta a mayores temperaturas y disminuye de forma pronunciada por debajo de 30°C.

De los 8 morfotipos se lograron aislar solo 7, creciendo en medio selectivo para bacterias fijadoras de nitrógeno, lo cual coincide con lo encontrado por Tarrand *et al.* (1974) quien reporta que el género *Azospirillum* presenta una morfología vibroide, pleomorfismo y movimiento en espiral. En este sentido Bashan *et al.* (1991b) mencionan que las plantas de soya sin estrés hídrico presentan forma vibroide mientras que las que presentan problemas de estrés hídrico presentan marchitamiento de la planta y la bacteria presenta forma de quiste. Bleakley *et al.* (1988) mencionan que bajo condiciones de estrés, las bacterias son capaces de producir quistes y flóculos (agregados visibles), los cuales incrementan su supervivencia. Estos fenómenos pueden también ser resultado de la edad (Sadavisan y Neyra, 1987) o condiciones del cultivo. Sin embargo, se necesita más evidencia como el uso de técnicas moleculares para poder comprobar lo anterior.

9. CONCLUSIÓN

- ◆ Las cepas de *Azospirillum brasilense* incrementan el flujo de protones de apoplasto de raíz del mezquite (*Prosopis articulata*). Sin embargo, las dos cepas mutantes de *A. brasilense* Sp245 incrementan la acidificación dependiendo de la fuente de nitrógeno que tenga disponible la planta.
- ◆ El sistema aerónico puede ser utilizado para cultivar plántulas de mezquite para reforestar y mejorar su crecimiento con la adición de bacterias promotoras de crecimiento en plantas (PGPB) como *Azospirillum brasilense*.
- ◆ La cepa *A. brasilense* Faj009 incrementa la acidificación del apoplasto cuando las plántulas tienen disponible el ion amonio e incrementa la superficie de raíz, lo cual puede favorecer el establecimiento de las plántulas a terreno fijo.
- ◆ La colonización de *Azospirillum brasilense* se favorece cuando las plántulas tienen disponible ion amonio como única fuente de nitrógeno.
- ◆ *Azospirillum brasilense* es capaz de presentar morfotipos diferentes en respuesta a condiciones de temperatura mayores a 36°C o menores de 30°C aunque se requieren más estudios para comprobarlo.

10. LITERATURA CITADA

1. Amann, R., Krumholz, L y Stahl, D.A. (1990). Fluorescent- Oligonucleotide probing of Whole Cells for Determinative, Phylogenetic and Environmental Studies in Microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172: 762-770.
2. Amann, R.I. (1995). Fluorescently labelled, rRNA- targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*. 4: 543-554.
3. Amann, R., Fuchs, B. M y Behrens S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 231-236.
4. Amooaghaie. R, Mostajeran. A y Emtiazi. G. (2002). The effect of compatible and incompatible *Azospirillum brasilense* strains on proton efflux of intact wheat roots. *Plant and Soil*. 243: 155-160
5. Antonyuk, L. y Evseeva, N. (2006). Wheat Lectin as a Factor in Plant- Microbial Communication and a Stress Response Protein. *Microbiology*. 75(4): 470-475.
6. Arasimowicz, M. y Floryszak_Wieczorek, J. (2007) Nitric Oxide as a Bioactive Signalling Molecule in Plant Stress Responses, *Plant Science*. 172: 876–887.
7. Arsac, J.F., Lamothe, C., Mulard, D., y Fages, J. (1990). Growth enhancement of Maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie Journal*. 10: 640-654.
8. Assmuss, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, G., Lawrence, J. R y Hartmann, A. (1995). *In situ* Localization of *Azospirillum brasilense* in the Rhizosphere of Wheat with Fluorescently Labeled, rRNA- Targeted Oligonucleotide Probes and Scanning Confocal Laser Microscopy. *Applied an Environmental Microbiology*. 61: 1013-1019.
9. Baldani, V.L.D y Döbereiner. J. (1980). Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology Biochemistry*. 12:433-439.
10. Baldani, V.L.D., Álvarez, M.A. De B., Baldani, J.I., y Döbereiner, J. (1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*. 90:35-46.

