

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y
FUNCIONAL DEL BANCO DE CEPAS DE *Azospirillum* spp.
DEL INIAP AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL
CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE LA SIERRA
ECUATORIANA”**

Previa a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

SANGOLQUÍ, 18 de Julio de 2012

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

DIRECTORA DE LA CARRERA

ING. TATIANA PÁEZ

Sangolquí, 18 de Julio de 2012

CERTIFICADO DE TUTORIA

Dra. Ligia Ayala

Dr. Ricardo Oliva

Certifican:

Que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL BANCO DE CEPAS DE *Azospirillum* spp. DEL INIAP AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE LA SIERRA ECUATORIANA” realizado en su totalidad por la Srta. ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Sangolquí, 18 de Julio de 2012

Dra. LIGIA AYALA

DIRECTORA

Dr. RICARDO OLIVA

CODIRECTOR

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL BANCO DE CEPAS DE *Azospirillum* spp. DEL INIAP AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE LA SIERRA ECUATORIANA”, realizado por la egresada Andrea Greta Carrera González, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto “Fortalecimiento Seguridad Alimentaria Maíz, código: 2100527015”, se deja en libertad de la autora y del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Andrea Greta Carrera González que lo entregue a la Ing. Tatiana Páez, en su calidad de Directora de la Carrera.

Quito, 18 de Julio de 2012

Ing. Tatiana Páez

DIRECTORA DE LA CARRERA

Ing. MSc. Carlos Yáñez

CODIRECTOR (INIAP)

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL BANCO DE CEPAS DE *Azospirillum* spp. DEL INIAP AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE LA SIERRA ECUATORIANA”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 18 de Julio de 2012

ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

AUTORIZACIÓN

Yo, ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, del trabajo denominado “CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA, MOLECULAR Y FUNCIONAL DEL BANCO DE CEPAS DE *Azospirillum* spp. DEL INIAP AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL CULTIVO DE MAÍZ (*Zea mays* L.) DE LA SIERRA ECUATORIANA”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 18 de Julio del 2012

ANDREA GRETA CARRERA GONZÁLEZ

DEDICATORIA

Esta tesis refleja un sin número de pequeños y grandes esfuerzos realizados a diario durante el tiempo de su ejecución, donde se plasmó en hechos el aprendizaje recibido por años; pero, de nada sirve un esfuerzo sin la motivación e inspiración correcta, por ello mi dedicatoria va dirigida a: Dios, por poner en mi tanto el querer como el hacer para cumplir su voluntad; la cual ha sido buena, agradable y perfecta hasta el día de hoy y porque cada día tuve en mi mente éstas sus palabras:

*“Además de ser sabio, el Maestro, impartió conocimientos a la gente.
Ponderó, investigó y ordenó muchísimos proverbios. Procuró también
hallar las palabras más adecuadas y escribirlas con honradez y veracidad.
Pero de ellas, hijo mío, ten presente que no hay fin de hacer muchos libros;
y el mucho leer causa fatiga. El fin de todo el discurso oído es: “Teme a
Dios y guarda sus mandamientos, porque esto es el todo del hombre.”*

Eclesiastés 12:9-13

Andy C.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A Dios por darme la oportunidad de realizarme como profesional, tengo la convicción de que Él puso todo y a todos en el lugar y momento preciso para el desarrollo de este trabajo y que ahora recibo la bendición de culminarlo con éxito.

A la Escuela Politécnica del Ejercito (ESPE), Departamento de Ciencias de la vida, Facultad de Ingeniería en Biotecnología, a todas sus autoridades y personal docente quienes fueron los comprometidos en mi formación académica profesional.

De manera muy especial a MSc. Claudia Segovia, Dra. Ligia Ayala y Dr. Ricardo Oliva quienes me apoyaron en la realización de esta tesis brindándome su dirección y codirección, por su preocupación e interés en mi desarrollo profesional y por brindarme su valioso tiempo, haciéndolos profesionales excepcionales y de ejemplo.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), al Programa de Maíz y al Departamento de Biotecnología, ya que las personas que lo conforman supieron brindarme sus conocimientos y experiencias técnicas para realizar este trabajo, ellos son: Ing. MSc. Carlos Yáñez, Ing. Javier Noroña, Ing. Jorge Heredia y Dr. Eduardo Morillo.

A mis padres: Pablo y Greta por ser el ejemplo de constancia y de experiencia, gracias por el consejo oportuno sobre: la vida, el mundo laboral y la palabra de Dios, por su comprensión en mis buenos y malos momentos, por ser el hombro donde puedo descansar y por ser el oído que escucha mis tristezas y alegrías, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Pablo, gracias porque eres quien me inspira a ser mejor persona para lograr ser un ejemplo para ti. Por confiar en mí cuando te hayas en dificultades, por compartir junto a ti nuestros talentos musicales y por las discusiones, porque a pesar de

que somos y pensamos diferente, esa diferencia nos hace aprender uno del otro. Gracias por convertir mis días de cansancio en notas musicales, peleas, juegos y distracción.

A mi mejor amiga con la cual compartí aulas y trabajo: Salomé, gracias por estos ocho años de amistad incondicional, por estar en las buenas y en las malas, por ser mi apoyo; sé que pasamos por pruebas de fuego pero recuerda que *“mejores son dos que uno, porque si cayeren, el uno podrá levantar al otro”* Ec. 4:10.

A mis amigas con las cuales compartí aquellas largas noches de trabajos, deberes, giras, pasantías, bromas y risas: Dianny, Cris y Silvy, cuanto agradezco a Dios por poner las circunstancias oportunas para conocernos y llegar a ser lo que ahora somos: amigas y colegas. Gracias por su confianza y amistad incondicional.

A mis amigos de la igle con los cuales comparto lo más valioso que tengo en mi vida, a Dios. Gracias por las risas, los repasos, las tocadas, las salidas y sobre todo por mostrarse amig@s no solo en los tiempos de necesidad y tristeza sino en las alegrías y victorias. Gracias: Pablo Ludeña, Andrea Tacuri, Any Enríquez, Paul Sánchez, Andrés Piedra, Mafer Valle, Mauricio y Cristina Hidalgo; sigamos siendo esos adoradores en Espíritu y en verdad que nuestro Padre busca.

Y a todos los que en su momento aportaron con una valiosa ayuda, alegría y amistad formando parte de mi diario vivir y de esta meta ahora hecha realidad. Ellos son: Henry Naranjo, Daniela y Adriana Villamarín, Belén Dávila, Verónica Granda, Erika Sánchez, Tania Villareal, Cristina Quiroga, Johanna Buitrón, Natasha Baer, Oscar Miranda, Andrea Zárate, Gustavo Cáceres, Sra. Geo Vera, Señor Mary, María José Basantes, Ing. Karina García, Ing. Gabriela Miño, Ing. Ricardo Andrade, Ing. Rodrigo Vinueza, y Lic. Katerine Orbe.

Andy C.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Parte introductoria

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO.....	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICADO DE TUTORÍA.....	iii
CERTIFICACIÓN.....	iv
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD.....	v
AUTORIZACIÓN.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	x
LISTADO DE TABLAS.....	xvi
LISTADO DE CUADROS.....	xviii
LISTADO DE FIGURAS.....	xix
LISTADO DE ANEXOS.....	xxiv
RESUMEN.....	xxvi
ABSTRACT.....	xxvii

Cuerpo de la tesis

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Formulación del problema.....	1
1.2. Justificación del problema.....	5
1.3. Objetivos de la Investigación.....	6
1.3.1. Objetivo General.....	6
1.3.2. Objetivos Específicos.....	6
1.4. Marco Teórico.....	7
1.4.1. El Maíz (<i>Zea mays</i> L.).....	7
1.4.1.1. Clasificación taxonómica.....	7
1.4.1.2. Descripción biológica.....	7
1.4.1.3. Características generales del cultivo.....	9

1.4.1.4. Situación del cultivo de maíz en el Ecuador.....	10
1.4.2. Variedad de Maíz: INIAP – 101.....	11
1.4.2.1. Origen y zonificación.....	11
1.4.2.2. Características agronómicas.....	11
1.4.2.3. Características de calidad y usos.....	12
1.4.2.4. Manejo agronómico del cultivo de la variedad I-101.....	12
1.4.3. Rizósfera y Rizobacterias.....	14
1.4.3.1. La rizósfera.....	14
1.4.3.2. Rizobacterias.....	14
1.4.4. Género <i>Azospirillum</i>	16
1.4.4.1. Historia.....	16
1.4.4.2. Clasificación taxonómica.....	16
1.4.4.3. Características generales.....	16
1.4.4.4. Aislamiento e identificación.....	19
1.4.4.5. Asociación <i>Azospirillum</i> – planta.....	21
1.4.4.6. Mecanismos de acción de <i>Azospirillum</i> sobre el crecimiento vegetal.....	22
1.4.4.7. Utilización de <i>Azospirillum</i> como biofertilizante.....	23
1.4.5. Microbiología.....	24
1.4.5.1. Identificación de microorganismos bacterianos.....	24
1.4.5.2. Métodos de identificación.....	24
1.4.5.2.1. Métodos morfológicos.....	25
1.4.5.2.2. Métodos de tinción diferencial.....	26
1.4.5.2.3. Métodos bioquímicos.....	27
1.4.5.2.4. Métodos serológicos.....	28
1.4.5.2.5. Métodos moleculares.....	30
1.5. Sistema de hipótesis.....	33
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1. Participantes.....	34
2.1.1. Instituciones.....	34
2.1.2. Responsable del proyecto.....	34
2.1.3. Colaboradores científicos.....	34

2.2. Zona de estudio.....	34
2.3. Período de investigación.....	34
2.4. Diseño experimental y estadística.....	34
2.5.Procedimiento.....	37
2.5.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas....	37
2.5.1.1. Procedencia y descripción de las cepas.....	37
2.5.1.2. Reactivación y purificación de liofilizados bacterianos.....	49
2.5.1.3. Identificación microbiológica.....	40
2.5.1.3.1. Descripción morfológica de colonias bacterianas.....	40
2.5.1.3.2. Pruebas Bioquímicas.....	40
2.5.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas.....	44
2.5.2.1. Extracción del ADN genómico.....	44
2.5.2.2. Cuantificación de ADN.....	45
2.5.2.2.1. Electroforesis horizontal en geles de agarosa.....	45
2.5.2.2.2. Fluorometría.....	45
2.5.2.3. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal.....	46
2.5.2.4. Visualización de productos amplificados.....	46
2.5.2.5. ARDRA.....	47
2.5.2.5.1. Restricción enzimática virtual.....	47
2.5.2.5.2. Restricción enzimática de las cepas bacterianas.....	48
2.5.2.5.3. Visualización de los productos de la digestión enzimática.....	48
2.5.2.5.4. Registro de datos.....	49
2.5.2.5.5. Análisis de datos y agrupamiento.....	49
2.5.2.6. Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal.....	49
2.5.2.6.1. Edición y registro de secuencias obtenidas.....	50
2.5.2.6.2. Análisis y comparación de secuencias homólogas.....	50
2.5.2.7. Análisis filogenético de las secuencias.....	50
2.5.3. FASE III. Evaluación funcional <i>in vitro</i> de las cepas bacteriana.....	50
2.5.3.1. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101.....	50
2.5.3.2. Preparación de suspensiones bacterianas.....	51
2.5.3.3. Evaluación del efecto bacteriano sobre las semillas de maíz....	52

2.5.3.4. Procesamiento de las plántulas y análisis estadístico de las variables.....	52
2.5.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.....	53
2.5.4.1. Composición química del sustrato.....	53
2.5.4.2. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101.....	53
2.5.4.3. Siembra de semillas de maíz pre-germinadas en invernadero...	53
2.5.4.4. Preparación de suspensiones bacterianas.....	54
2.5.4.5. Evaluación del efecto bacteriano sobre las plantas de maíz.....	54
2.5.4.6. Procesamiento de las plantas y análisis estadístico de las variables.....	55
2.6. Análisis de datos.....	55
2.6.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas.....	55
2.6.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas.....	55
2.6.3. FASE III. Evaluación funcional <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas.....	56
2.6.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.....	57
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	59
3.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacteriana.....	59
3.1.1. Reactivación y purificación.....	59
3.1.2. Identificación microbiológica.....	60
3.1.2.1. Descripción morfológica de colonias bacterianas.....	60
3.1.2.2. Pruebas bioquímicas.....	61
3.1.2.2.1. Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Azospirillum</i>	61
3.1.2.2.2. Pruebas bioquímicas para identificación de especies dentro del género <i>Azospirillum</i>	66
3.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas.....	69
3.2.1. Extracción, calidad y cantidad del ADNg.....	69
3.2.2. Amplificación y visualización del gen 16S ADN ribosomal.....	69
3.2.3. ARDRA.....	70

3.2.3.1. Restricción enzimática virtual.....	70
3.2.3.2. Análisis ARDRA con la enzima <i>AluI</i>	72
3.2.3.3. Análisis ARDRA con la enzima <i>TaqI</i>	74
3.2.3.4. Análisis ARDRA con la enzima <i>EcoRI</i>	75
3.2.3.5. Análisis de agrupamiento.....	76
3.2.4. Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal.....	79
3.2.5. Edición y registro de las secuencias obtenidas.....	79
3.2.6. Análisis y comparación de secuencias homólogas.....	81
3.2.7. Análisis filogenético de las secuencias.....	82
3.3. FASE III. Evaluación funcional <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas.....	86
3.3.1. Germinación de las semillas de maíz I-101.....	86
3.3.2. Suspensiones bacterianas.....	87
3.3.3. Evaluación del efecto bacteriano sobre las semillas de maíz.....	87
3.3.4. Registro de datos y análisis estadístico de las variables obtenidas....	88
3.3.4.1. Variable longitud de raíz.....	91
3.3.4.2. Variable porcentaje de Materia Seca.....	92
3.3.4.3. Variable número de raíces principales desarrolladas.....	93
3.4. FASE IV: Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas...	94
3.4.1. Análisis químico del sustrato.....	94
3.4.2. Evaluación del efecto de las cepas inoculadas sobre semillas de maíz en invernadero.....	96
3.4.3. Registro de datos y análisis estadístico de las variables.....	97
3.4.3.1. Variable altura de planta (45 días).....	99
3.4.3.2. Variable longitud de raíz (45 días).....	99
3.4.3.3. Variable: porcentaje de materia seca.....	100
 CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	 102
4.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas.....	102
4.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas.....	105
4.3. FASE III. Evaluación funcional <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas.....	110
4.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.....	115

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	119
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....	120
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS.....	136

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Tratamientos y repeticiones de la evaluación funcional <i>in vitro</i> de las cepas bacterianas.....	36
Tabla 2.2. Código y lugar de procedencia de los aislados bacterianos.....	38
Tabla 2.3. Secuencias del gen 16S ADNr pertenecientes al género <i>Azospirillum</i> , obtenidas del RDP para el análisis de restricción virtual.....	47
Tabla 2.4. Enzimas seleccionadas para la técnica ARDRA indicando su sitio de restricción.....	48
Tabla 2.5. Parámetros evaluados en el sustrato.....	53
Tabla 3.1. Patrones o genotipos de corte enzimáticos para el gen 16S ADNr de las secuencias pertenecientes al género <i>Azospirillum</i> obtenidas del RDB.....	71
Tabla 3.2. Genotipos obtenidos con la enzima <i>AluI</i> para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP.....	73
Tabla 3.3. Genotipos obtenidos con la enzima <i>TaqI</i> para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP.....	74
Tabla 3.4. Genotipos obtenidos con la enzima <i>EcoRI</i> para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP.....	76
Tabla 3.5. Análisis de comparación y asignación del BLAST para las secuencias de las muestras bacterianas.....	82
Tabla 3.6. Análisis de Varianza para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca y número de raíces principales desarrolladas, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre semillas pre-germinadas de maíz de la variedad I-101 a condiciones <i>in vitro</i>	89
Tabla 3.7. Promedios y Tukey al 5 % para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca y número de raíces principales desarrolladas, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre semillas pre-germinadas de maíz de la variedad I-101 a condiciones <i>in vitro</i>	90

Tabla 3.8. Parámetros evaluados en el análisis químico realizado al sustrato antes y después de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.....	95
Tabla 3.9. Análisis de Varianza para las variables: altura de planta, longitud de raíz y porcentaje de materia seca, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.....	97
Tabla 3.10. Promedios y Tukey al 5 % para las variables: altura de planta, longitud de raíz y porcentaje de materia seca, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.....	98

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación del maíz de acuerdo a la estructura y composición del endospermo.....	9
Cuadro 1.2. Variedades de maíz de la sierra ecuatoriana certificadas por el INIAP.....	11
Cuadro 1.3. Características agronómicas del maíz INIAP-101.....	12
Cuadro 1.4. Características de calidad de la variedad INIAP-101.....	12
Cuadro 1.5. Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Azospirillum</i> spp.....	18
Cuadro 1.6. Pruebas bioquímicas diferenciales a nivel de especies del género <i>Azospirillum</i>	18

