

# Efecto de aislados bacterianos de la familia de las rizobacterias provenientes de alfalfa (*Medicago sativa*) en la mejora del crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y nodulación en jitomate (*Solanum lycopersicon*)

Ezequiel Alejandro Madrigal Carrillo <sup>1</sup>, Ilse Patricia Rivas Valdéz <sup>1</sup>,  
Cristina Garcidueñas Piña <sup>2</sup>, Alma Lilián Guerrero Barrera <sup>3</sup>,  
José Francisco Morales Domínguez <sup>4</sup>

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de aislados de rizobacterias provenientes de alfalfa (*Medicago sativa* L.), en el crecimiento y expresión de proteínas en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y jitomate (*Solanum lycopersicon*). Se obtuvieron dos diferentes aislados; A y Ab, los cuales se inocularon en semillas de frijol Bayo, Pinto y Negro y de jitomate Bola y Río Grande. Los mejores resultados en crecimiento se observaron en el frijol Pinto y el Bayo con los aislados A y Ab, respectivamente. En el jitomate no hubo cambios significativos en el crecimiento pero sí se presentó nodulación. La electroforesis de proteínas, reveló que en hojas de frijol Bayo inoculado con Ab hay una sobreexpresión de una proteína de 18 kDa, y en vainas una de 50 kDa. Los aislados tuvieron un efecto positivo en el

**Palabras clave:** Rizobacterias, nodulación, fijación de nitrógeno, aislados, simbiosis.

**Key words:** *Rhizobacteria*, *nodulation*, *nitrogen fixation*, *isolates*, *symbiosis*.

Recibido: 8 de agosto de 2008, aceptado: 27 de noviembre de 2008

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. ezealien@hotmail.com

<sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Depto. de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. crigarpi@hotmail.com.

<sup>3</sup> Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. alguerre@correo.uaa.mx.

<sup>4</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. jfmoral@correo.uaa.mx.

crecimiento y expresión de proteínas, por lo que pueden utilizarse como alternativa para reducir el uso de fertilizantes químicos.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of rhizobacters spp. isolates from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on the growth and protein expression of *Phaseolus vulgaris* and *Lycopersicon esculentum* plants. We obtained two different isolates herewith termed as A and Ab. *P. vulgaris* (Bayo, Pinto and Black bean) and *L. esculentum* (Bola and Rio Grande tomato) seeds were inoculated with the above isolates. Isolates A and Ab promoted the growth in the Pinto and Bayo cultivars, respectively. For tomato, both varieties showed no significant changes in growth although roots appeared to be nodulated. Protein electrophoresis, revealed the accumulation of an 18 kDa protein in leaves of Bayo plants, whereas a 50 kDa protein accumulation in their vines. The isolates had a positive effect in the growth and expression of proteins which suggests their potential use as an alternative to chemical fertilizers.

## INTRODUCCIÓN

En México, la producción de frijol y jitomate se ha incrementado en las últimas décadas debido a que están dentro de la canasta básica alimenticia constituyendo así, una gran importancia económica y nutricional (FAO, 2007). La necesidad de mantener altos niveles en la producción de estos alimentos ha exigido la utilización de grandes cantidades de fertilizantes químicos, actividad

que ha desencadenado la contaminación de las tierras de cultivo y mantos acuíferos en algunas áreas (Muhammetoglu y Yardimici, 2006). Ésta, es una problemática preocupante tanto a nivel nacional como mundial. Una alternativa clave para evitar el uso excesivo de fertilizantes químicos es la aplicación práctica de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), proceso que ha sido aplicado desde hace algunas décadas. Este proceso natural es llevado a cabo por las  $\alpha$ -proteobacterias del suelo pertenecientes a la familia de las rizobacterias que crean una simbiosis de tipo mutualista con plantas leguminosas (Luka *et al.*, 1996). Durante la simbiosis las rizobacterias aportan nitrógeno molecular de la atmósfera a la planta, el cual utilizan para la biosíntesis de proteínas mientras que ésta otorga nutrientes a la bacteria. En este proceso se desarrollan nódulos bacterianos en las raíces de las plantas infectadas (Muñoz *et al.*, 1998).