11. Barbieri, P., Zanelli, T., Galli, E., y Zanetti, G. (1986). Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiology Letter. 36: 87-90.
12. Bashan Y. (1986). Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. Soil Biology Biochemistry. 18: 297-301.
13. Bashan, Y. (1990). Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. Canadian Journal of Microbiology. 36: 419-425.
14. Bashan, Y. y Holguin. G. (1993). Anchoring of *Azospirillum brasilense* to hydrophobic polystyrene and wheat roots. Journal of General Microbiology. 139: 379-385.
15. Bashan, Y. y Holguin. G. (1995a). Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. Microbiology Ecology. 29: 269-281.
16. Bashan, Y., Puente, M.E., Rodríguez-Mendoza, M.N., Holguin, G., Toledo, Ferrera-Cerrato, R. y Pedrín, S. (1995b). Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. In: *Azospirillum* VI and related microorganisms, genetic-physiology-ecology. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden y M. De Zamaroczy (Eds). NATO ASI Series, Series G: Ecological Sciences, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 37:441-449.
17. Bashan, Y., Puente, M.E., Rodríguez- Mendoza, M.N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera-Cerrato, R. y Pedrín, S. (1995c). Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. 61:1938-1945.
18. Bashan, Y, y Holguin, G. (1997). *Azospirillum*- plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology. 43: 103-121.
19. Bashan, Y., Holguin, G y de Bashan, L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relations: physiological, molecular, agricultural and enviromental advances. Canadian Journal of Microbiology. 50: 521-577.
20. Bashan, Y, y Levanony, H. (1989a). Effect of root environment on proton efflux in wheat roots. Plant and Soil. 119: 191-197.

21. Bashan, Y., Levanony, H., y Mitiku, G. (1989b). Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*. 36: 591-608.
22. Bashan, Y, y Levanony, H. (1989c). Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Canadian Journal of Microbiology*. 35: 936-944.
23. Bashan, Y. y Levanony, H. (1989d). Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*. 135: 2899-2908.
24. Bashan, Y, y Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 1089-1098.
25. Bashan, Y, y Levanony, H. (1991). Alterations in membrane potential and in proton efflux in plant roots induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil*, 137: 99-103.
26. Bashan, Y., Levanony, H. y Whitmoyer, R. (1991b). Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *Journal of General Microbiology*. 137: 187-196.
27. Bashan, Y., Davis, A., Carrillo- García, A., y Linderman, R. (2000). Assessment of VA mycorrhizal inoculum potential in relation to the establishment of cactus seedlings under mezquite nurse-trees in the Sonora desert. *Applied Soil Ecology*. 14: 165-176.
28. Bashan, Y. y de- Bashan. L.E. (2010). How the plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth- A Critical Assessment. *Advances in Agronomy*. 108: 77-122.
29. Bashan, Y., Trejo, A y de- Bashan. L.E. (2010). Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. And for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertilily of Soils*.47: 963-969.
30. Bleakley, B.H., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H., y Zam, S.G. (1988). Floc formation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly (-hydroxybutyrate). *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2986-2995.

31. Böhm W, (1979). Methods of studying root systems. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. Germany. 132.
32. Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D y Pharis, R. P. (1989). Identification of Gibberellins A1, A3 and Iso-A3 in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiology. 90: 45-47.
33. Bouton, J.H. y Zuberer, D.A. (1979). Response of *Panicum maximum* Jacq. to inoculation with *Azospirillum brasilense*. Plant Soil. 52: 585-590.
34. Burkart, A. (1976). A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam, Mimosoideae). Catalogue of the recognized species of *Prosopis*. Journal of Arnold Arboretum. 57: 219-249.
35. Caballero Mellado, J., Carcano Montiel, M.G. y Mascarua Esparza, M.A. (1992). Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis. 13: 243-253.
36. Carrillo-García, A., Leon de la Luz, J., Bashan, Y., y Bethlenfalvay, G. (1999). Nurse plants, Mycorrhizae, and Plant Establishment in a Disturbed Area of the Sonoran Desert. Restoration Ecology. 7: 321-335.
37. Carrillo- García, A., Bashan, Y., y Bethlenfalvay, G. (2000). Resource-island soils and the survival of the giant cactus, cardon, of Baja California Sur. Plant and Soil. 218: 207-214.
38. Carrillo, A., Ching, Y., y Bashan, Y. (2002). Increased acidification in the rhizosphere of cactus seedlings induced by *Azospirillum brasilense*. Naturwissenschaften. 89: 428-432.
39. Carter, W. A. (1942). A method of growing plants in water vapor to facilitate examination of roots. Phytopathology. 32: 623-625.
40. Cohen, A., Bottini, R., y Piccoli, P. (2008). *Azospirillum brasilense* sp.245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. Plant Growth Regulation. 54: 97-103.
41. Costacurta, A., Keijers, V., and Vanderleyden, J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic pyruvate decarboxylase gene. Mol. Gen. Genet. 243:463-472.