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Características macro y microscópicas para <i>Azospirillum</i> . A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de <i>Azospirillum</i> al crecer en el medio de cultivo Acido málico- rojo Congo. B. Tinción Gram y forma celular de <i>Azospirillum</i> . C. Vista microscópica de la tinción del polímero β -Polihidroxibutirato.....	17
Figura 1.2. Restricción enzimática del gen 16S ADNr con la enzima <i>AluI</i> de dos especies del género <i>Azospirillum</i> . De izquierda a derecha: Carril1: Marcador molecular 100bp. Carril 2: <i>A. brasilense</i> sp7 (ATCC-29145). Carril 3: <i>Azospirillum brasilense</i> Cd. Carril 4: <i>A. lipoferum</i> sp59. Carril 5: <i>A. lipoferum</i> BR11086.....	21
Figura 1.3. Criterios morfológicos para describir colonias bacterianas según su: forma, elevación y borde.....	25
Figura 1.4. Formas celulares bacterianas.....	26
Figura 1.5. Pruebas API o tubos miniaturizados con medio de cultivo.....	28
Figura 1.6. Esquema del alcance de las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos. FISH: Hibridación fluorescente <i>in situ</i> ; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado; t ARN- PCR: Análisis del espaciador intergénico codificante de un ARN de transferencia; ITS-PCR: Análisis del espaciador intergénico 16S-23S; RFLP: Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; RFLP-PFGE: Análisis de fragmentos de restricción del ADN total cortado con enzimas de baja frecuencia de corte; AFLP: Análisis de polimorfismos de fragmentos de digestión y posterior amplificación selectiva; RAPD: Análisis de fragmentos de amplificación generados con iniciadores que se unen aleatoriamente al ADN total; rep-PCR: Análisis de fragmentos de amplificación de elementos repetitivos.....	32
Figura 2.1. Mapa de las provincias de la Sierra ecuatoriana donde se realizó la colección de muestras para el aislamiento de las cepas bacterianas.....	38

Figura 2.2. Reactivación y purificación de los aislados bacterianos. A. Cepa liofilizada sin y con la solución de peptona al 0,1%. B. Siembra en superficie con triángulo de vidrio esterilizado. C. Crecimiento bacteriano. D Purificación de colonias bacterianas mediante siembra por estriado compuesto.....	39
Figura 2.3. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101. A. Selección de la semilla. B. Lavado de semillas en solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico. C. Semillas colocadas en cajas Petri para la pre-germinación.....	51
Figura 2.4. Evaluación del efecto bacteriano sobre semillas de maíz. A. Semillas seleccionadas y colocadas en agar agua. C. Preparación de las suspensiones bacterianas. D. Inoculación bacteriana en raíces de maíz. F. Incubación de las semillas inoculadas.....	52
Figura 2.5. Siembra de semillas pre-germinadas en sustrato a condiciones de invernadero. A. Raleo de plántulas. B. Plantas de maíz en estado vegetativo V3 antes de la inoculación.....	54
Figura 3.1. Purificación y siembra en agar AM-RC de las 20 cepas bacterianas reactivadas. A. Cultivo bacteriano puro con la presencia de colonias morfológicamente iguales. B. Cultivo bacteriano donde se observa la presencia de colonias con morfologías diferentes, provenientes del microtubo de almacenamiento correspondiente.....	59
Figura 3.2. Identificación de colonias contaminantes. A. Colonias bacterianas de interés, por la presencia del color rojo escarlata, característica reportada para el género <i>Azospirillum</i> . B. Colonias bacterianas contaminantes, debido a que no presentan el color de colonia característico.....	60
Figura 3.3. Colonias puras de las cepas bacterianas cultivadas en AN a 30°C por 48h, a partir del cual, se realizó su descripción morfológica.....	61
Figura 3.4. Pruebas bioquímicas de tinción Gram y forma celular realizadas a las cepas bacterianas del INIAP. Cepas 1 y 7: bacilos Gram (-). Cepas 2 y 4: bacilos Gram (+). Vista microscópica, aumento 1000X.....	62
Figura 3.5. Prueba bioquímica de tinción del β -Polihidroxibutirato realizada a las cepas bacterianas del INIAP. Vista microscópica, aumento 1000X.....	63
Figura 3.6. Morfología de crecimiento de las cepas bacterianas en el medio de cultivo NFB semisólido.....	64

Figura 3.7. Pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacterianas. De izquierda a derecha: Prueba de catalasa positiva; Prueba de oxidasa positiva; prueba de motilidad positiva; y pruebas de sulfatos e indol negativas.....	64
Figura 3.8. Colonias puras de las cepas bacterianas cultivadas en el medio de cultivo agar AM-RC por siete días a 30°C; a partir del cual, se realizó la descripción morfológica.....	66
Figura 3.9. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacterianas, junto con los resultados reportados para las especies de <i>A. brasilense</i> , <i>A. lipoferum</i> y <i>A. amazonense</i>	68
Figura 3.10. Visualización del ADN genómico extraído de las 20 cepas bacterianas en geles de agarosa al 1%p/v. De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador molecular. Carriles 2-16: muestras de ADN bacteriano. Carril 17: Control negativo del protocolo de extracción.....	69
Figura 3.11. Visualización del gen 16S ADN ribosomal amplificado de las 20 muestras bacterianas, en geles de agarosa al 1,5% p/v. De Izquierda a derecha: Carril 1 y 23: marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-12: producto amplificado de las muestras bacterianas. Carril 13: control negativo de la reacción PCR. Carriles 14-22: producto amplificado de las muestras bacterianas.....	70
Figura 3.12. Cortes enzimáticos virtuales del gen 16S ADNr de especies de <i>Azospirillum</i> con las endonucleasas <i>AluI</i> , <i>TaqI</i> y <i>EcoRI</i> . De izquierda a derecha: Carril M: marcador molecular impuesto por el software. Carril A: <i>Azospirillum amazonense</i> . Carril B: <i>Azospirillum brasilense</i> sp7 y Carril C: <i>Azospirillum lipoferum</i>	71
Figura 3.13. Digestión enzimática del gen 16S ADNr de las 20 cepas bacterianas con la endonucleasas <i>AluI</i> . De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras bacterianas del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.....	73
Figura 3.14. Digestión enzimática del gen 16S ADNr de las 20 cepas bacterianas con la endonucleasas <i>TaqI</i> . De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras bacterianas del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.....	74

Figura 3.15. Digestión enzimática del gen 16S ADNr con la enzima <i>EcoRI</i> . De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.....	75
Figura 3.16. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para de los patrones de restricción enzimática del gen 16S ADNr (ARDRA) de las 20 cepas bacterianas y tres especies del género <i>Azospirillum</i> con las enzimas: <i>AluI</i> , <i>TaqI</i> y <i>EcoRI</i>	78
Figura 3.17. Cromatograma obtenido del secuenciador automático ABI-3730xl para la secuencia del gen 16Sr de la cepa 4 usando el iniciador 8f	79
Figura 3.18. Cromatogramas problema pertenecientes a las cepas 6,10 y 15.....	80
Figura 3.19. Alineamiento múltiple de los genes 16S ADNr pertenecientes al género <i>Azospirillum</i> , las 20 secuencias bacterianas en estudio y los géneros identificados mediante BLAST.....	83
Figura 3.20. Árbol filogenético para el alineamiento múltiple de secuencias completas del gen 16S ADNr de: especies del género <i>Azospirillum</i> , secuencias bacterianas en estudio y secuencias homólogas asignadas por el BLAST a las muestras bacterianas.....	85
Figura 3.21. Germinación y selección de semillas. A. Semilla germinada a los tres días de la desinfección. B. Selección de la semilla por el tamaño de su radícula. C y D. Semilla seleccionada para la evaluación.....	86
Figura 3.22. Efecto de inoculación de las cepas bacterianas sobre el desarrollo de las raíces de semillas de maíz de la variedad I-101, bajo condiciones <i>in vitro</i> ...	87
Figura 3.23 Variabilidad en el desarrollo de raíces de la semilla I-101 inoculadas con la cepa bacteriana correspondiente, bajo condiciones <i>in vitro</i>	88
Figura 3.24. Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados <i>in vitro</i> , considerando barras de error.....	92
Figura 3.25. Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de materia seca para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados <i>in vitro</i> , considerando barras de error.....	93

Figura 3.26. Gráfico de los datos experimentales de la variable número de raíces desarrolladas para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados <i>in vitro</i> , considerando barras de error.....	94
Figura 3.27. Variaciones fenológicas de las plantas de maíz tras la inoculación con las 20 cepas bacterianas por un periodo de evaluación de seis semanas.....	96
Figura 3.28. Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.....	99
Figura 3.29. Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.....	100
Figura 3.30. Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de materia seca para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.....	101

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A.	Medios de cultivo, soluciones y reactivos.....	136
A.1.	Medio agar Acido málico - rojo Congo (AM-RC).....	136
A.2.	Medio Agar Nutritivo (AN).....	136
A.3.	Medio NFB semisólido (Nitrogen Free Biological).....	137
A.4.	Medio agar Infusión de papa (BMS).....	137
A.5.	Medio Caldo Nutritivo.....	138
A.6.	Medio basal Oxidación - Fermentación (OFBM).....	138
A.7.	Solución de peptona al 0,1%.....	139
A.8.	Solución Acido Sulfanílico.....	139
A.9.	Solución α -Naftilamina.....	139
A.10.	Reactivo de Kovac.....	139
A.11.	Solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico.....	140
A.12.	Solución para la tinción del polímero β - Polihidroxitirato.....	140
ANEXO B.	Tampones de uso molecular.....	141
B.1.	Tampón de Extracción de ADN.....	141
B.2.	Tampón TE.....	141
B.3.	Tampón TAE 50 X.....	141
ANEXO C.	Descripción morfológica de colonia de las 20 cepas bacterianas purificadas y cultivadas en AN a 30°C por 48h.....	142
ANEXO D.	Pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacteriana utilizando pruebas específicas del género <i>Azospirillum</i>	143
ANEXO E.	Morfología de colonia de las 20 cepas bacterianas sembradas en el medio de cultivo agar AM-RC durante 7 días a 30°C, para la identificación del género <i>Azospirillum</i>	145
ANEXO F.	Pruebas bioquímicas para la identificación de especies dentro del género <i>Azospirillum</i>	146
ANEXO G.	Comprobante de envío de las muestras bacterianas a los laboratorios MACROGEN Inc. República de Corea.....	147
ANEXO H.	Modelo de secuencia consenso del gen 16s en formato FASTA.....	148

ANEXO I. Tabla de resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación del género *Azospirillum* vs. los resultados de los género bacterianos identificados..... 149

RESUMEN

Azospirillum es una de las rizobacterias de vida libre más estudiada en la actualidad. Tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y secretar reguladores de crecimiento tales como: auxinas, citoquininas y giberelinas. La producción de un biofertilizante en base a cepas de *Azospirillum*, favorecería el manejo de los cultivos vegetales en Ecuador y forjaría una tecnología amigable con el medio ambiente. En el año 2004, el Programa de Maíz del INIAP aisló 20 cepas bacterianas procedentes de la rizósfera de los cultivos de maíz de la Sierra ecuatoriana para identificar especies nativas de *Azospirillum*. Desde entonces, las cepas no cuentan con una identificación taxonómica concluyente ni con evaluaciones de sus capacidades funcionales. Los objetivos de esta investigación fueron: caracterizar con técnicas microbiológicas y moleculares los 20 ejemplares aislados y evaluar su función sobre semillas y plantas de maíz, variedad I-101, en condiciones *in vitro* e invernadero. Se empleó pruebas bioquímicas específicas para identificar el género *Azospirillum*; además, se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores específicos para amplificar y secuenciar el gen 16S ribosomal. Las dos técnicas dieron como resultado que los 20 ejemplares no pertenecen al género *Azospirillum*. La caracterización funcional a condiciones *in vitro*, identificó tres cepas (6, 13 y 20) con actividad promotora del crecimiento vegetal (PGPR). Éstas incrementaron la masa radicular, el número y la longitud de las raíces. En cambio, la caracterización funcional en invernadero identificó a la cepa 6 como promotora del desarrollo de biomasa vegetal. La cepa 6 es apta para el desarrollo de un biofertilizante, al presentar actividad promotora del crecimiento en el maíz suave INIAP-101, tanto a condiciones *in vitro* como invernadero.

Palabras claves: PGPR; *Azospirillum*; 16S ribosomal; maíz variedad INIAP-101.

ABSTRACT

Azospirillum is considered one of the free-living rhizobacteria most studied today. This bacterium has the ability to fix atmospheric nitrogen and secrete growth regulators such as auxins, cytokinins and gibberellins. The production of a biofertilizer based on *Azospirillum* strains would favor the use of crops in Ecuador, and forge a technology friendly environment. In 2004, the Programa de Maíz of INIAP isolated 20 bacterial strains from the rhizosphere of maize in the highlands of Ecuador, to identify native species of *Azospirillum*. But these strains do not have a taxonomic identification or evaluation of their functional ability. The objectives of this investigation were: to characterize with molecular and microbiological techniques the 20 bacterial strains and assess their role on seeds and corn plants, variety I-101, *in vitro* and greenhouse conditions. A microbiological level, specific biochemical tests were used to identify the *Azospirillum* genus; and molecular level, we used the Polymerase Chain Reaction (PCR), with specific primers to amplify and sequence 16S ribosomal gene. The two techniques resulted that 20 strains did not belong to *Azospirillum* genus. The functional characterization *in vitro* conditions identified three strains (6, 13 and 20) with plant growth promoting activity (PGPR). These increased root mass, the number and length of roots. Functional characterization, in greenhouse conditions, identified the strain 6 as the best treatment, because increased biomass in maize plants. Strain 6 is suitable for the development a biofertilizer, because this show growth promoting activity of sweet corn INIAP-101 under *in vitro* and greenhouse conditions.

Keywords: PGPR; *Azospirillum*; 16S ribosomal; variety corn INIAP-101.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La FAO reconoce que los cereales de mayor importancia a nivel mundial son: el trigo (*Triticum aestivum* L.), el maíz (*Zea mays* L.) y el arroz (*Oryza sativa* L.). Se les atribuye este jerarquía por la cantidad de áreas destinadas para su siembra y porque son productos esenciales para la seguridad alimentaria mundial (FAO, 2010).

Según Castañedo, (1990) el centro de origen primario del maíz fue al sur de México; pero, su origen secundario fue en los valles altos de: Perú, Ecuador y Bolivia, con una amplia diversidad genética. Hoy en día, tiene una distribución geográfica desde EE.UU, México, América central y América del sur (Castañedo, 1990).

La distribución continental del cultivo de maíz fue determinada por la capacidad de adaptación y por la mejora genética tradicional realizada en los centros de investigaciones agrícolas de todo el mundo para este cereal, lo que ha permitido su extensión a tierras y climas no adecuados para su cultivo (Lamo de Espinoza, 2009).

La importancia del maíz, a nivel mundial, radica en que es uno de los productos de consumo alimenticio más cotizados por el hombre y necesarios para el sector industrial pecuario (Fernández, 2007). Los mayores productores de maíz en el mundo son: Estados Unidos con 331.18 millones de toneladas al año y China con 152.30 millones de toneladas al año (FAO, 2010). Este cereal, también, es apreciado por el desarrollo de la tecnología para la elaboración de biocombustibles (bioetanol); lo cual, ha incrementado en los últimos años la demanda de su producción anual (Fernández, 2007).

En el Ecuador, el maíz se posiciona como uno de los cereales más cultivados a nivel nacional, ya que ocupa una superficie de siembra de 350 mil hectáreas, con una producción anual de aproximadamente 3.7 t/ha., siendo las provincias maiceras más

destacadas: Los Ríos, Guayas y Manabí (INEC y ESPAC, 2009). El 20% de la producción del cultivo de maíz es destinado al consumo de la población rural y es uno de los principales sustentos económicos de los agricultores (Monar, 2000).

En los últimos años, la producción nacional se ha visto limitada por varios factores, tales como: las variaciones climáticas, plagas propias del cultivo, la tecnología empleada (suelos), capital humano que trabaja en el campo (calificado o no calificado) y a la rentabilidad del cultivo por temporada (MAGAP, 2009).

Estos factores influyen de tal manera, que el rendimiento de maíz en el Ecuador es menor a los rendimientos internacionales, como el de los Estados Unidos con 7 t/ha.; esto a pesar de que nuestro país se encuentra en una ubicación geográfica estratégica y cuenta con regiones de excepcionales características edafo-climáticas que le permiten desarrollar una amplia diversidad de cultivos vegetales (Arteaga *et al.*, 2004).

De los factores mencionados, uno es fundamental en la producción nacional de maíz y es la tecnología empleada en los suelos (INIFAP, 2008). Este es un agente problemático del cultivo, debido a que los terrenos destinados para su siembra presentan baja fertilidad, específicamente, por la deficiencia de nitrógeno en los suelos y porque en los métodos de siembra aún prevalecen prácticas tradicionales con la escasa o nula utilización de fertilizantes; lo cual, reduce significativamente los rendimientos del maíz (INIAP, 2007).

La solución al problema de los terrenos no es fácil, ya que el cultivo genera desgaste de los suelos y no existen técnicas de compensación de parte del agricultor por falta de recursos económicos o capacitación técnica. Además, los precios de los fertilizantes inorgánicos para los cultivos son altos y si no se tiene un manejo apropiado de éstos contribuyen con la problemática actual de la contaminación ambiental (INIFAP, 2008).

El empleo de biofertilizantes en cultivos agrícolas es una alternativa prometedora. Se han reportado en estudios diversas ventajas de esta tecnología, como la compensación de las deficiencias de nitrógeno en los suelos, reducción a la mitad de los requerimientos de fertilizantes inorgánicos sin afectar la producción del cultivo,

disminución considerable de la contaminación ambiental y baja en los costos de inversión agrícola (Aguirre-Medina *et al.*, 2009).

Actualmente, existe un gran interés sobre biofertilizantes elaborados a base de microorganismos bacterianos procedentes de la rizósfera de cultivos vegetales (rizobacterias) tales como: *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp., *Azotobacter* spp. y actinomicetos como *Frankia* spp. (Sprent y Sprent, 1990), debido a los efectos benéficos que estos tienen sobre las plantas (Schroth y Hancock, 1982).