La capacidad de varias cepas de *Rhizobium* para promover el desarrollo y crecimiento de diferentes plantas hospederas ha sido ampliamente estudiado en los últimos años con el fin de verificar si la fijación de nitrógeno es factible en plantas no leguminosas (Santillana *et al.*, 2005). Por lo que, el objetivo principal de este trabajo es analizar la capacidad de aislados de rizobacterias del género *Sinorhizobium* spp provenientes de alfalfa (*Medicago sativa*) en la germinación y crecimiento de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y jitomate (*Solanum lycopersicon*), así como la inducción de síntesis de proteínas. Se probó el uso de estas rizobacterias para promover el crecimiento de frijol y jitomate.

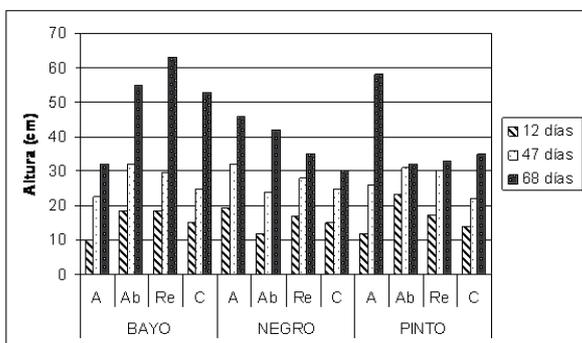
## MATERIALES Y MÉTODOS

En las tierras de cultivo pertenecientes a la posta zootécnica de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), se recolectaron 30 plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) con presencia de nódulos en las raíces. Éstas, se lavaron con agua en abundancia hasta quitar el exceso de tierra, los nódulos se aislaron y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante cinco minutos con agitación constante y dos veces más con alcohol al 70% por dos minutos, al final se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Éstos se maceraron con agua destilada estéril y se inocularon en medio PY con estreptomomicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y ácido nalidíxico (20

$\mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron a 28° C. Al crecimiento de estos aislados se le nombró como A. Para verificar el efecto de nodulación se utilizaron semillas de frijol Bayo, Pinto y Negro (Valle Verde™) y de jitomate Bola y Río Grande, desinfectadas e inoculadas con suspensiones densas del aislado A. Las semillas fueron sembradas en tierra estéril (Peat Moss™) bajo condiciones de invernadero y se dejaron crecer hasta la aparición de nódulos en raíces. Para la obtención del segundo aislado, se seleccionó la planta de frijol Bayo que presentó mayor nodulación y mediante los mismos procesos antes descritos se obtuvo el aislado Ab. Con los aislados A y Ab, se realizó una segunda inoculación en semillas de las variedades de frijol y jitomate ya mencionadas y como control positivo se utilizó la cepa de *Rhizobium etli* CFN42 (Re) y como control negativo semillas con agua destilada estéril (C). Se sembraron un total de 40 semillas por tratamiento con tres repeticiones cada una y se pusieron bajo condiciones de invernadero por un periodo de 68 días. Durante ese tiempo, se monitoreó el crecimiento por semana a partir de su germinación. Se tomaron datos sobre la altura, número de hojas, flores y vainas, así como la presencia de nodulación por cada planta. Con los datos obtenidos, se realizó un análisis estadístico tipo ANOVA (Tuckey,  $p > 0.05$ ) con el fin de verificar cuál de los aislados era más eficaz en cada tratamiento. Para la extracción de proteínas totales se pesaron cinco gramos de muestra provenientes de hoja y vaina a los 68 días, utilizando el protocolo descrito por Garcidueñas *et al.*, (2007). Las muestras proteicas se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%.