42. Croizer, A., Arrunda, P., Jasmin, J.M., Montero, A.M. y Sandberg, G. (1998). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 2833-2837.
43. Daims H, Bruhl A, Amman R, Schleifer K & Wagner M. (1999). The domain- specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*. 22: 434-444.
44. De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo*. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. 170-224p.
45. Devlin R.M. (1982). *Fisiología vegetal*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 313p
46. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A y Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*. 212: 155-164.
47. Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Okon, Y., y Vanderleyden, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. *Biology and Fertility of Soils*. 36: 284-297.
48. Evans, L. S., Lewin, K. F., y Vella, F. A. (1980). Effect of nutrient medium pH on symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum* and *Pisum sativum*. *Plant and Soil*. 56(1): 71-80.
49. Fallik, E., Okon, Y., y Fischer, M. (1988). Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: Effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. *Soil Biology Biochemistry*. 20: 45-49.
50. Fauci, M., y Dick, R. (1994). Microbial biomass as an indicator of soil quality: Effects of long-term management and recent soil amendments. In *defining soil quality for*

- sustainable environment. Soil Sciences Society of America, Madison, Wisconsin. 229-234.
51. Felker, P. (1981). Variation in Growth among 13 *Prosopis* (Mesquite) species. *Experimental Agriculture*. 17: 209-218.
 52. Felker, P., y Guevara, J.C. (2003). Potencial of commercial hardwood forestry plantations in arid lands- an economic analysis of *Prosopis* lumber production in Argentina and the United States. *Forest Ecology and Management*. 186: 271-286.
 53. Franco, A., y Nobel, P. (1989). Effect of nurse plants on the microhabitat and growth of cacti. *Journal of Ecology*. 77: 870-886.
 54. Garcia de Salomone, I., y Döbereiner, J. (1996). Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biology and Fertility of Soils*. 21: 193-196.
 55. Garner, W., y Steinberger, Y. (1989). A proposed mechanism for the formation of Fertile Islands in the desert ecosystem. *Journal of Arid Environments*. 16: 257-262.
 56. Garrity, G. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology: the proteobacteria*. Springer. 2: 2816.
 57. Hadas, R., y Okon, Y. (1987). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils*. 5: 241-247.
 58. Hartmann, A. (1998). Ecophysiology aspect of growth and nitrogen fixation in *Azospirillum* spp. *Plant and Soil*. 10: 225-238.
 59. Hartmann, A. y Baldani, A.J. (2006). The Genus *Azospirillum*. In: *the Prokaryotes. A Handbook of the Biology of Bacteria: Proteobacteria: Alpha and Beta subclass*. Springer New York. 115-140.
 60. Hayden, A. L. (2006). *Aeroponic and Hydroponic Systems for Medicinal Herb, Rhizome, and Root Crops*. HortScience. 41:3.
 61. Holguín, G. y Bashan, Y. (1996). Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured whit a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biology and Biochemistry*. 28: 1651-1660.
 62. Karpati, E. et al., (1999). Interaction of *Azospirillum lipoferum* with Wheat Germ Agglutinin Stimulates Nitrogen Fixation. *Journal of Bacteriology*. 181(13): 3949-3955.

63. Kapulnik Y., Gafni R., y Okon Y. (1985). Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO_3^- uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. Miriam) in hydroponic system. Canadian Journal of Botany. 63, 187-193.
64. Landeras, G., Alfonso, M., Pasiecznik, N., Harris, P y Ramírez, L. (2005). Identification of *Prosopis pallida* accessions using molecular markers. Biodiversity and Conservation, Publicado en línea.
65. Levanony, H y Bashan, Y. (1989). Localization of Specific Antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in Its Exopolysaccharide by Immuno-Gold Staining. Current Microbiology. 18: 145-149.
66. Levanony, H., y Bashan, Y. (1989b). Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. Canadian Journal of Botany. 67: 2213-2216.
67. Mantelin, S., y Touraine, B. (2003). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. Journal of Experimental Botany. 55(394): 27-34.
68. Marshner, H., Römheld, V., Horst, W.J y Martin, P. (1986). Root induced changes in the rizosfera: Importance for the mineral nutrition of plants. Pflanzenernaerh Bodenk. 149: 441-456.
69. Martin-Laurent, F., Lee, S. K., Tham, F. Y., ÉI, J., Diem, H.G., y Durand, P. (1997). A new approach to enhance growth and nodulation of *Acacia mangium* through aeroponic culture. Biology and Fertility of Soils. 25(1): 7-12.
70. Mehnaz, S., Weselowski, B y Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum canadense* sp. a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 57: 620-624.
71. Millet, F., y Feldman, M. (1986). Yield response of a common spring wheat cultivar to inoculation with *Azospirillum brasilense* at various levels of nitrogen fertilization. Plant Soil. 80:255-259.
72. Molina-Favero C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., y Lamattina L. (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. Molecular Plant-Microbe Interactions. 21: 1001–1009.