Se considera a *Azospirillum* como uno de los géneros de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (siglas en inglés PGPR) más estudiados en la actualidad, por su efecto benéfico sobre el crecimiento de las plantas (Collados, 2006). Los resultados recopilados de más de 20 años de estudios en este género han demostrado que el 60 y 70% de los experimentos llevados a cabo han tenido éxito, con un incremento significativo en la producción de: pastos, cereales (trigo, cebada, maíz y arroz) y caña de azúcar (Collados, 2006).

El efecto estimulante de *Azospirillum* se lo atribuye a los mecanismos de fijación de nitrógeno (N) atmosférico en el suelo y la producción de reguladores de crecimiento vegetales (Collados, 2006). Respecto a la primera, se cuestiona mucho que este sea un factor importante, ya que las cantidades de N fijadas por la bacteria son bajas, alcanzando aproximadamente 3 – 100 kg.ha/año; considerando que la asociación *Rhizobium*-leguminosa puede fijar hasta 700 kg.ha./año (Rodríguez-Mendoza, 1995); por lo tanto, tiene mayor consideración la producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal (Collados, 2006). *Azospirillum* produce auxinas, tales como: el Acido Indol Acético (AIA) (Okon y Labandera-González, 1994), citocininas y giberelinas (Caballero, 2001).

El Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) cuenta con una colección de 20 cepas bacterianas aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz en diferentes provincias del norte (Carchi, Imbabura y Pichincha) y centro (Chimborazo,

Tungurahua y Bolívar) de la Sierra ecuatoriana, identificadas presuntivamente como pertenecientes al género *Azospirillum* spp. (Espinoza, 2004).

Con estas cepas se han realizado ensayos y evaluaciones sobre su inoculación en plantas de maíz, teniendo en cuenta que: (1) en invernadero, se obtuvo un mejor crecimiento de la zona radicular y foliar de las plantas inoculadas con nueve de las veinte cepas, comparadas con un testigo sin inocular (INIAP, 2004) y (2) en campo donde se evaluaron las tres mejores cepas obtenidas de invernadero (c2-Bolivar; c3-Tungurahua y c4 -Chimborazo). La c4-Chimborazo fue la más eficiente en cuanto a los rendimientos en choclo (Cool, 2010).

Por otro lado, se evaluó la interacción de fertilizantes inorgánicos con las cepas bacterianas, teniendo que al aplicar tratamientos del 50% de la dosis de fertilizante químico + el biopreparado en base a la c2-Bolivar, los resultados de rendimientos fueron de 216,80 sacos/ha, siendo mayores a los obtenidos por el Programa de Maíz del INIAP con fertilización inorgánica al 100 % y sin cepas (157,84 sacos/ha) (Cool, 2010).

Los resultados de estas evaluaciones motivaron al Programa de Maíz del INIAP a incorporar una nueva tecnología de elaboración de un biofertilizante en base a las mejores cepas bacterianas promotoras del crecimiento, para contribuir con el desarrollo del cultivo de maíz producido en la Sierra ecuatoriana (INIAP, 2004). Pero, hasta el día de hoy, solo se registran estudios del aislamiento y ensayos de evaluación funcional de las cepas, y no de una identificación taxonómica; lo cual, limita en gran manera el conocimiento y manejo de las mismas a nivel microbiológico y ambiental.

1.2. Justificación del problema

La producción de un biofertilizante en base a cepas nativas de *Azospirillum* favorecería el manejo de los cultivos vegetales en el Ecuador y forjaría una tecnología amigable con el medio ambiente (INIAP, 2004). El Programa de Maíz del INIAP, se vio en la necesidad de realizar investigaciones con las cepas colectadas en beneficio del cultivo de maíz ecuatoriano, y una de las primeras razones que comprende este estudio es la identificación taxonómica de las mismas.

Técnicas microbiológicas, tales como: pruebas bioquímicas, son las encargadas de dar a conocer aquellas características que permiten identificar a los microorganismos tomando en cuenta: su morfología, comportamiento en medios de cultivo, propiedades bioquímicas, fisiológicas, nutricionales, sus actividades de interacción con otros seres vivos y con el medio en el que habitan; brindando un amplio panorama sobre el microorganismo en estudio (Sánchez, 2004).

A pesar, de la importancia y aplicabilidad de estas técnicas; hoy en día, son consideradas como métodos de taxonomía clásica y tradicional (Gobernado y López, 2003). En la última década, la aplicación de técnicas moleculares en complemento a las técnicas microbiológicas ha representado un gran avance en la identificación de todo tipo de microorganismo, contribuyendo un amplio conocimiento sobre la interacción de las comunidades microbianas con el medio que les rodea (Nogales, 2005).

Esta investigación pretende obtener una identificación taxonómica de todas las cepas bacterianas del INIAP que fueron aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz de la Sierra ecuatoriana, mediante la aplicación de técnicas microbiológicas y moleculares, para garantizar que pertenecen al género *Azospirillum*. Además, pretende evaluarlas funcionalmente mediante el efecto de inoculación de cada una de los aislados sobre plantas de maíz a condiciones *in vitro* e invernadero, para dar a conocer las mejores cepas promotoras del crecimiento y sentar bases para el desarrollo de una aplicación tecnológica para el cultivo de maíz.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

Caracterizar bioquímica, molecular y funcionalmente las cepas de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la Sierra ecuatoriana.

1.3.2. Objetivos Específicos

- a. Caracterizar mediante pruebas microbiológicas que las cepas del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) pertenecen al género *Azospirillum*.
- b. Caracterizar mediante técnicas moleculares el género y especie de las cepas de *Azospirillum* del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la sierra ecuatoriana.
- c. Evaluar funcionalmente las cepas de *Azospirillum* mediante el efecto de inoculación sobre semillas pre-germinadas de maíz de la variedad INIAP-101 a condiciones *in vitro*.
- d. Evaluar funcionalmente las cepas de *Azospirillum* mediante el efecto de inoculación sobre plantas de maíz de la variedad INIAP-101 en condiciones de invernadero.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. EL MAÍZ (*Zea mays* L.)

1.4.1.1. Clasificación taxonómica

El maíz taxonómicamente pertenece a:

Dominio:	Plantae
División:	Magnoliophyta (Angiospermae)
Clase:	Liliopsida (Monocothyledoneae)
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Zea</i>
Especie:	<i>mays</i>
Nombre científico:	<i>Zea mays</i> L.

(Silva, 2005).

1.4.1.2. Descripción biológica

El maíz es una planta monocotiledonea robusta y de crecimiento anual; su tallo es semejante a una caña, erguido, de elevada longitud alcanzando alturas de uno a cinco metros y con pocas ramificaciones. Sus hojas crecen a partir de los nudos de manera alterna a lo largo del tallo y se encuentran sujetas al mismo mediante la vaina que envuelve el entrenudo y cubre la yema floral (Kato, 2009).

Las raíces primarias son fibrosas presentando raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, ambas tienen la misión de mantener a la planta recta (Jugenheimer, 1988; citado por Kato, 2009).

Es una especie monoica, es decir, tiene la inflorescencia femenina (mazorca) y la masculina (espiga) separadas y bien diferenciadas en la misma planta. La polinización es abierta (anemófila), la cual ocurre con la transferencia del polen desde la espiga a los estigmas de la mazorca. Cerca del 95% de los óvulos son fecundados con polen de otra planta y un 5% con el mismo polen, a pesar de que las plantas sean auto compatibles,

esto se debe a que, el polen viaja de 100 a 1000 metros dependiendo exclusivamente del viento (Sánchez, 2009).

La inflorescencia femenina fecundada desarrolla el grano o semilla que es un fruto independiente llamado cariósipide (Kato *et al.*, 2009). Cada grano está constituido de tres partes principales:

- (1) La envoltura o pericarpio que es la piel externa del grano, que sirve como elemento protector del mismo; representa en promedio el 6% del peso del grano, predominando en ella la fibra (Asturias, 2004).
- (2) El germen o embrión, que es el que dará origen a la planta en sí, contiene energía en forma de aceites, proteínas y minerales necesarias durante el proceso de germinación y desarrollo de la planta; representa el 12% del peso total del grano (Asturias, 2004).
- (3) El endospermo es la reserva energética del grano y ocupa hasta el 80% de su peso; contiene aproximadamente el 90% de almidón y el 9% de proteína, pequeñas cantidades de aceites, minerales y elementos traza (Asturias, 2004).

Las variaciones en la estructura y composición del endospermo han permitido clasificar al maíz en varios grupos agrícolas mencionados en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Clasificación del maíz de acuerdo a la estructura y composición del endospermo.

GRUPO	NOMBRE COMÚN	DESCRIPCIÓN
<i>Z. mays indentata</i>	Maíz dentado	Grano de textura dentada. Constituye el 75% de la producción mundial en los países desarrollados.
<i>Z. mays indurata</i>	Maíz duro	Endospermo duro. Constituye el 15% de la producción mundial y es usado para la elaboración de harinas.
<i>Z. mays amylaces</i>	Maíz harinoso	Grano grande y blando. Consumido como alimento. Representa entre 10 a 12% de la producción mundial
<i>Z. mays ceritina</i>	Maíz ceroso	El endospermo contiene solo amilo pectina dándole una consistencia cerosa. Importancia limitada
<i>Z. mays everata</i>	Maíz reventón	Semillas de cubierta gruesa, con endospermo reventón (pop corn). Ocupa menos del 1% del área mundial
<i>Z. mays saccharata</i>	Maíz dulce	El endospermo es dulce. Ocupa menos de 1% del área mundial.
<i>Z. mays tunicata</i>	Maíz tunicado	Los granos están encerrados dentro de vainas. No tiene aplicación agrícola pero es importante dentro de los progenitores ancestrales del maíz

Fuente: Silva, 2005.

1.4.1.3. Características generales del cultivo

El maíz posee un rango de condiciones ambientales muy amplias para su cultivo, se lo puede cultivar desde el nivel del mar hasta cerca de los 4000 metros de altitud, en climas cálidos o fríos y con ciclos vegetativos con rangos entre 3 y 13 meses (Silva, 2005); en regiones de precipitación pluvial desde los 400 mm hasta los 3000 mm y en una extensa variedad de suelos (Kato *et al.*, 2009).

A pesar de la adaptabilidad del cultivo, una de las exigencias del mismo es el agua. Las necesidades hídricas varían a lo largo de su crecimiento; se requiere menos cantidad de agua cuando la semilla germina en comparación a la fase del crecimiento vegetativo que requiere mayor cantidad de agua (Kato *et al.*, 2009).

La fase de floración es el periodo más exigente en cuanto al agua debido a que, de ella depende el desarrollo, la polinización y el llenado de los granos, influyendo así en el rendimiento de los mismos (Reyes, 1990 citado por Kato *et al.*, 2009).

1.4.1.4. Situación del cultivo de maíz en el Ecuador

El maíz es uno de los cereales más cultivados en el Ecuador y de gran importancia, debido a la cantidad de superficie destinada para su cultivo; además, favorece la seguridad alimentaria de la población ecuatoriana y el consumo animal a través de balanceados (INEC y ESPAC, 2009).

La superficie sembrada difiere cada año debido a las variaciones climáticas, plagas, tecnología empleada (suelos), la mano de obra y a la rentabilidad del cultivo por temporada (MAGAP, 2009). A pesar de esto, el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca reporta que en el año 2005 la superficie sembrada con maíz fue de 283 mil hectáreas, mientras que en el 2008 se sembraron alrededor de 308 mil hectáreas (MAGAP, 2009).

La producción nacional de maíz según el INEC y ESPAC (2009) es en promedio de 717940 toneladas de maíz duro seco y 43284 toneladas de maíz suave seco. La producción y comercialización es realizada por pequeños y medianos productores (INIAP, 2008). Los maíces de mayor producción son del tipo harinosos, semiduros y duros representados en 29 razas (formas nativas en las que se encuentra el maíz), de las cuales 17 corresponden a maíces pertenecientes a la sierra ecuatoriana (Yáñez, 2010).

La riqueza genética de la Sierra ecuatoriana ha permitido que establecimientos como INIAP genere variedades de maíz de altura mejoradas (Yáñez, 2007). Las variedades corresponden a una raza tratada genéticamente para resistir plagas y aumentar su producción agrícola (Yáñez, 2007).

La sierra ecuatoriana cuenta con ocho variedades certificadas por el Programa de Maíz del INIAP descritos en la Cuadro 1.2:

Cuadro 1.2. Variedades de maíz de la sierra ecuatoriana certificadas por el INIAP

VARIEDAD	CÓDIGO	CARACTERÍSTICA	ZONA DE CULTIVO	PRODUCCIÓN ANUAL (Ha)
Maíz blanco precoz	I - 101	Blanco harinoso	Entre 2400 y 3000 msnm	ND
Blanco blandito mejorado	I - 102	Blanco harinoso	Chimborazo	25.000
Guagal Mejorado	I - 111	Blanco harinoso	Bolívar	23.000
Chaucho mejorado	I - 122	Amarillo, Harinoso	Imbabura	20.000
Mishca Mejorado	I - 124	Amarillo, harinoso	Pichincha, Cotopaxi y Tungurahua	56.000
Chulpi Mejorado	I -192	Chulpi	Entre 2400 y 2800 msnm	ND
Morocho blanco	I-160	Morocho, Blanco	Imbabura, Pichincha y Chimborazo	ND
INIAP 180	I-180	Morochillo	Entre 2400 y 2800 msnm	ND

Fuente: INIAP, 2007

1.4.2. VARIEDAD DE MAÍZ: INIAP - 101

1.4.2.1. Origen y zonificación

I-101 fue desarrollada por el Programa de Maíz de la EESC del INIAP, en los años 1971 a 1979. Su progenitor es la variedad “Cacahuazintle” de México. El material original fue enviado del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) ubicado en México y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (Silva *et al.*, 1997). La zonificación de la variedad es en los valles centrales de la región sierra, en altitudes comprendidas entre los 2400 a 3000 msnm (Yáñez *et al.*, 2003).

1.4.2.2. Características agronómicas.

Las características de la variedad I -101 se describen en el Cuadro 1.3:

Cuadro 1.3. Características agronómicas del maíz INIAP-101

CARACTERÍSTICAS	PROMEDIO
Floración femenina (días)	92
Altura de la planta (cm)	195
Altura de la mazorca (cm)	94
Porcentaje de desgrane	79
Peso de 100 semillas (g)	74
Días a la cosecha en choclo	125
Días a la cosecha en seco	205
Rendimiento en grano seco (t/ha)	4,0
Rendimiento comercial de choclos (sacos/ha) ¹	215

Fuente: Yáñez *et al.*, 2003.

^{1/}Sacos de 140 choclos de 1er y 2da clase.

Además posee buen rendimiento, precocidad, grano blanco textura harinosa y de buena calidad, mazorca grande y resistencia al acame (Yáñez *et al.*, 2003).

1.4.2.3. Características de calidad y usos

Las características de calidad para la variedad I – 101 se nombran en el Cuadro

Cuadro 1.4. Características de calidad de la variedad INIAP-101

RUBRO	PORCENTAJE (%)
Humedad	7,63
Proteína	6,39
Almidón	74,24

Fuente: Caviedes *et al.*, 2002.

Esta variedad de maíz es muy cotizada en estado fresco (choclo) y es apreciada para la elaboración de tostado, mote, chicha, humitas, tortillas, harina, etc.; además, la planta es utilizada como forraje para la alimentación de ganado vacuno y especies menores, o como abono incorporándole al suelo (Caviedes *et al.*, 2002).

1.4.2.4. Manejo agronómico del cultivo de la variedad I-101

La época de siembra va desde Septiembre hasta mediados de Noviembre, dependiendo de la localidad y de la disponibilidad de agua de riego o el régimen de lluvias (Noroña, 2008). El suelo se prepara con dos meses de anticipación para facilitar la descomposición de residuos (Noroña, 2008). Las distancias de siembra sugeridas

técnicamente son: en cultivo solo a 80 cm. entre surcos y a 50 cm. entre sitios con dos semillas por sitio (50000 plantas/ha). La cantidad de semilla de maíz INIAP-101 requerida para la siembra es de 30 Kg/ha (Silva *et al.*, 1997).

Antes de fertilizar el cultivo es necesario realizar un análisis químico del suelo. La variedad I-101 es eficiente en el aprovechamiento de nutrientes del suelo por lo que necesita dosis bajas de fertilización. Para suelos bajos en nitrógeno (< de 25 ppm.) y fósforo (< de 10 ppm.), sugiere aplicar una dosis de 80 kg/ha. de N y 90 kg/ha de P₂O₅, la cual se puede alcanzar con la aplicación de cuatro sacos de 45 kg de 18-46-00 a la siembra y dos sacos de urea al aporque (45 días después de la siembra) (Yáñez *et al.*, 2003).

En cuanto, a los herbicidas deben aplicarse inmediatamente después de la siembra, sobre suelo húmedo (Yáñez *et al.*, 2003). Si existe una alta presencia de malezas se recomienda aplicar herbicidas selectivos (Caviedes *et al.*, 2002).

Para el control de plagas como: el gusano trozador (*Agrotis ipsilon*) se recomienda aplicar a la base del tallo insecticidas como Thiodan (Endosulfán) en dosis de 2L/ha o Orthene (Acephate) 0,8 Kg/ha (Silva *et al.*, 1997). Para los gusanos de la mazorca (*Heliothis zea* y *Euxesta eluta*), se recomienda la aplicación de aceite comestible de origen vegetal en tres aplicaciones. La cantidad de aceite a usar es de 3 a 4 L/ha por aplicación (Dobronski *et al.*, 1999).

La cosecha para choclo se efectúa cuando el grano está en estado “lechoso”, en semilla al momento de la madurez fisiológica (base del grano con capa negra) y en grano comercial se puede esperar entre 20 a 30 días más en el campo después de la madurez fisiológica (Silva *et al.*, 1997). Para el almacenamiento de mazorcas, grano comercial o semilla, deberán secarse completamente y colocarlas en lugares frescos, secos y libres de gorgojo (Caviedes *et al.*, 2002).