## RESULTADOS

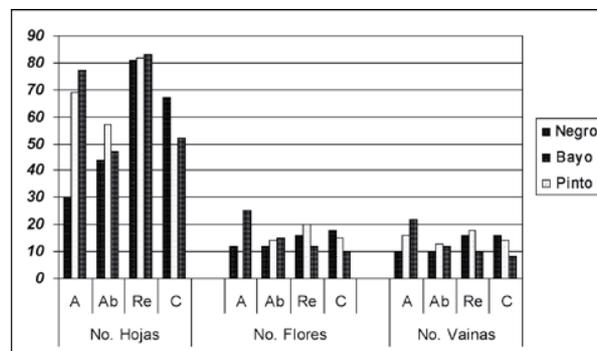
Durante la germinación no se observó un efecto significativo de los aislados con respecto al control negativo; mientras que en el crecimiento de las plantas sí, por lo que se tomaron datos de la altura a partir de los 12 días después de la germinación y hasta los 68 días. A los 12 días de crecimiento para las plantas inoculadas con el aislado A, el que mostró una mayor altura fue el frijol Negro con 20 cm con respecto a las demás inoculadas con el mismo aislado; para el aislado Ab, la mayor altura promedio fue para el frijol Pinto con 24 cm seguida del Bayo con 19 cm, y para Re fue para el Bayo con 18 cm y para C, se obtuvo un promedio de 12 cm para todas las variedades.



**Figura 1.** Altura de plantas de frijol tratadas con inóculos de rizobacterias en diferentes tiempos. A; aislado A, Ab; aislado Ab, Re; cepa de *Rhizobium etli*, C; control sin inóculo. Cada barra representa la altura promedio de 20 plantas analizadas en los diferentes tratamientos.

A los 68 días en el frijol Bayo el tratamiento de Ab fue más eficiente en la estimulación del crecimiento que el tratamiento A, sin embargo, el tratamiento A funcionó mejor para las variedades Negro y Pinto, obteniéndose la segunda mayor altura de 58 cm con esta última variedad. La planta más alta se obtuvo con el control positivo (Re) en la variedad Bayo a los 68 días, siendo de 63 cm., como se muestra en la Figura 1.

El mayor número de hojas lo presentó la planta de frijol Pinto inoculada con Re con un promedio de 82, mientras que con el aislado A fue para el frijol Pinto y con Ab para el Bayo. Para el número de vainas, los mejores resultados fueron con el aislado A, para Pinto y Bayo. En el número de flores, el tratamiento que mejor efecto tuvo fue el aislado A para Pinto, y para Negro y Bayo fue con el tratamiento Re (Figura 2). En la nodulación, se



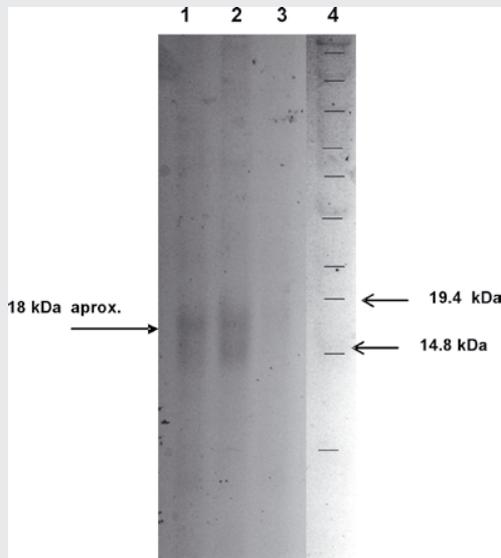
**Figura 2.** Número de hojas, flores y vainas de cada variedad de frijol con los diferentes tratamientos a los 68 días. A; aislado A, Ab; aislado Ab, Re; cepa de *Rhizobium etli*, C; control sin inóculo. Cada barra representa la cantidad promedio de 20 plantas analizadas en los diferentes tratamientos.

observó que las plantas de frijol Pinto con el aislado A fueron las que contenían mayor cantidad de nódulos (Figura 3).