73. Mother, A., y Göbel, U. B. (2000). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. 41: 85-112.
74. O'Donnell, A, G y Whiteley, A.S. (1999). Fluorescent *in situ* hibridization and the analysis of the single cell. *Métods in Biotechnology*. 221-235.
75. Okon Y. (1985). *Azospirillum* as a potencial inoculant for agricultura. *Trends in Biotechonology*. 3: 223-228.
76. Okon, Y., y Kapulnik, Y. (1986). Development and fuction of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant and Soil*. 90: 3-16.
77. Olin, G., Alcorn, S., y Alcorn, J. (1989). Dispersal of viable saguaro seeds by white-winged doves (*Zenaida asiatica*). *Southwestern Naturalist*. 34:282-284.
78. Ortega-Rubio, A., Naranjo, A., Nieto, A., Arguelles, C., Salinas, F., Aguilar, R., y Romero, H. (1988). Suspended particles in atmosphere and respiratory health problems at La Paz city, Baja California Sur. *Journal of Environmental Biology*. 19: 381-387.
79. Peoples, M., y Craswell, E. (1992). Biological nitrogen fixation; investments expectations and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*. 141:13-39.
80. Pereyra, C. M., Ramella N. A., Pereyna, M. A., Barassi, C .A., Creus, C. M.(2010) Changes in cucumber hypocotyl cell wall dynamics caused by *Azospirillum brasilense* inoculation. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48(1):8.
81. Peterson, L. A., y Krueger, A. R. (1988). An Intermittent Aeroponics System. *Crop Science*. 28(4): 712-713
82. Ritter, E., Angulo, B., Riga, P., Herrán, C., Relloso, J., y San José, M. (2001). Comparison of hydroponic and aeroponic cultivation systems for the production of potato minitubers. *Potato Research*. 44(2): 127-135.
83. Römheld, V., Müller, C., y Marschner, H. (1984). Localization and capacity of proton effluxes in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiology*. 76: 603-606.
84. Rothballer, M., Schmid, M., y Hartmann, A. (2003). *In situ* localization and PGPR-Effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis*. 34: 261-279.

85. Sadasivan, L y Neyra, C.A. (1987). Cyst production and Brown pigment Formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *Journal of Bacteriology*. 169:1670-1677.
86. Severn-Ellis, A. A., Daneel, M., de Jager, K., y De Waele, D. (2003) Desarrollo de un sistema aeropónico para el estudio de la respuesta de las raíces de banano a la infección con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cúbense* y *R. similis*. *InfoMusa*. 12(1): 22-24.
87. Steenhoudt, O., Keijers, V., Okon, Y., y Vanderleyden, J. (2001) Identification and characterization of a periplasmica nitrate reductasa in *Azospirillum brasilense* sp245. *Arch. Microbiol.* 175:344-352.
88. Schaller, G., y Fisher, W.R. (1985). pH -Änderungen in der Rhizosphäre von Mais- und Erdnusswurzeln. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 148: 306-320.
89. Schimid, M., Selesi, D., Rothballer, M., Schloter, M., Lee, N., Kandeler, E., y Hartmann, A. (2006). Localization and visualization of microbial community structure and activity in soil microhabitats. *Soil Biology*. 6: 439-461.
90. Schuurman, J.J., y Goedewaagen, M.A.J. (1971). *Methods for the Examination of Root Systems and Roots*. Wageningen: Pudoc 2nd Ed.
91. Smith, R.L., Schank, S.C., Milam, J.R, y Baltensperger, A.A. (1984). Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied Environmental Microbiology*. 47: 1331-1336.
92. Steenberg, W., y Lowe, C. (1977). *Ecology of the saguaro: II. Reproduction, germination, establishment, growth, and survival of the young plant*. National Parks Service Scientific Monograph US Government Printing Office, Washington, D.C. 8.
93. Stoner R. J. (1988). *Aeroponics versus Bed and Hydroponic Propagation*. *Florists Rev.* 1(173): 4477.
94. Taiz, L. y Zeiger, E (1998). *Plant physiology*. 2nd ed. Sinauer. Associates, Inc. Sunderland, EEUU. 792 pp.
95. Tarrand, M., Krieg, N., y Döbereiner, J. (1974). The genus *Azospirillum*. In: N. Krieg and J. Döbereiner (Eds). *Bergey's Manual Determinative Bacteriology* 8th. Edn. Williams and Wilkins, Baltimore. 94-104p