1.4.3. RIZÓSFERA Y RIZOBACTERIAS

1.4.3.1. La rizósfera

La rizósfera está comprendida por el espacio físico circundante a las raíces de las plantas con el suelo. Aquí se encuentra tanto bacterias como hongos endo o ectomicorrícicos que poseen una interacción biológica directa con las raíces, brindando efectos benéficos de estimulación al crecimiento vegetal mejorando las condiciones para su desarrollo o simplemente causando efectos patógenos en las mismas. (Sorensen, 1997).

En los últimos años, la rizósfera ha sido objeto de interés científico por ser un hábitat donde se desarrollan un sin número de procesos biológicos, importantes tanto para los microorganismos como para las plantas. Uno de los ejemplos más conocido es la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* que forman los muy conocidos nódulos, una nueva estructura vegetal bien organizada y funcionalmente regulada (Ferrera-Cerrato, 1995).

1.4.3.2. Rizobacterias

Las bacterias que colonizan la rizósfera son llamadas rizobacterias (Schroth y Hancock, 1982). Estas pueden ser de vida libre o asociativa, aeróbicas, anaeróbicas o anaeróbicas facultativas (Rodríguez - Mendoza, 1995). Las raíces producen ciertos exudados que determinan el tipo de bacteria que podrá colonizarlas (Kunc y Macura, 1988).

Bolton *et al.* (1993) indica que la exudación de las raíces es un medio que ayuda a estimular la actividad bacteriana. Aunque, en ciertas ocasiones algunas rizobacterias producen lo contrario, ellas estimulan la exudación de las raíces de una manera específica según la especie; por ejemplo, los metabolitos producidos por *Pseudomona aeruginosa* estimulan el exudado de las raíces de varios cereales (Merharg y Killham, 1995).

Generalmente, se emplean técnicas de aislamiento en medios de cultivo y tinción para la detección de rizobacterias, los cuales han permitido aislar géneros bacterianos como: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Clostridium*,

Enterobacter, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter*, *Nitrobacter*, *Nitrosomas*, entre otras (INIFAP, 2008). Pero, la diversidad bacteriana es tan amplia que no se cuenta con las técnicas de cultivos para todas, ni investigaciones que indiquen específicamente las condiciones adecuadas para aislarlas a partir del suelo; por lo que una fracción significativa de bacterias no pueden ser cultivadas *in vitro* (INIFAP, 2008).

Por otro lado, las rizobacterias pueden tener dos tipos de efectos sobre las plantas: perjudiciales, como las rizobacterias deletéreas que inhiben el crecimiento vegetal; y benéficos como las rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) (Suslow y Schoroth, 1982).

Las vías por las cuales las PGPR pueden afectar el crecimiento de las plantas son: directa o indirectamente. La forma directa es a través de la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de minerales (fósforo), producción de sideróforos o la producción de reguladores de crecimiento (fitohormonas) que aumentan el desarrollo de las plantas en varias etapas de su crecimiento (Glick, 1995).

Indirectamente, la promoción del crecimiento ocurre cuando las PGPR mejoran las condiciones limitantes del crecimiento por la producción de sustancias antagónicas o por la inducción de resistencia a patógenos (Glick, 1995). Dentro de las rizobacterias de mayor estudio en la actualidad, son aquellas que aportan con la producción de reguladores de crecimiento y que se destacan por su potencial adicional para fijar el nitrógeno atmosférico (diazotróficos) (Rodríguez-Mendoza, 1995).

Los géneros bacterianos diazotróficos son: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Dexia*, *Pseudomonas* y *Clostridium*; los cuales, reportan valores de fijación de N que oscilan entre los 3 a 100 kg/ha/año. Son aislados de cultivos vegetales como: caña de azúcar, maíz, arroz, trigo, sorgo, tabaco, algunos frutales, tubérculos y hortalizas (INIFAP, 2008). La cantidad de nitrógeno fijada por estos géneros se considera baja, debido a que existe la asociación *Rhizobium*-leguminosa la cual puede llegar a fijar hasta 700 kg/ha/ de nitrógeno al año (Rodríguez-Mendoza, 1995).

1.4.4. GÉNERO *AZOSPIRILLUM*

1.4.4.1. Historia

El primer científico que inició los estudios en el género *Azospirillum* fue Martinus Willem Beijerinck, quien lo clasificó como *Spirillum lipoferum* en 1925. En 1973, Juan José Peña - Cabriales y Johanna Döbereiner iniciaron diferentes investigaciones para finalmente en 1978 reclasificar al género, junto con Tarrand y Krieg, basados en estudios de homología del ADN describiendo al nuevo género como: *Azospirillum*, con dos especies representativas: *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* (Tarrand *et al.*, 1979).

1.4.4.2. Clasificación taxonómica

Taxonómicamente según la novena edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Holt *et al.*, 1994) *Azospirillum* pertenece a:

Dominio:	Bacteria
División:	Proteobacterias
Clase:	Alphaproteobacterias
Orden:	Rhodospirillales
Familia:	Rhodospirillaceae
Género:	<i>Azospirillum</i>
Especies:	<i>A. lipoferum</i> , <i>A. brasilense</i> , <i>A. amazonense</i> , <i>A. halopraeferans</i> , <i>A. irakense</i> , <i>A. largimobile</i> , <i>A. doebereineriae</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. melinis</i> , <i>A. zaeae</i> , <i>A. canadense</i> y <i>A. rugosum</i> .

1.4.4.3. Características generales

Son bacterias gram-negativas, con forma celular de bacilos ligeramente curvados, presentan un diámetro de 1,0 µm x 2,1-3,8 µm. Poseen movilidad en espiral (parecido a un saca corchos) debido a la presencia de flagelos y contienen cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta el 50% del peso seco celular (Figura 1.1) (Okon *et al.*, 1976). Presentan la capacidad de fijar nitrógeno manifestándolo al

crecer en forma de un velo blanquecino bajo la superficie del medio de cultivo semisólido NFB (medio libre de nitrógeno) (Döbereiner *et al.*, 1976).

Son parte del grupo de diazotróficas asociativas que contribuyen al crecimiento de la planta sin la formación de estructuras diferenciadas y no establecen simbiosis. Crecen a pH de 6,8 - 7.0 y temperaturas entre 30-35°C (Marín *et al.*, 1999).

Son catalasa y oxidasa positivas, fijan el nitrógeno en condiciones microaerofilicas, reducen nitratos a nitritos, no degradan la lactosa pero si la urea convirtiéndola en dos moléculas de amoníaco mediante la enzima ureasa, siendo positivo para esta prueba; presentan resultados negativos para las pruebas de indol y sulfatos diferenciándoles de las enterobacterias (Marín *et al.*, 1999). A nivel morfológico, presentan la característica de que sus colonias crecen de color rojo escarlata en el medio agar Acido Málico- Rojo Congo (Figura 1.1) (Krieg y Döbereiner, 1984).

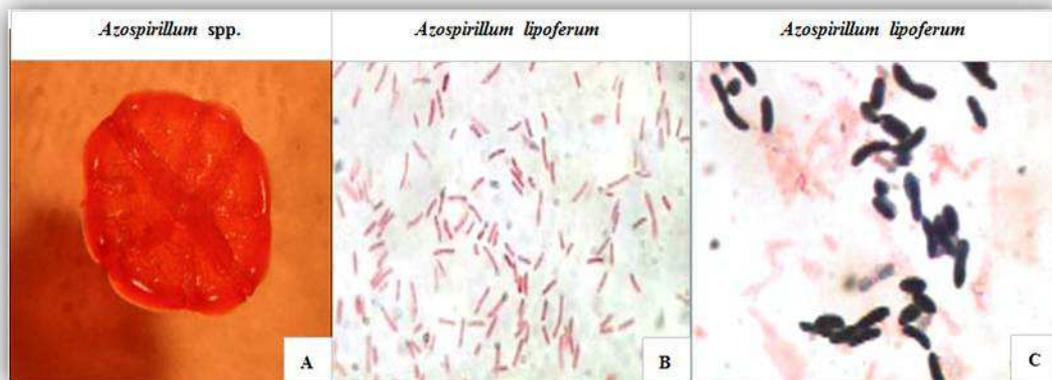


Figura 1.1. Características macro y microscópicas para *Azospirillum*. A. Vista macroscópica de la morfología de colonia de *Azospirillum* al crecer en el medio de cultivo Acido málico- rojo Congo. B. Tinción Gram y forma celular de *Azospirillum*. C. Vista microscópica de la tinción del polímero β -Polihidroxi butirato. Fuente: Hernández (2003).

El resumen de las características morfológicas y metabólicas mencionadas se encuentran reportadas en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner para el género en estudio y descritas en el cuadro 1.5.

Cuadro 1.5. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Azospirillum* spp.

PRUEBA BIOQUIMICA	RESULTADO PARA <i>Azospirillum</i> spp.
Tinción Gram	Gram (-)
Forma Celular	Bacilos ligeramente curvados o rectos.
Catalasa	+
Oxidasa	+
Ureasa	+
Sulfatos	-
Indol	-
Lactosa	-
Motilidad	+ de forma espiral.
Reducción de nitratos	+
Tinción del polímero β - Polihidroxibutirato	+
Crecimiento en el medio NFB semisólido	Presencia de un velo espeso de color blanco, entre 0,5 y 1,5 cm bajo la superficie y cambio del color del medio de verde a azul.
Morfología de colonias en Agar AM- RC	Las colonias poseen forma: circular ovoide con paredes gruesas similares a quistes; superficie: rugosa y brillante; de bordes ondulados; consistencia: cremosa; y adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante rojo Congo.

Fuente: Krieg y Döbereiner (1984), Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática.

Azospirillum cuenta con varias especies dentro del género, siendo las más estudiadas: *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*. Krieg y Döbereiner (1984) reportan pruebas diferenciales a nivel de especies, que consisten en el uso de de ciertas fuentes de carbono como citrato y glucosa; además, de la morfología de colonia desarrollada en el medio de cultivo tales como: BMS (Medio infusión de papa) que es característico para cada especie (Cuadro 1.6).

Cuadro 1.6. Pruebas bioquímicas diferenciales a nivel de especies del género *Azospirillum*

PRUEBA	RESULTADOS		
	<i>A. brasilense</i>	<i>A. lipoferum</i>	<i>A. amazonense</i>
Citrato como única fuente de carbono	+	+	-
Glucosa como única fuente de carbono	-	+	+
Crecimiento en Medio agar BMS	colonias rosadas, convexas y rugosas	colonias rosadas, convexas y rugosas	colonias blancas y planas

Fuente: Krieg y Döbereiner (1984).

Por otra parte, *Azospirillum* posee la capacidad de producir auxinas, citoquininas y giberelinas en medios de cultivo a nivel de laboratorio (Caballero, 2001). El mecanismo más analizado ha sido la producción de auxinas, que puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas. En el caso del Ácido Indol Acético (AIA) induce el aumento de pelos radiculares, logrando una mayor captación de nutrientes (Caballero, 2001). Secretan vitaminas como tiamina, niacina, ácido pantoténico y degradan contaminantes en aguas residuales (Peralta - Díaz, 2007).

1.4.4.4. Aislamiento e identificación

Azospirillum ha sido aislado de la rizósfera de plantas, como: maíz, trigo, cebada, arroz, caña de azúcar, banano, café y pastos forrajeros (Sundaram *et al.*, 1988). El medio de cultivo microbiológico utilizado universalmente para obtener un crecimiento óptimo de este género bacteriano corresponde al NFB (medio libre de nitrógeno) semisólido utilizando malato como fuente de carbono (Döbereiner *et al.*, 1976).

Azospirillum en el medio NFB presenta un crecimiento característico como un velo delgado a varios milímetros bajo la superficie, en el punto donde la concentración de O₂ en el medio está en equilibrio con la tasa respiratoria de las células (Hernández, 2003). Conforme las bacterias se multiplican en el medio se puede observar también un viraje del indicador de pH azul de bromotimol del color verde (pH 6,8) hacia el color azul (pH >7), debido a la alcalinización del medio causada por la oxidación del malato (Döbereiner *et al.*, 1976).

Las bacterias después de ser cultivadas en el medio NFB, se siembran en el agar selectivo denominado ácido málico - rojo Congo (AM-RC), en el cual las colonias presentan características fenotípicas que se usan como criterio para reconocer tentativamente a *Azospirillum* (Caballero, 2001). Las colonias adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por la absorción del rojo Congo, son de consistencia seca y abundante crecimiento (Rodríguez y Cáceres, 1982), y cuando poseen 48 horas de incubación se presentan colonias de forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes (Figura 1.1) (Döbereiner *et al.*, 1976).

A parte de las técnicas bioquímicas de identificación, tenemos las inmunológicas como: la aglutinación en tubo, técnicas de precipitación en capilar, inmunolectroforesis, inmunofluorescencia e inmunodifusión (Ladha *et al.*, 1982). La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permite la identificación específica de cepas de *Azospirillum*, como se demostró con la cepa *A. brasilense* Cd permitiendo evaluar la capacidad de colonización de esta cepa en plantas inoculadas (Levanony *et al.*, 1987).

La identificación a nivel de género y especies de *Azospirillum* se realiza con técnicas genotípicas; para ello, se usan sondas basadas en secuencias de los genes del ARN ribosomal (Levanony *et al.*, 1987). Con oligonucleótidos específicos se identifican las especies: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* y *A. irakense*, mediante la técnica tipo “dot blot” (Kirchhof y Hartmann, 1992).

Alternativamente, la identificación de especies de *Azospirillum* como *A. brasilense* y *A. lipoferum*, según Pedraza y Díaz (2000), se logra en forma reproducible amplificando mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los genes 16Sr, usando las secuencias de los oligonucleótidos 27f (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA) para posteriormente restringir los productos amplificados con la enzima de restricción *Alu* I. Con esta estrategia se obtienen fragmentos de tamaños específicos para las dos especies de *Azospirillum*, distinguibles fácilmente en geles de agarosa, como se observa en la figura 1.2.

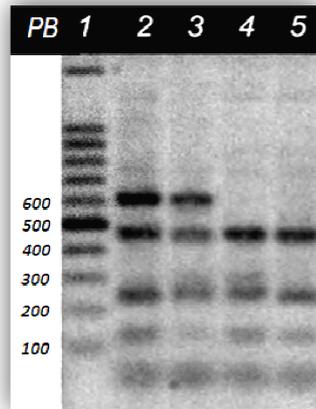


Figura 1.2. Restricción enzimática del gen 16S ADNr con la enzima *AluI* de dos especies del género *Azospirillum*. De izquierda a derecha: Carril1: Marcador molecular 100bp PROMEGA. Carril 2: *A. brasilense* sp7 (ATCC-29145). Carril 3: *Azospirillum brasilense* Cd. Carril 4: *A. lipoferum* sp59. Carril 5: *A. lipoferum* BR11086. Fuente: Pedraza y Díaz (2000).

1.4.4.5. Asociación *Azospirillum* - planta

Azospirillum establece asociaciones con las raíces de las gramíneas sin la formación de estructuras visibles que indiquen que la planta se encuentra infectada (Umali-García *et al.*, 1984). Debido a la ausencia de estructuras especializadas y de proteínas como la leghemoglobina, la fijación de nitrógeno en esta asociación es muy variable y depende de factores ambientales y climáticos, sin embargo esta relación parece ser lo suficientemente estrecha para sugerir que se trata de un tipo primitivo de simbiosis (Tarrand *et al.*, 1979).

Azospirillum vive libremente en el suelo y su concentración es mayor en la rizósfera donde se adsorbe al mucílago de la superficie radical, principalmente en los pelos radicales (Döbereiner, 1995). La infección inicia cuando la bacteria entra por pelos radicales lisados y por la emergencia de raíces laterales, para luego extenderse hacia las raíces principales (Tarrand *et al.*, 1979). Se cree que esta característica invasiva se debe a la producción de pectinliasa y endopoligalacturonasa por parte de la bacteria, enzimas que deshidratan la pectina que mantiene unidas las paredes celulares en los tejidos radicales (Umali-García *et al.*, 1984).

Azospirillum ha sido observado mediante microcopia electrónica en los espacios intercelulares dentro de los tejidos radicales, así como intracelularmente en células muertas (Umali-García *et al.*, 1984). Puede habitar diferentes zonas de la raíz, como en el córtex (interno y externo) y la estela de las raíces del maíz (Krieg y Döbereiner, 1984).

1.4.4.6. Mecanismos de acción de *Azospirillum* sobre el crecimiento vegetal

Uno de los mecanismos de acción es la fijación biológica de Nitrógeno (Caballero, 2001). En estudios de inoculación con *Azospirillum*, se observó incrementos en el contenido de N total de las plantas inoculadas y un mejor crecimiento del sistema radical con respecto a las plantas testigo sin inocular (Baldani *et al.*, 1983).

Al contrario, en otros estudios no fueron observadas diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno o en el contenido de proteína entre plantas inoculadas y no inoculadas, razón que contribuyó a cuestionar la idea de que la fijación biológica de nitrógeno fuera el mecanismo único y principal responsable de los efectos benéficos observados (Holguín *et al.*, 1996).

Investigaciones posteriores indicaron que *Azospirillum* también posee la capacidad de producir auxinas, citocininas y giberelinas en medios de cultivo a nivel de laboratorio. El mecanismo más analizado es la producción de auxinas, especialmente la del ácido indol acético (AIA) (Caballero, 2001).

El AIA producido por la bacteria puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Caballero, 2001). Además de AIA, se han encontrado otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como: el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no identificados, que son los responsables de estimular el aumento de la masa celular vegetal y por ende el crecimiento de las plantas (Hartmann *et al.*, 1983).