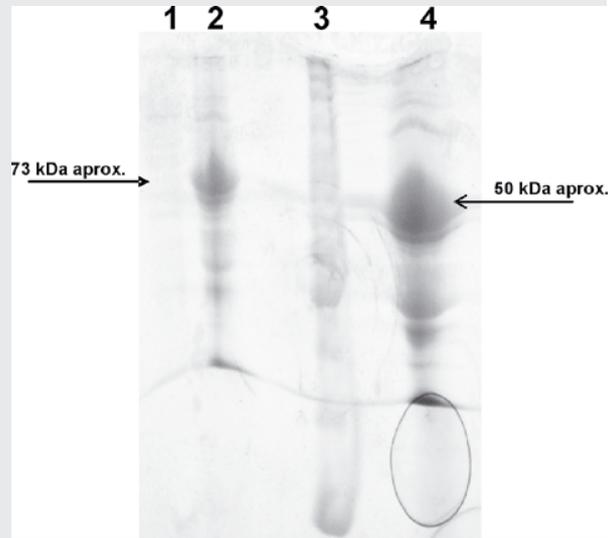
La extracción de proteínas totales de las plantas analizadas fue con el fin de verificar si los aislados tienen un efecto sobre la producción de algún tipo de proteínas. La electroforesis reveló que la muestra de hojas de frijol Bayo inoculado con el aislado Ab presentó una sobreproducción de una proteína de aproximadamente 18 kDa (Figura 4). En cuanto a muestras obtenidas de vainas de frijol Bayo, la inoculada con el aislado A, mostró una banda proteica muy marcada de un peso molecular aproximado a 50 kDa (Figura 5). Respecto a los datos obtenidos de las plantas de las dos variedades de jitomate, en el tiempo del experimento, no hubo cambios significativos en su crecimiento ya que todas mostraron en



**Figura 3.** Nodulación en raíces con diferentes aislados. A) frijol Bayo con Ab, B) frijol Negro con Re, C) frijol Bayo con A y D) frijol Pinto con A.



**Figura 4.** Electroforesis de proteínas totales de hojas de frijol Bayo tratado con diferentes aislados. 1) Muestra de proteínas de hojas de plantas tratadas con el aislado A, 2) Proteínas con el aislado Ab., 3) Control, sin inocular y 4) Marcador de peso molecular (MPM). Se observa en los carriles 1 y 2 una expresión de una proteína de aproximadamente 18 kDa.



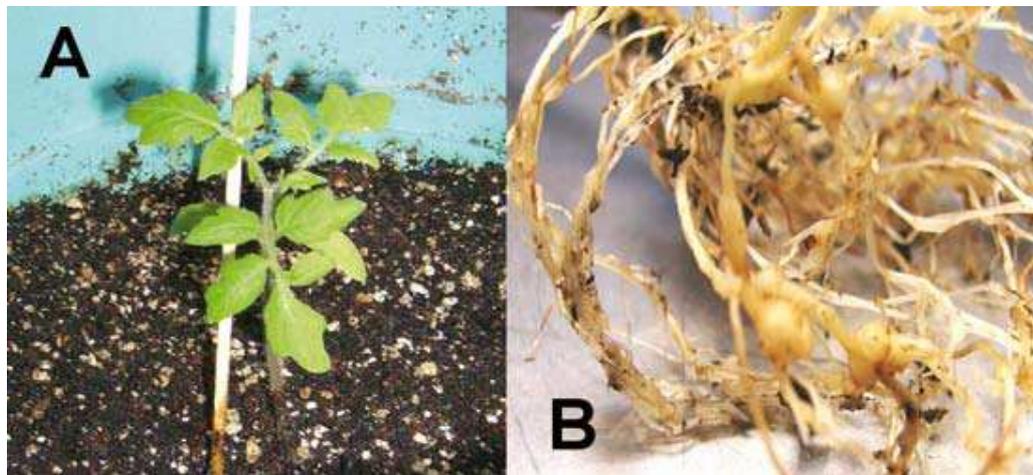
**Figura 5.** Proteínas totales de vainas de frijol Bayo tratadas con diferentes aislados. 1) Control sin inocular, 2) Con la cepa Re; existe una expresión de una proteína de aprox. 73 kDa. 3) MPM y 4) Con el aislado A, donde se presenta una sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 50 kDa.

promedio una altura de 20 cm. Sin embargo, se pudo apreciar poca nodulación en la mayoría de las plantas (Figura 6).