96. Tiedemann, A., y Klemmedson, J (1973). Effect of mezquite on physical and chemical properties of the soil. *Journal Range Manage.* 26: 27-29.
97. Tewari, R. K., Hahn, E. J., y Paek, K. Y. (2007). Function of nitric oxide and superoxide anion in the adventitious root development and antioxidant defence in *Panax ginseng*. *Plant Cell Report.* 27: 563–573.
98. Turner, R., Alcorn, S., Olin, G., y Booth, J. (1996). The influencia of shade, soil and water on saguaro seedling establishment. *Botanical Gazette.* 127: 95-102.
99. Virginia, R. (1986). Soil development under legume tree canopies. *Forest Ecology and Management.* 16: 69-79.
100. Wani, S. P., Chandrapalajah., y Dart, P. J. (1985). Response of pearl millet cultivars to inoculation with nitrogen-fixing bacteria. *Experimental Agriculture.* 21:175-182.
101. Zobel. W., Del Tredici, P., y Torrey, J.G. (1976). Method for Growing Plants Aeroponically. *Plant Physiology.* 57: 344-346.
102. Zwirgmaier, K. (2005). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) - the next generation *FEMS Microbiology Letters.* 246: 151-158.

ANEXO 1

Medio BTB-1 con sales de OAB para cultivo de bacterias presentado por Bashan *et al.* (2011).

Solución	Gramos por 1000mL
NaCl	1.2
MgSO₄ H₂O	0.25
K₂HPO₄	0.13
CaCl₂	0.22
K₂SO₄	0.17
NH₄Cl	1
Na₂SO₄	2.4
NaHCO₃	0.5
Na₂CO₃	0.09
Fe(III)EDTA	0.07
Triptona	5
Gluconato	5
Extracto de levadura	5

Una vez se esteriliza el medio se ajusta el pH a 7.

ANEXO 2

Solución nutritiva para plantas, presentada por Hoagland (1975).

SUSTANCIA	NUTRIENTE PROPORCIONADO	CANTIDAD (g/L)stock
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Nitrógeno, Potasio	23
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrógeno, Calcio	271.63
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Calcio	38.22
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnesio, Azufre	98.6
KNO_3	Nitrógeno, Potasio	121.32
EDTA, sal de fierro	Quelante	Ver apartado(*)
H_3BO_3	Boro	0.742
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Manganeso, Cloro	0.087
ZnCl_2	Zinc, Cloro	0.3
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cobre, Cloro	2
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Molibdeno	0.05

(*) La solución de Fe-EDTA se prepara disolviendo 0.067 g de la sal disódica de EDTA en 25mL de agua destilada, se calienta y se agregan 0.0495 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y se agita vigorosamente.

ANEXO 3

Solución nutritiva (Bashan *et al.* 1989).

Reactivos	Concentración (Mm)
K₂SO₄	0.75
Mg SO₄	0.65
KH₂PO₄	0.1
(NH₄)SO₄	0.5
CaSO₄	0.5
H₃BO₃	1x 10 ⁻²
MnCl.4H₂O	1x 10 ⁻⁴
ZnSO₄. 7H₂O	0.5 x 10 ⁻⁵
CuSO₄ 5H₂O	0.5 x 10 ⁻⁵
H₂MoO₄ .H₂O	0.5 x 10 ⁻⁶

En experimentos con nitrato como única fuente de nitrógeno se ocupa esta formulación sustituyendo (NH₄) SO₄ y CaSO₄ con 2 mM Ca (NO₃)₂.