A pesar de que existe la evidencia de atribuir a las fitohormonas, especialmente al AIA, los efectos benéficos de la inoculación con *Azospirillum* también existe la

propuesta de que tales beneficios son el resultado de otros mecanismos como: la alteración del funcionamiento de moléculas de comunicación celular que son de bajo peso molecular y pueden ser las responsables de alterar actividades y funciones de la membrana relacionadas con la absorción de iones; además, la interacción de todos los mecanismos en conjunto (Bashan y Levanony, 1990).

Con estas investigaciones queda demostrado que *Azospirillum*, en la mayoría de los casos, alteran la proporción brotes/raíces (peso seco), por lo que la bacteria ejerce un efecto multiparamétrico sobre las plantas inoculadas (Holguín *et al.*, 1996)

1.4.4.7. Utilización de *Azospirillum* como biofertilizante

Los biofertilizantes pueden definirse como productos a base de microorganismos que viven normalmente en el suelo y que al incrementar sus poblaciones, por medio de la inoculación artificial, son capaces de poner a disposición de las plantas una parte importante de los nutrientes que necesitan para su desarrollo, suministrando sustancias promotoras del crecimiento (Martínez *et al.*, 1999).

La importancia de los biofertilizantes radica en su capacidad para suplementar o movilizar nutrientes con un mínimo uso de recursos no renovables; además, tiene la ventaja de que los procesos microbianos son rápidos y pueden aplicarse en pequeñas unidades para solucionar problemas locales específicos (Martínez *et al.*, 1999).

Según Okon y Kapulnik (1986) en experimentos de campo la inoculación con *Azospirillum* ha promovido el crecimiento de plantas de importancia agronómica en un 10-20% en la producción de materia seca. Sin embargo, este efecto puede ser benéfico en algunos casos o no significativo en otros (Saíto y Graciolli, 1981).

Motsara *et al.* (1995), en cambio, asegura que en cultivos como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar, *Azospirillum* puede incrementar el rendimiento entre el 15 y el 30%. En Cuba se han utilizado biofertilizantes a base de *Azospirillum* que permiten la sustitución del 25% del fertilizante nitrogenado en arroz e incrementan el rendimiento entre el 5 y el 15% (Martínez *et al.*, 1999). En caña de azúcar la aplicación de biopreparados a base de *Azospirillum* ha producido incrementos en los rendimientos del

17 al 50%, y ha permitido ahorrar entre 50 y 100% del fertilizante nitrogenado (The Latin American Alliance, 1997).

La obtención de incrementos de hasta el 20% en promedio del rendimiento de los cultivos se considera comercialmente muy valiosa para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes (Martínez *et al.*, 1999). Hoy en día, la información disponible de aplicación en campo de *Azospirillum* aun es considerada insuficiente como para comercializarlo como biofertilizante (Holguín *et al.*, 1996). Por ahora, solo existen preparados comerciales de *Azospirillum* disponibles en el mercado y se han reportado muy pocos resultados negativos o nulos por efecto de la inoculación (Holguín *et al.*, 1996).

A pesar de todo, para estandarizar y comercializar un biofertilizante hay que tomar en cuenta los factores que contribuyen a la respuesta de la planta con la bacteria como: el nivel óptimo de células a inocular, la variedad de la planta cultivada ya que cada cultivo responde distinto a la inoculación y el nivel de fertilización con nitrógeno (Holguín *et al.*, 1996). Conocer la participación de cada uno de estos factores permitiría el desarrollo de técnicas de inoculación más efectivas y por lo tanto el desarrollo de biofertilizantes netamente comerciales (Bashan y Levanony, 1990).

1.4.5. MICROBIOLOGÍA

1.4.5.1. Identificación de microorganismos bacterianos

La identificación o caracterización comprende un conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un grupo, específicamente, bacteriano. Estas técnicas se utilizan en diferentes áreas como son: el área clínica, farmacéutica, cosmética, de alimentos y en la investigación básica (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002)

1.4.5.2. Métodos de identificación

Existen seis métodos aplicables para la identificación bacteriana, basados en diferentes criterios, como:

- Métodos morfológicos
- Métodos de tinción diferencial
- Métodos bioquímicos
- Métodos serológicos
- Métodos moleculares.

En la actualidad, la identificación ya no se realiza con un solo método, sino se realiza combinando dos o varios métodos para tener una caracterización más precisa y confiable del grupo bacteriano de interés (Prescott, 2004)

1.4.5.2.1. Métodos morfológicos

Las bacterias aisladas generalmente se conservan en medios de cultivo microbiológicos. El desarrollo de colonias sobre superficies de agar permite identificar al grupo bacteriano, porque este genera colonias con una forma específica y un aspecto característico (Figura 1.3); para posteriormente obtener un cultivo puro del mismo (Prescott, 2004).

La estructura microscópica de las colonias es muy variable; es decir, que estas colonias bacterianas que se ven tan parecidas bajo un microscopio, pueden diferir en propiedades de tinción, bioquímicas, fisiológicas y/o serológicas (Prescott, 2004). A pesar de esto, el método sigue siendo útil en todos los casos, como es el caso para visualizar la presencia de endosporas e identificar bacilos esporulados (Prescott, 2004).



Figura 1.3. Criterios morfológicos para describir colonias bacterianas según su: forma, elevación y borde. Fuente: Prescott (2004).

1.4.5.2.2. Métodos de tinción diferencial

Aunque las colonias bacterianas se observen a simple vista, a menudo hay que tomar una porción de ellas para fijarlas, teñirlas y observarlas en un microscopio óptico aumentadas y acentuadas sus características morfológicas celulares (Tortora *et al.*, 2007).

La fijación es el proceso por el cual se fijan, mediante calor o agentes químicos, las estructuras internas y externas de las células; generalmente, en una placa portaobjetos se inactivan enzimas que alteran la morfología celular y endurece las estructuras celulares de manera que no cambian durante la tinción ni la observación (Prescott, 2004).

Por otro lado, la tinción comprende técnicas que permiten observar las formas celulares bacterianas (Figura 1.4) en función de la capacidad de las mismas para retener o no determinados colorantes, lo que depende de la carga de la célula y del colorante (Tortora *et al.*, 2007).

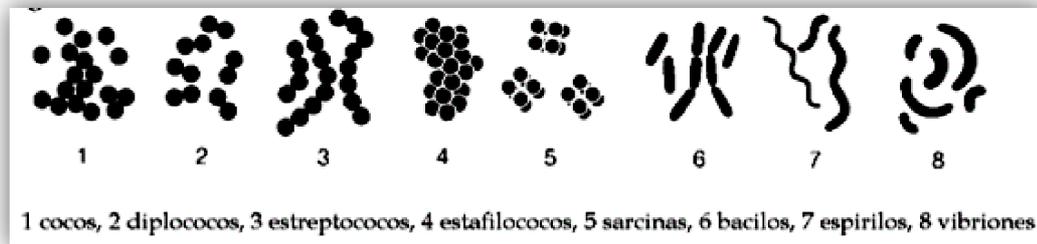


Figura 1.4. Formas celulares bacterianas. Fuente: Prescott (2004).

Los colorantes pueden ser de distintos tipos:

- **Catiónicos:** Son colorantes que poseen carga (+). Estas penetran en el interior de las células y las tiñen. Ej.: azul de metileno, cristal violeta y safranina.
- **Aniónicos:** Son colorantes de carga (-). No penetran en el interior celular, de modo que no tiñen las células, sino el entorno. Ejemplo: eosina y nigrosina.

- **Liposolubles:** Se unen a los lípidos celulares y los tiñen. Ejemplo: negro Sudán.

Las tinciones pueden ser:

- **Simples:** Utiliza un solo colorante. El colorante tiñe las células (azul de metileno, safranina) o no (nigrosina).
- **Diferenciales:** Se basan en que existen distintos tipos de células y cada una posee una composición química diferente, por lo que reaccionan de forma única frente a una tinción y esto permite clasificar a los microorganismos en varios grupos. Dos tinciones de importancia taxonómica están registradas: tinción Gram y la de ácido - alcohol resistencia (de Ziehl-Neelsen). Estas tinciones utilizan más de un colorante.
- **Selectivas:** Distintas estructuras celulares tienen su composición química propia, de modo que se tiñen selectivamente con ciertos colorantes. Ej.: tinción de esporas, flagelos, paredes celulares. En ocasiones se utilizan uno o más colorantes (Tortora *et al.*, 2007).

1.4.5.2.3. Métodos bioquímicos

Las pruebas bioquímicas se fundamentan en definir si el microorganismo es capaz de: fermentar azúcares, si posee determinadas enzimas, degrada compuestos, produce pigmentaciones, etc.; es decir, nos da a conocer todo lo relacionado con su metabolismo celular específico, mediante el empleo de medios de cultivos especializados para ello (Tortora *et al.*, 2007).

El uso de pruebas bioquímicas pueden separar bacterias fuertemente relacionadas en dos especies diferentes (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002). Actualmente, se encuentra en vigencia el uso de sistemas miniaturizados de pruebas bioquímicas o pruebas API (Tortora *et al.*, 2007). Estas herramientas fueron elaboradas, en un

principio, para bacterias de importancia médica como las enterobacterias; sin embargo, actualmente se ha extendido para la mayoría de géneros bacterianos.

Los sistemas API se diseñaron para realizar varias pruebas bioquímicas a la vez y realizar la identificación en un tiempo más corto. Cada uno de los ensayos, consta de tubos miniatura que contienen el medio de cultivo deshidratado y que se hidratan al inocularlos con la suspensión bacteriana pura (Figura 1.5). Las pruebas se clasifican por grupos y a cada uno de los resultados positivos se les asigna un determinado valor numérico, obteniéndose un código que corresponderá a género o especie específica registrada en la base de datos de las prueba API (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002).



Figura 1.5. Pruebas API o tubos miniaturizados con medio de cultivo. Fuente: Prescott (2004).

1.4.5.2.4. Métodos serológicos

Estas pruebas implican en utilizar preparaciones de inmunoglobulinas específicas provenientes del suero o de un reactivo, siendo de gran utilidad en la identificación microbiana de muestras puras o de muestras biológicas (Tortora *et al.*, 2007).

Cada técnica usada tiene su fundamento particular, pero en general, todos se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente bacteriano con su anticuerpo correspondiente (Tortora *et al.*, 2007). Estas técnicas se dividen en las más utilizadas para identificar bacterias, que son:

- **Aglutinación con bacterias completas:** El suero problema se enfrenta con bacterias que contienen en su superficie los antígenos reconocidos por los anticuerpos que se buscan. Si la muestra contiene estos anticuerpos se unen a las bacterias agregándolas y precipitando aglutinados visibles macroscópicamente. La superficie bacteriana se encuentra cargada negativamente y por eso las bacterias se repelen entre sí (Tortora *et al.*, 2007).
- **Aglutinación de partículas:** No utiliza células completas sino partes inertes a las que se une los antígenos específicos del agente que se busca. Suelen utilizarse partículas de látex. Cuando existen anticuerpos específicos estas partículas se agregan y precipitan. Sistemas similares pueden utilizarse para detectar antígenos si lo que se junta a las bolas de látex son los anticuerpos (Tortora *et al.*, 2007).
- **Hemaglutinación:** La hemaglutinación es una técnica muy similar que utiliza hematíes unidos a los antígenos. Si existen anticuerpos específicos los eritrocitos floculan formando grumos detectables a simple vista (Tortora *et al.*, 2007).
- **Enzimainmunoensayos (ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*):** Es la técnica más utilizada por su alta sensibilidad y especificidad. Este sistema se basa en la utilización de anticuerpos marcados con una enzima que reconocen a los anticuerpos problema como sus antígenos y una vez reconocidos existe la actividad enzimática requerida y la reacción se manifiesta por la presencia de color. Se han comercializado técnicas estandarizadas de ELISA para casi todos los microorganismos en los que es factible el diagnóstico. Debido a su alta sensibilidad a no perder positivos puede clasificar algunos negativos como positivos, por ello los resultado positivos de la técnica deben ser confirmados por otro sistema más específico que asegure el resultado positivo (Western-Blot) (Tortora *et al.*, 2007).

1.4.5.2.5. Métodos moleculares

Se basan en la aplicación de técnicas y reactivos, para detectar secuencias específicas de ADN que son propias de un determinado grupo bacteriano (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002).

Durante los últimos años, se han desarrollado nuevas herramientas tecnológicas para identificar especies bacterianas de una forma más rápida y segura (Blasco, 2009). Los primeros métodos moleculares empleados para ello fueron los análisis de proteínas totales, análisis de ácidos grasos celulares y la hibridación de ácidos nucleídos; los cuales, incluyen técnicas de hibridación ADN-ADN haciendo uso de sondas marcadas de ADN total y que se pueden aplicar sobre colonias, células enteras o sobre ADN purificado (Dicks *et al.*, 1990). También, la metodología la hibridación ADN – rARN, cuya base es la hibridación fluorescente *in situ* o FISH, utilizando sondas de ADN de unos 20-28 nucleótidos complementarios de regiones específicas de los ARN ribosómicos 16S y marcadas con fluorocromos permitiendo la detección, identificación y el recuento de especies en medios naturales (Blasco, 2009).

Hoy en día, la técnica más utilizada es la Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR (siglas en ingles), que se aplica para la identificación de microorganismos que no pueden ser cultivados por los métodos convencionales. Con este método, se aumenta la cantidad de ADN hasta niveles detectables mediante electroforesis o sondas de ADN (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002).

Algunas de las técnicas basadas en PCR se nombran a continuación: PCR específica, PCR multiplex, PCR tiempo real, Análisis de fragmentos de amplificación generados con iniciadores que se unen aleatoriamente al ADN total o RAPD (siglas en inglés) y la amplificación de secuencias que codifican para los espacios intergénicos 16S-23S rARN (ISR o ITS) o para la región V3 del 16S rARN (Guerrini *et al.*, 2003).

También, se ha generado otras técnicas que resultan combinando la amplificación por PCR de las regiones que codifican para los genes ribosomales o sus espaciadores (ISR o ITS) con la digestión enzimática de los productos de amplificación, estas son: 16S- ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado y

RFLP-ITS: Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción en los ITS (Chenoll *et al.*, 2006 citado por Blasco, 2009).

Para estas técnicas se cuentan con bases de datos de secuencias del gen 16SrADN y con un sin número de paquetes informáticos con las cuales las secuencias problema pueden ser examinadas, comparadas y se pueden diseñar sondas para identificar diferentes niveles taxonómicos (Blasco, 2009).

Otros procedimientos son el ribotipado, que se basa en la digestión del ADN total con enzimas de corte frecuente y posterior hibridación de las bandas generadas con sondas ribosomales marcadas (Rodas *et al.*, 2005 citado por Blasco, 2009); que son útiles para la discriminación de cepas dentro de la especie incluyendo la técnica AFLP que es el análisis de polimorfismos de fragmentos de digestión y posterior amplificación selectiva (Blasco, 2009).

Finalmente, la técnica de mayor designación taxonómica es la secuenciación del ADN, la cual, consiste en determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un segmento de ADN o de todo el genoma (Vizcarrondo y Gutiérrez, 2002).

La secuenciación se divide principalmente en dos variantes, cuando se trata de identificación bacteriana: la Secuenciación del 16S ADN_r y secuenciación ADN total o genómico. En el primer caso constituye un método rápido y eficaz ya que el análisis del 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, permitiendo una visión de la evolución y la clasificación bacteriana (Rodicio y Mendoza, 2004).

El segundo, ayuda a la identificación completa, específica y confiable del microorganismo teniendo su genoma completamente codificado (Rodicio y Mendoza, 2004). En la figura 1.6. observamos el alcance taxonómico de las técnica moleculares mencionadas:

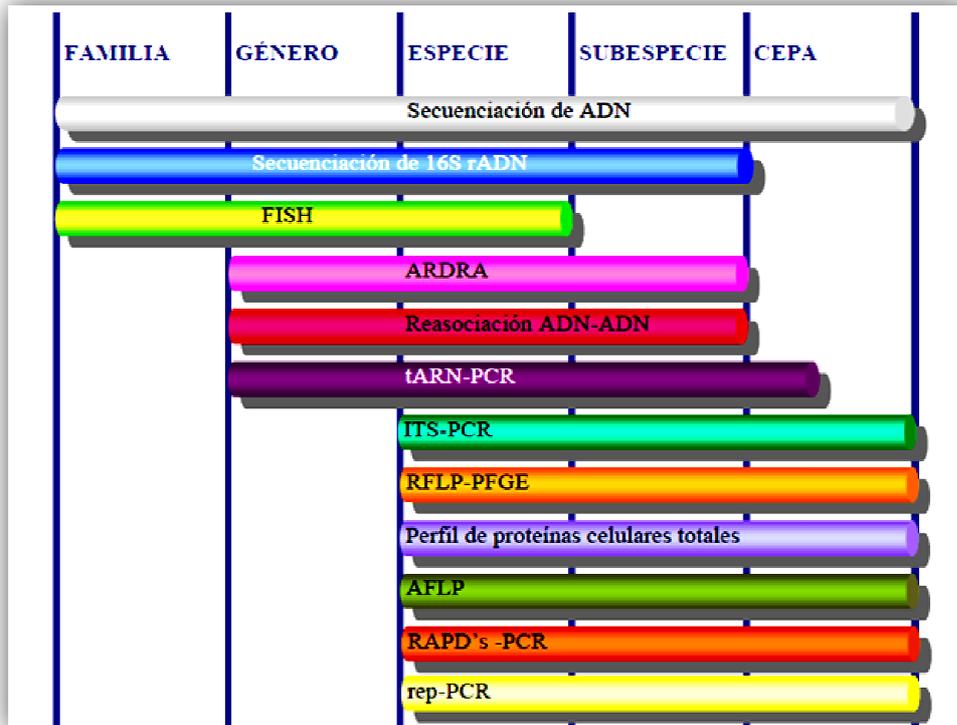


Figura 1.6. Esquema del alcance de las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos. FISH: Hibridación fluorescente *in situ*; ARDRA: Análisis de restricción del ADN ribosómico amplificado; t ARN- PCR: Análisis del espaciador intergénico codificante de un ARN de transferencia; ITS-PCR: Análisis del espaciador intergénico 16S-23S; RFLP: Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción; RFLP-PFGE: Análisis de fragmentos de restricción del ADN total cortado con enzimas de baja frecuencia de corte; AFLP: Análisis de polimorfismos de fragmentos de digestión y posterior amplificación selectiva; RAPD: Análisis de fragmentos de amplificación generados con iniciadores que se unen aleatoriamente al ADN total; rep-PCR: Análisis de fragmentos de amplificación de elementos repetitivos. Fuente: Adaptado y modificado de Savelkoul *et al.*, 1999 citado por Blasco, 2009.