## DISCUSIÓN

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

natural (Chabot *et al.*, 1996, Heckmann *et al.*, 2006). Por ejemplo, se han realizado estudios de diferentes cepas y aislados de algunas especies de *Rhizobium* procedentes de plantas de haba inoculadas en jitomate (Santillana *et al.*, 2005), así como cepas provenientes de frijol e inoculadas en maíz y lechuga (Chabot *et al.*, 1996) y también algunos aislados de jitomate inoculados en arroz (Feng *et al.*, 2005), donde, además, se verifi-



**Figura 6.** Efecto del aislado A en el crecimiento y nodulación de plantas jitomate Bola A) Crecimiento de la planta a los 68 días y B) Nódulos en raíces.

có que promueven la germinación, nodulación y crecimiento, teniendo como consecuencia una mayor producción en cosecha y reduciendo la dependencia al uso de fertilizantes químicos.

Con respecto a nuestros resultados con plantas de frijol, en la germinación de semillas, no se observaron cambios significativos entre ellas y el control negativo, ya que éstas germinaron en un 100% al mismo tiempo, caso contrario con los resultados que obtuvo Santillana *et al.*, (2005), quienes trabajaron con diferentes cepas de haba inoculando plantas de jitomate observaron una germinación temprana en las plantas inoculadas con respecto al control negativo. En cuanto al crecimiento de nuestras plantas con los aislados A, Ab, Re y C, todas mostraron diferencias significativas en altura durante el periodo de tiempo establecido en este trabajo (Figura 1), esto pudo ser debido al efecto de la cepa o de los aislados para promover la producción de diferentes fitohormonas en la planta y así como al tipo de hospedero con base en lo reportado por Chabot *et al.*, (1996). En el mismo trabajo de Santillana, se verificó el efecto de la germinación en un 100% pero el crecimiento de las plantas inoculadas con referencia al control negativo, no fue significativo ya que todas presentaban una altura similar. En la mayoría de los casos, se ha visto que el crecimiento de las plantas inoculadas con simbiosis provenientes de diferentes hospederos, existe una respuesta positiva pero, en algunos casos, no la hay, tal es el caso de Chabot *et al.*, (1996), que trabajó con *Rhizobium leguminosarum* cv. Phaseoli inoculando plantas de maíz y lechuga y sólo observó la presencia de colonización pero no de nodulación, postulando que el crecimiento de la planta es dependiente de *Rhizobium*. En cambio, Feng *et al.*, (2005); al inocular arroz con varias cepas de *Rhizobium* provenientes de leguminosas, observó que la nodulación es esencial para incrementar la producción de fitohormonas y, por lo tanto, el crecimiento de la planta.

Este trabajo no analiza la producción de fitohormonas por no ser uno de los objetivos principales, sin embargo, se analizó la presencia de nódulos, donde se pudo apreciar gran cantidad de éstos en todas las plantas de frijol (datos no mostrados) y se observa que las plantas con mayor cantidad de nódulos son las que tuvieron un mayor crecimiento; como en el frijol Bayo inoculado con Ab y para Pinto con A. Para la producción de hojas y vainas se observó que la planta de fri-

jol Pinto con el aislado A fue la que tuvo una mayor cantidad de hojas y vainas seguida del Bayo. Aunque la mayor producción de hojas se obtuvo en todas las plantas inoculadas con Re, éstas no produjeron más vainas que las inoculadas con A. Feng *et al.*, (2005), observaron resultados similares sobre la producción de hojas en plantas de arroz y atribuyen este fenómeno a la síntesis de ácido giberélico y ácido indolacético por efectos de la nodulación de *Rhizobium*. Cabe señalar que en el presente trabajo, se obtiene en general, una mayor biomasa al usar los aislados e inocular las semillas respecto al control negativo que repercute en mayor alimento para ganado y las vainas en más alimento para humano.