1.5. Sistema de hipótesis

H₁: La caracterización mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares determinan que las cepas bacterianas del INIAP aisladas del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la sierra ecuatoriana, pertenecen al género de interés *Azospirillum*.

H₂: La evaluación funcional de las cepas bacterianas del INIAP, mediante la inoculación en semillas y plantas de maíz, manifiesta efectos positivos en el desarrollo y crecimiento de las mismas, tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones

La institución auspiciante y participante de esta investigación es el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en la Estación Experimental Santa Catalina.

2.1.2. Responsable del proyecto

Andrea Greta Carrera González

2.1.3. Colaboradores científicos

Ing. MSc. Carlos Yáñez.	Responsable del Programa de Maíz del INIAP.
Dr. Eduardo Morillo.	Responsable del Departamento de Biotecnología del INIAP.
Dra. Ligia Ayala.	Directora de tesis.
Dr. Ricardo Oliva.	Codirector de tesis.

2.2. Zona de estudio

Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutuglagua, dirección Panamericana Sur Km. 1, vía Tambillo.

2.3. Período de investigación

La presente investigación se desarrolló en un periodo de 18 meses, desde Junio del 2010 a Diciembre del 2011.

2.4. Diseño experimental y estadística

La investigación se llevó a cabo en cuatro fases:

- Fase I: Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas.
- Fase II: Caracterización molecular de las cepas bacterianas.

- Fase III: Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas.
- Fase IV: Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.

Las cuatro fases registraron diseños experimentales con la estadística respectiva, descritas a continuación:

FASE 1: Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas

Para la identificación microbiológica se aplicaron diferentes pruebas bioquímicas para dar a conocer el metabolismo de las cepas bacterianas y compararlas con el metabolismo del género *Azospirillum* reportado en bibliografía. Para este análisis se utilizó el software bioestadístico NTSYSpc versión 2.02. El programa permitió la obtención una matriz de similaridad mediante el coeficiente de apareamiento simple, SM (Kumar *et al.*, 2008). Finalmente, se realizó el análisis de agrupamiento UPGMA (Método ponderado de apareamiento de grupos a través de la media aritmética) para la representación gráfica o dendrograma del metabolismo de las 20 cepas bacterianas junto con el metabolismo reportado para *Azospirillum* en las pruebas bioquímicas realizadas (Sánchez, 2002).

FASE II: Caracterización molecular de las cepas bacterianas.

En esta fase se realizó la identificación del género y especie de las cepas bacterianas utilizando la técnica análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA). Para ello, fue preciso realizar el análisis en el software bioestadístico NTSYSpc versión 2.02. El programa permitió la obtención de matrices de similaridad mediante el coeficiente DICE (Kumar *et al.*, 2008). Finalmente, se realizó el análisis de agrupamiento UPGMA (Método ponderado de apareamiento de grupos a través de la media aritmética) para la representación gráfica o dendrograma de las tres enzimas empleadas en la técnica: *TaqI*, *AluI* y *EcoRI* (Jiménez, 2007).

FASE III: Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas.

Para la evaluación *in vitro* de las cepas bacterianas se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA), donde los tratamientos correspondieron a las 20 cepas bacterianas más dos testigos negativos propios del ensayo y las repeticiones consistieron

en 12 semillas pre-germinadas de maíz por tratamiento (Tabla 2.1). Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA para determinar variabilidad entre los tratamientos y las repeticiones. Adicionalmente, se consideró un análisis funcional con la prueba de Tukey al 5% como prueba de significancia, para determinar los mejores tratamientos en función de las variables involucradas en promover el crecimiento de las raíces del maíz (Sánchez, 2002)

Tabla 2.1. Tratamientos y repeticiones de la evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas

TRATAMIENTO	CODIGO Y PROCEDENCIA
T1	Cepa 1: Bolívar
T2	Cepa 2: Bolívar
T3	Cepa 3: Tungurahua
T4	Cepa 4: Chimborazo.
T5	Cepa 5: Chimborazo
T6	Cepa 6: Tungurahua
T7	Cepa 7: Tungurahua
T8	Cepa 8: Tungurahua
T9	Cepa 9: Tungurahua
T10	Cepa 10: Cuba
T11	Cepa 11 Pichincha
T12	Cepa 12: Imbabura
T13	Cepa 13: Imbabura
T14	Cepa 14: Carchi
T15	Cepa 15: Carchi
T16	Cepa 16: Carchi
T17	Cepa 17: Imbabura
T18	Cepa 18: Imbabura
T19	Cepa 19: Imbabura
T20	Cepa 20: Pichincha
Testigo Tratamiento	Medio de cultivo sin microorganismos
Testigo Absoluto	Ningún microorganismo ni medio de cultivo

FASE IV: Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.

Para la evaluación en invernadero de las cepas bacterianas se implementó un Diseño Completamente al Azar (DCA), donde los tratamientos correspondieron a las 20 cepas bacterianas más dos testigos negativos propios del ensayo y las repeticiones consistieron en 6 plantas de maíz por tratamiento (Tabla 2.1). En el análisis estadístico

se utilizó un ANOVA para determinar variabilidad entre los tratamientos y las repeticiones. Además, se realizó un análisis funcional con la prueba de Tukey al 5%, este permitió conocer los mejores tratamientos en función de las variables involucradas en promover el crecimiento de las raíces y parte aérea del maíz (Sánchez, 2002)

2.5. Procedimiento

2.5.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas

2.5.1.1. Procedencia y descripción de las cepas.

El material entregado para la caracterización consistió en 20 ejemplares bacterianos aislados de la rizósfera de cultivo de maíz de diferentes provincias del norte (Carchi, Imbabura y Pichincha) y centro (Chimborazo, Tungurahua y Bolívar) de la Sierra ecuatoriana (Figura 2.1). Según Espinoza (2004), el aislamiento se realizó en medios de cultivo reportados en literatura como específicos para el género *Azospirillum*, tales como: el medio semisólido NFb (Nitrogen fixation biological) (Anexo A.3) y el agar Acido málico-rojo Congo (Anexo A.1); obteniendo 20 aislados bacterianos identificados, preliminarmente, como cepas pertenecientes al género de *Azospirillum*. Espinoza (2004) purificó y liofilizó cada aislado para su conservación en la Planta Piloto del Programa de Maíz del INIAP desde el año 2004. La codificación y el lugar de procedencia de cada cepa se presentan en el Tabla 2.2:

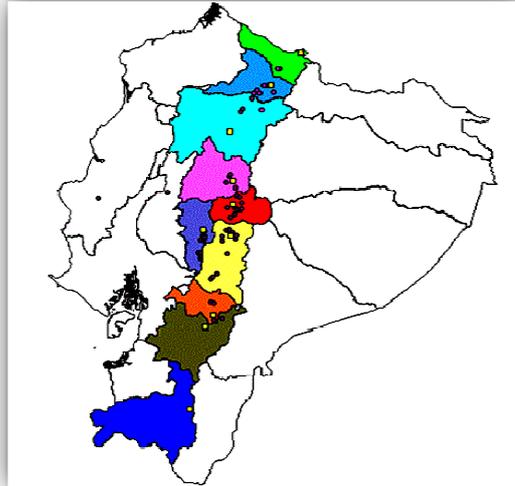


Figura 2.1. Mapa de las provincias de la Sierra ecuatoriana donde se realizó la colección de muestras para el aislamiento de las cepas bacterianas. Fuente: Espinoza (2004).

Tabla 2.2. Código y lugar de procedencia de los aislados bacterianos.

CÓDIGO	LUGAR DE PROCEDENCIA
C1	Bolívar, Chillanes, Chillanes, Hacienda Pacay
C2	Bolívar, Guaranda, Veintimilla, Laguacoto 2
C3	Tungurahua, Píllaro, Emilio Terán, El Capulicito
C4	Chimborazo, Alausí, Sibambe, Cochapamba
C5	Chimborazo, Alausí, Tixan, Somisión
C6	Tungurahua, Pelileo, Pelileo, El Tambo
C7	Tungurahua Quero, Quero, La Concepción
C8	Tungurahua, Mocha, Mocha, Mocha
C9	Tungurahua , Mocha, Mocha, Mocha
C10	Cuba
C11	Pichincha, Pedro Moncayo, La Esperanza , Cubinche
C12	Imbabura, Otavalo, San Pablo del Lago, San Pablo
C13	Imbabura, Otavalo, San Pablo del Lago, San Pablo
C14	Carchi, Espejo, San Isidro, San Joaquín
C15	Carchi, Espejo, San Isidro, San Joaquín
C16	Carchi, Espejo, Mira, San Luis
C17	Imbabura, Antoño Ante, Atuntaqui, El Rosario
C18	Imbabura, Cotacachi, Quiroga, Cuicocha Pana
C19	Imbabura, Otavalo, Quichinche, Pisabo
C20	Pichincha, Quito, Amaguana, Carapungo

Fuente: Espinoza (2004)

2.5.1.2. Reactivación y purificación de liofilizados bacterianos

El método de reactivación se realizó colocando 1 mL de solución peptona estéril al 0,1% (Anexo A.7) en los microtubos que contenían las cepas liofilizadas y se agitó con ayuda de un vortex para homogenizar la suspensión (CIAT, 1988). Se incubó el microtubo con la suspensión a temperatura ambiente por un periodo de 8 horas, con el fin de reactivar el metabolismo bacteriano y fomentar la multiplicación celular (Gamazo *et al.*, 2005).

Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó 50 μ L de la suspensión y se colocó en la superficie del agar Acido málico– rojo Congo (AM-RC) contenida en una caja Petri (Gamazo *et al.*, 2005). Se extendió la suspensión con un triángulo de vidrio esterilizado y se incubó la caja conteniendo las bacterias a 30 °C durante 7 días (Espinoza, 2004).

El crecimiento bacteriano obtenido se purificó tomando una mínima porción de colonia bacteriana, con un asa de platino, y se sembró con la técnica de estriado compuesto en la superficie del agar AM-RC (Girard y Rougiex, 1964). Se incubó el cultivo a 30°C por 7 días (Figura 2.2). Este proceso de purificación se repitió una vez más para cada aislado bacteriano (Espinoza, 2004).

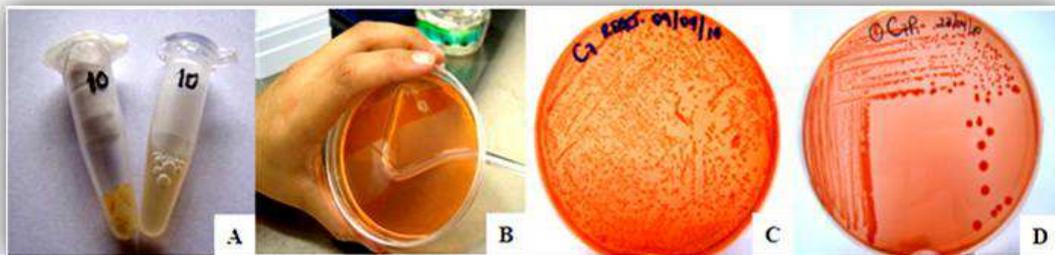


Figura 2.2. Reactivación y purificación de los aislados bacterianos. A. Cepa liofilizada sin y con la solución de peptona al 0,1%. B. Siembra en superficie con triángulo de vidrio esterilizado. C. Crecimiento bacteriano. D Purificación de colonias bacterianas mediante siembra por estriado compuesto.

2.5.1.3. Identificación microbiológica

La identificación microbiológica de las cepas se llevó a cabo mediante la descripción morfológica de colonias bacterianas y pruebas bioquímicas específicas para el género y especies de *Azospirillum*.

2.5.1.3.1. Descripción morfológica de colonias bacterianas

Para la descripción morfológica de colonias, cada aislado bacteriano se sembró en cajas Petri con Agar Nutritivo (Anexo A.2), las mismas que se incubaron a 30°C por 48h. Se describió a las colonias formadas y apreciables a simple vista en base a los criterios morfológicos descritos por Prescott *et al.* (2004), según la figura 1.3. El procedimiento para ello fue el siguiente:

- **Tamaño:** Se midió las colonias de cada cepa con un calibrador digital. Se determinó como colonias: pequeñas ≤ 1 mm, medianas de 1-4 mm y grandes > 4 mm.
- **Forma:** Se atribuyó a cada colonia como: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide y fusiforme o alargada, de acuerdo a la figura 1.3.
- **Elevación:** Se designó si la colonia era: plana, elevada, convexa, pulvinada y umbonada según la figura 1.3.
- **Margen o Borde:** La figura 1.3 indica que el borde de las colonias puede ser: entero, ondulado, lobulado, erosionado, filamentoso ó rizado.
- **Superficie:** Se apreció si la colonia era: lisa brillante, lisa mate, Irregular brillante, irregular mate, filamentoso brillante ó filamentoso mate.
- **Consistencia:** Con un asa de platino estéril se tomó una porción de colonia y se determinó si su consistencia era: dura (colonias quebradizas), cremosa (fácilmente pasa el asa) ó viscosas (forma filamentos o mucosidades al tomarlas con el asa).
- **Color:** Se designó el color según el criterio del observador.

2.5.1.3.2. Pruebas Bioquímicas

Se realizaron 15 pruebas para *Azospirillum* a cada uno de los aislados, estas se dividieron en:

A. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Azospirillum*

Para confirmar que las cepas aisladas correspondían al género *Azospirillum* se les realizó 13 pruebas bioquímicas considerando los criterios descritos en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984) (Cuadro 1.5). A continuación se describe el procedimiento empleado en cada prueba bioquímica:

- **Tinción Gram y Forma celular:** En esta prueba se utilizaron cultivos en AN incubados a 30°C por 48h. Se tomó la muestra bacteriana con ayuda de un asa estéril y se realizó un frotis espiral en un portaobjetos, seguido se fijó la muestra al fuego y se tiñó siguiendo la modificación de Hucker (Fernández *et al.*, 1978 citado por Hernández, 2003). Se determinó la reacción de Gram y la forma celular de cada cepa según la figura 1.4.
- **Catalasa:** Se utilizaron cultivos en AN incubados de 48 horas. Se realizaron frotis espirales de las muestras en portaobjetos individuales limpios. Sobre cada frotis se colocaron dos gotas de solución de peróxido de hidrógeno al 3% y se esperó 30 segundos para la manifestación de la reacción (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Oxidasa:** Se usaron discos Taxo N de 6 mm con 6% de monoclóhidrato de *p*-aminodimetilanilina y cultivos bacterianos en AN de 48h. En una placa estéril se colocaron varias gotas de agua destilada estéril. A cada gota se añadió una cantidad del cultivo bacteriano obtenido en caja, se mezcló hasta obtener una suspensión espesa. A la suspensión se le colocó un disco Taxo N. El cambio de color del disco se aceleró incubando la solución a 35°C durante 3-5 min (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Ureasa:** La prueba se realizó preparando tubos con agar Urea base, solidificado en forma de pico de flauta. Se estrió cada muestra bacteriana en la superficie del medio con un asa de platino estéril y se incubaron los tubos a 37°C por 24 – 48 horas. Transcurrido el tiempo se observaron las reacciones y se registraron los resultados (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Sulfatos Indol Motilidad (SIM):** Se preparó el medio de cultivo BBL-SIM agar y se solidificó en forma horizontal en tubos de 30 mL. Las muestras bacterianas se sembraron en el medio con la técnica de punción a través de una aguja de platino

recta y estéril. Los tubos se incubaron a 37°C por 48 h. Para el resultado de Indol, después de la incubación, se añadieron al medio tres gotas del reactivo de Kovacs (Anexo A.10) y se esperó 2 min. para la manifestación de la reacción (Gamazo *et al.*, 2005).

- **Lactosa:** Para esta prueba se utilizó el medio agar Mc-Conkey. Se sembraron las muestras bacterianas en cajas con dicho agar y se incubaron a una temperatura de 37°C por un período de 24 - 48h (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Reducción de Nitratos:** Se preparó el medio de cultivo BBL-Caldo Nitrato, se dispensó 5mL y se esterilizó en autoclave. Cada muestra bacteriana Se sembró en dicho medio y se incubaron a 37°C por 48 horas. Trascurrido el tiempo, a cada suspensión bacteriana se añadieron dos gotas de solución de ácido sulfanílico (Anexo A.8) y dos gotas de α -Naftilamina (Anexo A.9). Finalmente, se esperó 1 minuto para evidenciar la reacción (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Tinción de β - Polihidroxibutirato:** Se utilizaron cultivos de 48 h de incubación a 30°C en NFB sólido. La tinción de gránulos de PHB se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por Bradshaw (1976) citado por Hernández (2003) (Anexo A.12).
- **Crecimiento en NFB semisólido:** Cada muestra bacteriana fue inoculada en el medio con la técnica de estocada o punción hasta el fondo del tubo y se incubó a 30°C por 7 días. Trascurrido el tiempo se dio lectura a los resultados (Caballero, 2001).
- **Morfología de colonias en Agar AM-RC:** Cada muestra bacteriana fue sembrada en cajas con el medio AM-RC y se incubaron a una temperatura de 30°C por 7 días (Holguín *et al.*, 1996). Se realizó la descripción morfológica de colonia según los criterios morfológicos descritos por Prescott, (2004) (Figura 1.2).

B. Pruebas bioquímicas para la identificación de especies dentro del género *Azospirillum*

A las cepas se les realizó tres pruebas bioquímicas para identificarlas a nivel de especie dentro del género en estudio, considerando los criterios reportados por Krieg y Döbereiner (1984) para las especies más estudiadas de *Azospirillum* (Cuadro 1.6). Los procedimientos empleados para estas pruebas se mencionan a continuación:

- **Citrato como fuente de carbono:** La prueba se realizó preparando tubos con el medio de cultivo agar citrato, solidificado en forma de pico de flauta. Sobre la superficie sólida del medio se estriaron las muestras bacterianas y se incubaron a 37 °C por un período de 24 - 48 horas (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Glucosa como única fuente de carbono:** Se preparó el medio basal oxidación-fermentación (OFBM) de Hugh y Leifson (1953), al cual se le añadió el 1% de glucosa (Anexo A.6). Se sembraron las muestras bacterianas en este medio con la técnica de punción o estocada y se incubaron a 37°C por 48 horas (Gamazo *et al.*, 2005).
- **Crecimiento en medio agar Infusión de papa (BMS):** Se sembró cada ejemplar bacteriano en la superficie del medio agar BMS (Anexo A.4), con la técnica de estriado compuesto y se incubaron las cajas a 30°C por 4 días (Gamazo *et al.*, 2005).

Con los datos obtenidos de todas las pruebas bioquímicas, se creó una matriz binaria; donde, 1 representó prueba positiva y 0 prueba negativa. Esta matriz se analizó en el software NTSYS pc (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.02, usando el coeficiente SM, para obtener el análisis de agrupamiento con la técnica UPGMA (Método ponderado de apareamiento de grupos a través de la media aritmética), y generar el dendrograma que agrupó a todas las muestras según la similitud de sus resultados (Jiménez, 2007) y comparó con los resultados reportados en bibliografía para el género *Azospirillum* (Cuadro 1.5 y 1.6).

2.5.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

2.5.2.1. Extracción del ADN genómico

La extracción de ADN se realizó a partir de los cultivos puros bacterianos utilizando el protocolo modificado por Francisco Jarrin de Weising *et al.*, (1995). Se sembraron las muestras bacterianas en 50 mL de caldo nutritivo y se incubaron por un período de 48 a 72 horas. Cada suspensión bacteriana se centrifugó por 8 min a 14.000 revoluciones por minuto (r.p.m.) descartando el sobrenadante. En un microtubo limpio y estéril se colocó la biomasa precipitada junto con una pequeña cantidad de arena de cuarzo y 0.5 mL de tampón de extracción (Anexo B.1) y con ayuda de un homogenizador se pulverizó la biomasa por un período de 45seg. Se evitó dejar las muestras demasiado tiempo a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 300µL de cloroformo: isoamilalcohol (CIA) 24:1 y se mezcló invirtiendo los tubos para homogenizar el tampón y el solvente. Se incubaron las muestras a 53°C por un periodo de 20 a 30 minutos. Se invirtieron los tubos manualmente cinco veces cada 10 minutos. Las muestras se centrifugaron por 25 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, limpio y estéril evitando topar la interface. Se realizó un segundo lavado al sobrenadante con 300 µL de cloroformo: isoamilalcohol (CIA) 24:1 y se incubaron a 53°C por 30 minutos. Finalizada la incubación, se centrifugó nuevamente por 25 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió en un nuevo microtubo y se añadió de 1 a 1.5 volúmenes de isopropanol y se incubó por 1 hora y 30 minutos a -20°C para que precipiten los ácidos nucleicos. Se centrifugó los microtubos por 15 minutos a 14000 rpm y se obtuvo un pellet de ADN. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 100 µL de etanol frío al 70%. Se centrifugó en cada lavado por 5min a 14.000 rpm y se descartó y evaporó todo el etanol. Posteriormente, se re suspendió el ADN en 50 µL de tampón TE (Anexo B.2) y se añadió 1µL de RNAsa (10 mg/mL). Finalmente, las muestras de ADN se cuantificaron en geles de agarosa y por fluorometría para ajustar la concentración de todas las muestras a 10ng/µL.

2.5.2.2. Cuantificación de ADN.

Las muestras de ADN obtenidas en el proceso de extracción se cuantificaron por:

2.5.2.2.1. Electroforesis horizontal en geles de agarosa.

Se preparó un gel de agarosa ultra pura (Invitrogen) a una concentración de agarosa del 1% (p/v) con la solución TAE 1X (Anexo B.3). La mezcla se agitó por 5 minutos para que se hidrate, posteriormente se calentó y agitó hasta que el polímero se disuelva adecuadamente y se obtenga una solución traslúcida. Se dejó enfriar la solución de agarosa sin permitir que se solidifique. Mientras tanto, se ensambló la cubeta de electroforesis con sus respectivos peines. Finalmente, se procedió a dispensar la solución de agarosa en la cubeta y se esperó hasta que el polímero solidifique. El gel polimerizado se sumergió en una solución de TAE 1X dentro de la cámara electroforética (Morillo y Miño, 2010).

Las muestras de ADN se prepararon mezclando 1 μ L de Blue Juice 1X INVITROGEN® con 4 μ L de cada muestra. Se dispensó 2 μ L esta mezcla en los pocillos del gel de agarosa dejando libre el primer pocillo para colocar 2 μ L del marcador de talla y peso molecular Low ADN Mass Ladder de INVITROGEN®. Seguido se realizó la corrida electroforética a 100 V por 30 minutos. Culminado el tiempo de la electroforesis, se colocó el gel en una solución de Bromuro de Etidio de concentración 15 ppm, en agitación por 30 minutos para la tinción del ADN. Se visualizó el gel en un fotodocumentador que posee acoplado un transiluminador con luz UV, y se procedió a fotografiar la imagen respectiva. A partir de estos geles se calculó la cantidad y se observó la calidad del ADN obtenido del protocolo de extracción (Morillo y Miño, 2010).

2.5.2.2.2. Fluorimetría.

Los ADN obtenidos del proceso de extracción también fueron cuantificados por fluorimetría con ayuda del equipo QUBIT™; para ello, se dispensó en microtubos de 0,6 mL la cantidad de 10 μ L de los estándares de calibración (Estándar 1 concentración 0ng/ μ L y Estándar 2 concentración 100 ng/ μ L) y de 1-20 μ L de cada muestra de ADN. Aparte, se preparó la solución de cuantificación mezclando los reactivos Quant-it™

Reagent (1 x #de muestras μL) y Quant-it™ Buffer (199 x número de muestras μL). Esta solución se agitó levemente y se dispensó de 180-199 μL en cada microtubo con los estándares y las muestras. Se agitó los microtubos en un vortex por 3 segundos para luego incubarlas a temperatura ambiente por 2 minutos. Todo el proceso se llevó a cabo bajo oscuridad para evitar la degradación del fluoróforo. Transcurrido el tiempo de incubación, se programó la lectura BR ($\mu\text{g}/\text{mL}$) en el equipo QUBIT™ y se calibró el equipo con los Estándares 1 y 2. Seguido se dio lectura a las muestras de ADN (Morillo y Miño, 2010). Para calcular la concentración de las muestras se usó la siguiente ecuación: Concentración de ADN = Valor de la lectura * 200 μL /Volumen de la muestra.

2.5.2.3. Amplificación del gen 16S ADN ribosomal

Se utilizaron iniciadores universales para eubacterias, llamados: 8F (5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1492R (5' ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') que permitieron amplificar aproximadamente 1500 pares de bases del gen 16S (Weisburg *et al.*, 1991).

Las mezcla para la reacción en cadena y el programa de amplificación se basaron en el protocolo modificado de Benítez *et al.*, 2007. La mezcla consistió en un volumen final de 25 μL con los siguientes reactivos y concentraciones finales: 1X Buffer de PCR libre de cloruro de Magnesio (Invitrogen), 1,8 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 0,8 pmol/ μL por cada primer y 0,06 U/ μL de ADN *Taq* Polimerasa (Invitrogen). Se utilizó como coadyuvante en la reacción suero de albúmina bovina (BSA) ajustandola a concentración final de 1 mg/mL y de muestra de ADN templado 40 ng (Benitez *et al.*, 2007). En cambio, el programa de amplificación fue ingresado en el termociclador PTC-200 y consistió en una denaturación inicial de cinco minutos a 95°C, 34 ciclos de un minuto a 94°C, 45 segundos a 54°C y un minuto a 70°C, seguidos de una extensión final de ocho minutos a 70°C y un enfriamiento de cinco minutos a 4°C.

2.5.2.4. Visualización de productos amplificados

A los productos amplificados se les realizó la técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% p/v. Las muestras se prepararon mezclando 1 μL de Blue

Stop con 4 μ L de la muestra amplificada y cargando en cada pocillo del gel 5 μ L de esta mezcla. Se añadió también al primer y último pocillo del gel 3 μ L del marcador molecular TrackIt 100 bp ADN Ladder INVITROGEN®. La corrida electroforética se realizó a 100V por 35 minutos. Posteriormente, los geles se tiñeron en una solución de Bromuro de Etidio de 15 ppm por un periodo 30 minutos. Al final se visualizaron los productos amplificados corridos en gel en el fotodocumentador con luz UV (Morillo y Miño, 2010).

2.5.2.5. ARDRA

2.5.2.5.1. Restricción enzimática virtual

Para la selección de las enzimas a emplear en la técnica de análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (siglas en ingles ARDRA), se realizaron restricciones enzimáticas virtuales, utilizando el programa CLC Genomics Workbench 2.2.4®, a los genes 16S ribosomal de tres especies pertenecientes al género *Azospirillum* (Tabla 2.3), cuyas secuencias fueron extraídas del Ribosomal Database Project (Junior *et al.*, 2004).

Tabla 2.3. Secuencias del gen 16S ADNr pertenecientes al género *Azospirillum*, obtenidas del RDP para el análisis de restricción virtual.

MICROORGANISMO	CODIGO RDP	SECUENCIA (pb)
<i>Azospirillum brasilense</i> sp7	S000002977	1.403
<i>Azospirillum lipoferum</i> (T)	S000129521	1.432
<i>Azospirillum amazonense</i> N39	S002236070	1.489

Fuente: Ribosomal Database Project (2011)

Se realizaron cortes virtuales con todo el banco de enzimas disponibles en el programa, y se seleccionó las enzimas que brindaron: patrones de bandas o polimorfismos diferentes para cada especie, un número considerable de fragmentos y que estos se encuentren a distancias distinguibles en los geles de agarosa, asegurando confiabilidad en la información obtenida (Junior *et al.*, 2004).

2.5.2.5.2. Restricción enzimática de las cepas bacterianas

Las tres mejores enzimas seleccionadas fueron: *AluI*, *TaqI* y *EcoRI* (Tabla 2.4). Con esto se procedió a la digestión enzimática del gen 16S de las muestras, para lo cual se aplicó el protocolo modificado de Benítez *et al.* (2007).

El protocolo consistió en preparar una mezcla de reacción para cada enzima de 10 µL como volumen final, conformado por: 0,5 µL de Buffer, 0,1 µL de suero de albúmina bovina (BSA), 0,3 µL de enzima (Promega) y 4 µL del producto de amplificación. Las muestras fueron incubadas por tres horas a la temperatura óptima de cada enzima, seguido de un periodo de 15 minutos a 65°C para la desactivación enzimática. Finalmente, los productos fueron almacenados a una temperatura de 4°C antes de ser visualizados (Benítez *et al.*, 2007).

Tabla 2.4. Enzimas seleccionadas para la técnica ARDRA indicando su sitio de restricción

ENZIMA	SITIO DE RESTRICCIÓN
<i>AluI</i>	(5'-AG / CT -3') (3'-TC / GA-5')
<i>TaqI</i>	(5'-T / CGA -3') (3'AGC / T- 5')
<i>EcoRI</i>	(5' -G / AATTC- 3') (3'- CTTAA / G – 5')

Fuente: Junior *et al.* (2004).

2.5.2.5.3. Visualización de los productos de la digestión enzimática

Los productos de la restricción enzimática se sometieron a la técnica de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2,5%. Las muestras se prepararon mezclando 1 µL de Blue Stop 1X más 4 µL del producto digerido. Se cargó 5 µL de esta mezcla en cada pocillo del gel. Se incluyó también 4 µL de marcador molecular TrackIt 100 bp ADN Ladder INVITROGEN®. La corrida electroforética de los geles se realizó a 100V por el periodo de 1 hora 20 minutos. Culminada la electroforesis los geles se tiñeron en una solución de Bromuro de Etidio de 15ppm por 30 minutos. Finalmente, se visualizaron las bandas en el fotodocumentador con luz UV (Morillo y Miño, 2010).

2.5.2.5.4. Registro de datos

Las fotografías de los geles con los productos del ARDRA se examinaron tomando como referencia el tamaño molecular de las bandas según el marcador TrackIt 100 bp ADN Ladder INVITROGEN®, para determinar la presencia o ausencia de las mismas en todas las muestras. Se generó una matriz binaria, siendo el valor de “1” la presencia de la banda y el valor “0” la ausencia de la misma. Las bandas no muy bien definidas y las con poca intensidad no fueron consideradas para el registro de datos (Kumar *et al.*, 2008). Se incluyó en dicha matriz, como control positivo del análisis, los resultados del tamaño de las bandas generadas en el corte enzimático virtual para las tres especies de *Azospirillum* (Junior *et al.*, 2004).

2.5.2.5.5. Análisis de datos y agrupamiento

Se generó una matriz binaria en EXCEL (formato 97-2003), la cual se guardó como texto sin formato para analizarlo en el software NTSYS pc (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.02. Se calculó una matriz de similaridad genética con el coeficiente de DICE (Jiménez, 2007).

A partir, de esta matriz de similaridad se realizó el análisis de agrupamiento empleando la técnica multivariante de apareamiento de grupos a través de la media aritmética UPGMA (Método ponderado de apareamiento de grupos a través de la media aritmética), la cual creó una reducción progresiva de la matriz por lo que los resultados se consideraron para relacionar grupos más no individuos (Legendre y Legendre, 2000). Finalmente, se generó el dendrograma respectivo para las tres enzimas.

2.5.2.6. Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal

La secuenciación se efectuó, como un servicio contratado, por los Laboratorios MACROGEN Inc. en la República de Corea. El gen 16S ADNr amplificado de cada muestras bacteriana se envió sin purificar y a una concentración de 100 ng/μL en un volumen de 25 μL (www.macrogen.com). La cuantificación se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1%p/v y por fluorimetría (Morillo y Miño, 2010).

2.5.2.6.1. Edición y registro de secuencias obtenidas

Las secuencias enviadas del gen 16S de cada cepa bacteriana se editaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0. Versión gratuita y disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (Hall, 1999). El registro de las secuencias editadas se realizó en formato FASTA para su análisis posterior.

2.5.2.6.2. Análisis y comparación de secuencias homólogas.

Las secuencias editadas de las cepas bacterianas se ingresaron al programa informático de alineamiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Aquí se utilizó la opción “nucleotide BLAST” para homologar las secuencias problema con las existentes en la base de datos disponible.

2.5.2.7. Análisis filogenético de las secuencias

Se extrajeron de la base de datos NCBI secuencias del gen 16S ribosomal de todas las especies del género *Azospirillum* junto con las secuencias de las cepas bacterianas obtenidas en el BLAST. Se ingresaron las secuencias en formato FASTA al programa informático en línea Phylogeny.fr/, disponible en: <http://www.phylogeny.fr/>, con el cual realizó el análisis y el respectivo árbol filogenético (Jiménez, 2007).

2.5.3. FASE III. Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacteriana

2.5.3.1. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101

La variedad de maíz I-101 fue seleccionada para este estudio debido a que, este maíz se cultiva en las provincias de donde se aislaron las muestras bacterianas (Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Azuay y Loja) y fue la variedad que estuvo cultivada en los suelos agrícolas al momento de la colecta (Espinoza, 2004). Al seleccionar este maíz se contrarrestó la variabilidad del ensayo *in vitro* por combinación genotípica inespecífica de la planta con las cepas (INIAP, 2007).

La desinfección de las semillas se realizó utilizando la metodología citada por Espinoza (2004). Las semillas seleccionadas se sumergieron en alcohol potable al 96% durante un minuto, transcurrido el tiempo se desechó el alcohol y se añadió una solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico (Anexo A.11), donde permanecieron sumergidas las semillas por un minuto. A continuación, se desechó la solución y se realizó cuatro lavados con agua destilada estéril. Culminado los lavados se colocaron las semillas en cajas Petri con papel toalla estéril (INIFAP, 2008).

Se depositaron siete semillas por cada caja y se humedeció el papel con agua destilada estéril (Figura 2.3). Para promover la germinación, las semillas se incubaron a 28°C durante 3 días. Transcurrido el periodo de incubación se seleccionaron aquellas semillas que presentaron una radícula de 1 cm de longitud aproximadamente (INIFAP, 2008).



Figura 2.3. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101. A. Selección de la semilla. B. Lavado de semillas en solución de hipoclorito de sodio con ácido clorhídrico. C. Semillas colocadas en cajas Petri para la pre-germinación.