Uno de los objetivos de este trabajo fue analizar la sobreexpresión de algún tipo de proteína por efectos de los aislados y en estudios posteriores aislarla y caracterizarla para verificar su valor nutricional o su relación con respuesta a la bacteria. En muchos estudios se ha analizado la cantidad de proteínas totales en materia seca y la mayoría coinciden con un incremento en la parte área por efectos de *Rhizobium*. Nuestros resultados revelaron que existe una sobreexpresión de una proteína en hojas principalmente de plantas de frijol Bayo inoculadas con el aislado A y Ab con un peso molecular aproximado a 18 kDa, y en vainas de 50 kDa, lo cual indica que puede existir un efecto de los inóculos sobre la producción de ciertas proteínas ya que éstas no se observaron en el control negativo. En cuanto a los análisis de jitomate, desafortunadamente, no se pudieron apreciar cambios durante el periodo de tiempo programado. Sin embargo, se pudo apreciar la nodulación comprobando que es factible la infección de estos aislados en jitomate; sólo que para este caso es ideal trabajar en un periodo más largo con el fin de tener mejores resultados.

## CONCLUSIONES

Los aislados provenientes de alfalfa y de la cepa de Re tienen la capacidad de infectar a otros organismos hospederos no específicos, teniendo un efecto en el crecimiento y nodulación de las plantas, además de que existe la sobreproducción de una proteína promovida por los aislados. En las plantas de jitomate se comprobó la nodulación aunque no fue posible analizar los efectos de éstos. En el caso del inóculo A en el frijol Pinto, se observó un aumento en el crecimiento de has-

ta más de 20 cm respecto al control negativo y dos veces la producción de vainas. Si estos datos se extrapolan en la producción en una hectárea claramente podría repercutir en un mayor número

de toneladas lo cual puede ser una excelente alternativa para el uso de fertilizantes químicos a un menor costo promoviendo una agricultura sustentable.

## REFERENCIAS

- CHABOT, R., *et al.* Colonization of maize and lettuce by bioluminescent. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 8, págs. 2767-2772, 1996.
- FAO. Statistics division. 2007 (FAOSTAT).
- FENG, C., *et al.* Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, págs. 7271-7278, 2005.
- HECKMANN, A. B., *et al.* Lotus japonicus nodulation requires two GRAS domain regulators, one of which is functionally conserved in a non-legume. *Plant Physiology*, 142, págs. 1739-1750, 2006.
- GARCIDUEÑAS-PIÑA, C., *et al.* Expresión de una alfa expansina de guayaba (*Psidium guajava* L.) en sistemas bacterianos. *Scientiae Naturae*, 9, 2, págs. 23-33, 2007.
- LUKA, S., *et al.* Cloning of the rpoD analog from *Rhizobium etli*: sigA of *R. etli* is growth phase regulated. *Journal of Bacteriology*, 178, págs. 7138-7143, 1996.
- MUHAMMETOGLU, A., YARDIMICI, A. A fuzzy logic approach to assess groundwater pollution levels below agricultural fields. *Environ Monit Assess*, 118, 3, págs. 337-54, 2006.
- MUÑOZ, J. A., *et al.* MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa-*Rhizobium meliloti* interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, págs. 9687-9692, 1998
- SANTILLANA, N., ARELLANO, C., ZÚÑIGA, D. Capacidad del *Rhizobium* de promover el crecimiento en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum miller*). *Ecología Aplicada*. 4, págs. 47-51, 2005.