2.5.3.2. Preparación de suspensiones bacterianas

Se preparó una suspensión bacteriana de cada cepa. Las bacterias se cultivaron en un frasco de vidrio con 50 mL de caldo nutritivo estéril (Anexo A.5). Los frascos se rotularon con el código de las cepa y se incubaron a 30°C en agitación media y constante por 48 horas (INIFAP, 2008).

Posterior a la incubación, cada suspensión bacteriana fue cuantificada mediante la técnica de recuento en placa (Prescott, 2004). Las concentraciones de cada muestra se homogenizaron ajustando la densidad bacteriana a 10^6 UFC/mL (Fallik *et al.*, 1988)

mediante diluciones seriadas 1:10 en solución salina estéril al 0.85% (Madigan *et al.*, 2004).

2.5.3.3. Evaluación del efecto bacteriano sobre las semillas de maíz

Una vez que las semillas germinaron se eligieron doce plántulas homogéneas, tanto en desarrollo como en longitud de raíz (1 cm aproximadamente), para cada tratamiento con las cepas bacterianas. En condiciones asépticas, las doce plántulas se colocaron en recipientes plásticos estériles que contenían 25 mL de agar agua (9g agar/L agua destilada) y cada raicilla se inoculó con 100 μ L del cultivo bacteriano correspondiente (INIFAP, 2008). Se sellaron los recipientes con las tapas respectivas, las cuales tenían dos agujeros sellados con adhesivo micro poro para permitir el ingreso de aire filtrado a las plántulas. Los recipientes sellados se incubaron a 28°C por tres días (INIFAP, 2008) (Figura 2.4).

El ensayo consideró dos tipos de testigos negativos, un testigo tratamiento donde se inoculó las raíces con el medio caldo nutritivo sin crecimiento bacteriano y un testigo absoluto que consistió en no inocular ningún microorganismo ni sustancia en las raíces.

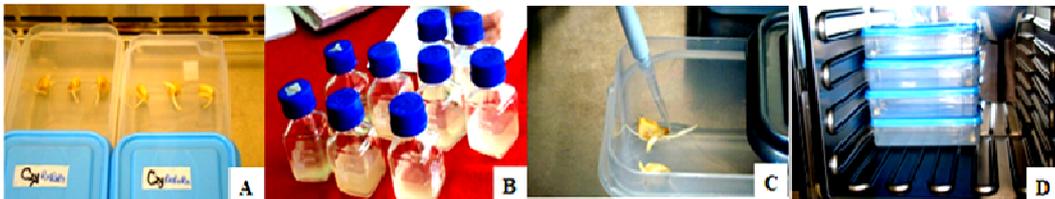


Figura 2.4. Evaluación del efecto bacteriano sobre semillas de maíz. A. Semillas seleccionadas y colocadas en agar agua. C. Preparación de las suspensiones bacterianas. D. Inoculación bacteriana en raíces de maíz. F. Incubación de las semillas inoculadas.

2.5.3.4. Procesamiento de las plántulas y análisis estadístico de las variables

Al finalizar el ensayo, los recipientes plásticos fueron retirados de la incubadora y se registró de cada plántula los datos de: longitud de raíz, número de raíces principales desarrolladas y % de materia seca (Sánchez, 2002). Los datos registrados se analizaron mediante el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0.

2.5.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

2.5.4.1. Composición química del sustrato

El sustrato utilizado se preparó con tierra negra, humus, pomina, y cascarilla de arroz en proporciones 3:2:0,5:0,5. Se esterilizó antes ser usado, mediante vapor en autoclave a condiciones de 121°C por un periodo de 20 min (Espinoza, 2004). Se realizó un análisis de nutrientes a muestras de sustrato, tanto iniciales como finales. Las muestras fueron enviadas al Departamento de suelos y aguas de la EESC- INIAP, donde se evaluaron los parámetros que se muestran en la tabla 2.5:

Tabla 2.5. Parámetros evaluados en el sustrato.

PARÁMETROS	UNIDADES	PARÁMETROS	UNIDADES
N	ppm	Mn	ppm
P	ppm	B	ppm
S	ppm	K	meq/100 mL
Zn	ppm	Ca	meq/100 mL
Cu	ppm	Mg	meq/100 mL
Fe	ppm	Materia Orgánica	%
		pH	

Fuente: Departamento de suelos y aguas de la EESC- INIAP

2.5.4.2. Desinfección y pre-germinación de semillas de maíz variedad INIAP-101

Las semillas de maíz variedad INIAP-101 se desinfectaron y pre-germinaron con la metodología de Espinoza (2004) descrita en el literal 2.5.3.1. de la evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas.

2.5.4.3. Siembra de semillas de maíz pre-germinadas en invernadero

En macetas de plástico (16 cm alto x 16 cm diámetro) se colocó aproximadamente 1 kg de sustrato esterilizado y dos semillas de maíz desinfectadas y pre-germinadas. El riego se realizó periódicamente según el requerimiento de las semillas y hasta el nivel de capacidad de campo de cada maceta (INIFAP, 2008). A los

10 días se realizó un raleo al ensayo, dejando una planta por maceta (Figura 2.5). En este proceso, se tomó en cuenta el estado vegetativo de cada planta según su número de hojas para homogenizar el ensayo considerando que todas estén en el estado vegetativo V3 (Acevedo, 2005).



Figura 2.5. Siembra de semillas pre-germinadas en sustrato a condiciones de invernadero. A. Raleo de plántulas. B. Plantas de maíz en estado vegetativo V3 antes de la inoculación.

2.5.4.4. Preparación de suspensiones bacterianas

La preparación de las suspensiones bacterianas se realizó con la metodología de INIFAP (2008) descritas en el literal 2.5.3.2.

2.5.4.5. Evaluación del efecto bacteriano sobre las plantas de maíz

Las plantas a los 10 días de ser sembradas en el sustrato, se inocularon con 5 mL de suspensión bacteriana preparada de cada cepa (Díaz *et al.*, 2001) a una concentración 10^7 UFC/mL (Fallik *et al.*, 1988). Se inocularon todas las plantas excepto las plantas testigo tratamiento donde se inoculó únicamente caldo nutritivo sin bacterias y el testigo absoluto al cual no se inoculó ningún microorganismo ni sustancia. Las plantas se mantuvieron en el invernadero durante seis semanas a partir de la inoculación, a condiciones de 23°C y 49% de humedad en promedio (Espinoza, 2004).

2.5.4.6. Procesamiento de las plantas y análisis estadístico de las variables.

Al finalizar las seis semanas del ensayo, las plantas fueron retiradas de las macetas separando el sustrato de las raíces teniendo cuidado de no quebrarlas. Las raíces fueron lavadas eliminando los restos de cascarilla o pomina proveniente del sustrato. Con las raíces limpias, se procedió a la medición de las variables: altura de planta, longitud de raíz y % de materia (Espinoza, 2004). Los datos registrados se analizaron mediante el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0

2.6. Análisis de datos

Cada fase de la investigación analizó sus variables de manera independiente; a continuación se reporta la fase y las variables con el tipo de análisis de datos empleado:

2.6.1. FASE I: Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas

Las variables analizadas en esta fase son las pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacterianas; cuyos resultados fueron del tipo cualitativo indicando si las muestras eran positivas (+) o negativas (-) para las pruebas, según la reacción química o metabólica que manifiesten (Gamazo *et al.*, 2005). Los resultados cualitativos se procesaron transformándolos en datos cuantitativos, asignándoles valores de: 1 cuando la prueba era positiva y 0 cuando la prueba era negativa. Con estos datos se generó una matriz binaria, la cual pudo ser analizada en el software NTSYS pc (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.02, para la obtención del respectivo dendrograma de agrupamiento por similitud de las muestras en cuanto a su metabolismo analizado (Junior *et al.*, 2004). Se tomó como patrón de referencia los resultados del género *Azospirillum* para cada prueba, reportados en bibliografía por Krieg y Döbereiner (1984) (Cuadro 1.5).

2.6.2. FASE II: Caracterización molecular de las cepas bacterianas

En esta fase la variable analizada fue los patrones de restricción generados por las tres endonucleasas empleadas en la metodología. Los patrones de corte observados en la fotografías tomadas a los geles de agarosa al 2,5% p/v, fueron procesados mediante la medición del peso molecular de cada banda con respecto al marcador molecular 100pb ADN Ladder (bandas de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y

1000 pb), generando así una matriz binaria de 1 = presencia de la banda y 0 = ausencia de la banda en el peso molecular analizado. Obtenida la matriz se procedió al agrupamiento de las muestras aplicando el software bioestadístico NTSYSpc (Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.02, para la obtención del respectivo dendrograma de agrupamiento por similitud de las muestras en cuanto a patrón de corte (Junior *et al.*, 2004).

2.6.3. FASE III: Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas

Las variables de esta fase poseen una relación directa con el crecimiento y desarrollo de las raíces de semillas de maíz, consideradas para evaluar el efecto de inoculación con las 20 cepas bacterianas. Las variables fueron: longitud de raíz, número de raíces principales desarrolladas y % de materia seca (INIFAP, 2008).

Longitud de raíz. La longitud de las raíces fue medida en centímetros con ayuda de un flexómetro. Los datos se registraron antes y a los tres días después de la inoculación con las cepas bacterianas (INIFAP, 2008). Finalmente, estos datos se ingresaron en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0., donde se obtuvo el Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Tukey al 5%. Los promedios adquiridos de esta variable se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

% Materia seca. Para obtener el porcentaje de materia seca se pesó las raíces en estado fresco y en estado seco, evaporando el agua en una estufa a 70°C por 48h. Los pesos se realizaron en una balanza analítica y su medida fue en gramos. El cálculo del % se realizó mediante la división del peso seco/el peso fresco*100, para la obtención del porcentaje que es la unidad de la variable (INIFAP, 2008).

Antes de realizar el análisis estadístico los datos se sometieron a una transformación angular, debido a que son datos expresados en porcentajes y estos, por regla general, se ajustan a una distribución binomial y no a la distribución normal. Para obtener esto los datos se transforman de porcentajes a ángulos ajustándose los valores a la normalidad (Sánchez, 2002). Realizada la transformación se realizó el Análisis de Varianza y la prueba de significancia Tukey al 5% en el software estadístico

InfoStat/Estudiantil versión 2.0. Los promedios obtenidos se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

Número de raíces principales desarrolladas. Esta variable se registró en números enteros, como resultado del conteo del número de raíces principales desarrolladas en las semillas, a los tres días de la inoculación con las 20 cepas bacterianas (INIFAP, 2008). Para el análisis estadístico de esta variable los datos obtenidos se sometieron a una transformación mediante raíz cuadrada, debido a que son datos procedentes de contajes y, por regla general, se ajustan a una distribución de Poisson (Sánchez, 2002). Para lograr que estos datos que se ajusten a la normalidad, se sumó a cada dato la constante 0,5 y de este valor se calculó la raíz cuadrada (Sánchez, 2002). Realizada la transformación se realizó el Análisis de Varianza y la prueba de significancia Tukey al 5% en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0. Los promedios obtenidos se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

2.6.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

Las variables de esta fase poseen una relación directa con el crecimiento de las plantas de maíz, consideradas para evaluar el efecto de inoculación con las 20 cepas bacterianas. Las variables fueron: altura de planta, longitud de raíz y % de materia (Espinoza, 2004).

Altura de planta. La altura de planta fue medida en centímetros con ayuda de un flexómetro. Los datos se registraron antes y a los 45 días después de la inoculación con las cepas bacterianas (Espinoza, 2004). Estos datos se analizaron en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0., donde se obtuvo el Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Tukey al 5%. Los promedios adquiridos de esta variable se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

Longitud de raíz. La longitud de las raíces fue medida en centímetros con ayuda de un flexómetro. Los datos se tomaron a los 45 días después de la inoculación con las cepas bacterianas (Espinoza, 2004). Finalmente, los datos se ingresaron en el

software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0., donde se obtuvo el Análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de significancia de Tukey al 5%. Los promedios adquiridos de esta variable se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

% Materia seca. Se pesó toda la planta (raíces, tallo y hojas) en estado fresco y en estado seco, evaporando el agua en una estufa a 70°C por 48h. Los pesos se realizaron en una balanza analítica y su medida fue en gramos. El cálculo del % se realizó mediante la división del peso seco/peso fresco*100 (INIFAP, 2008).

Antes de realizar el análisis estadístico los datos se sometieron a una transformación angular. Los datos expresados en porcentajes, por regla general, se ajustan a una distribución binomial y no a la distribución normal. Estos se transformaron de porcentajes a ángulos ajustándose los valores a la normalidad (Sánchez, 2002). Posteriormente, se realizó el análisis de varianza y la prueba de significancia Tukey al 5% en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0. Los promedios obtenidos se graficaron en barras visualizándose el promedio mayor y menor de todos los tratamientos (Sánchez, 2002).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacteriana

3.1.1. Reactivación y purificación

Las 20 cepas bacterianas del INIAP se reactivaron del estado de liofilización en el que se encontraban almacenadas. Diecisiete de ellas presentaron cultivos puros después de reactivarlas y sembrarlas en el medio agar AM-RC. En las 17 cepas las colonias fueron morfológicamente iguales (Figura 3.1 A); mientras que, las cepas restantes (c5, c8 y c20) presentaron colonias con morfologías distintas (Figura 3.1 B). La purificación de cada colonia diferente (Figura 3.1. B flechas) dio como resultado colonias de color rojas, rojas anaranjadas, fucsias y blanquecinas en el medio agar AM-RC. El color característico de las colonias de *Azospirillum* desarrolladas en dicho medio es rojo escarlata (Figura 3.2 A), por lo que se descartó aquellas que no presentaron esta característica, considerándolas como contaminación (Figura 3.2 B).

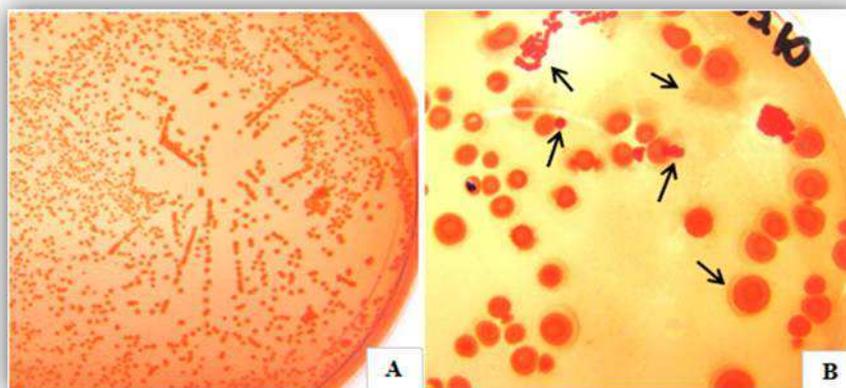


Figura 3.1. Purificación y siembra en agar AM-RC de las 20 cepas bacterianas reactivadas. A. Cultivo bacteriano puro con la presencia de colonias morfológicamente iguales. B. Cultivo bacteriano donde se observa la presencia de colonias con morfologías diferentes, provenientes del microtubo de almacenamiento correspondiente.

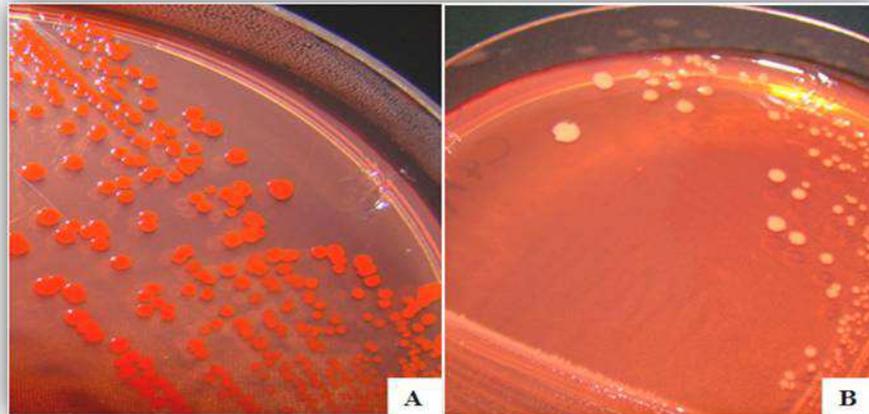


Figura 3.2. Identificación de colonias contaminantes. A. Colonias bacterianas de interés, por la presencia del color rojo escarlata, característica reportada para el género *Azospirillum*. B. Colonias bacterianas contaminantes, debido a que no presentan el color de colonia característico.

3.1.2. Identificación microbiológica

3.1.2.1. Descripción morfológica de colonias bacterianas

La descripción de colonias de las 20 cepas bacterianas purificadas se registró en el Anexo C. En la figura 3.3 se ilustran las morfologías coloniales obtenidas, las cuales presentaron tamaños variables con una media de 2,2 mm ($\sigma = 0,09$), permitiendo calificarlas como colonias pequeñas (<2,2 mm), medianas (=2,2 mm) y grandes (>2,2 mm). La forma de las colonias en la mayoría fue circular, a excepción de la cepa 3 con forma irregular. La elevación varió entre pulvinada (c1 y c8), umbonada (c3), elevada (c9,c10,c11,c12,c14,c17,c19) y convexa (c2,c4,c5,c6,c7,c13,c15,c16,c18,c20). El margen o borde en casi todas fue entero, a excepción de las cepas 2, 3, 4 y 18, donde su margen fue ondulado. La superficie varió entre lisa brillante para las cepas 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 19 y lisa mate en el resto. Las cepas 3, 13 y 15 tuvieron consistencia viscosa, mientras el resto fueron de consistencia cremosa. Finalmente, el color para algunas cepas fue crema (cepas: 2, 4, 5, 6, 8, 16, 18 y 20) y en el resto fue amarillo brillante, tomando en cuenta que los colores se asignaron a criterio del autor.

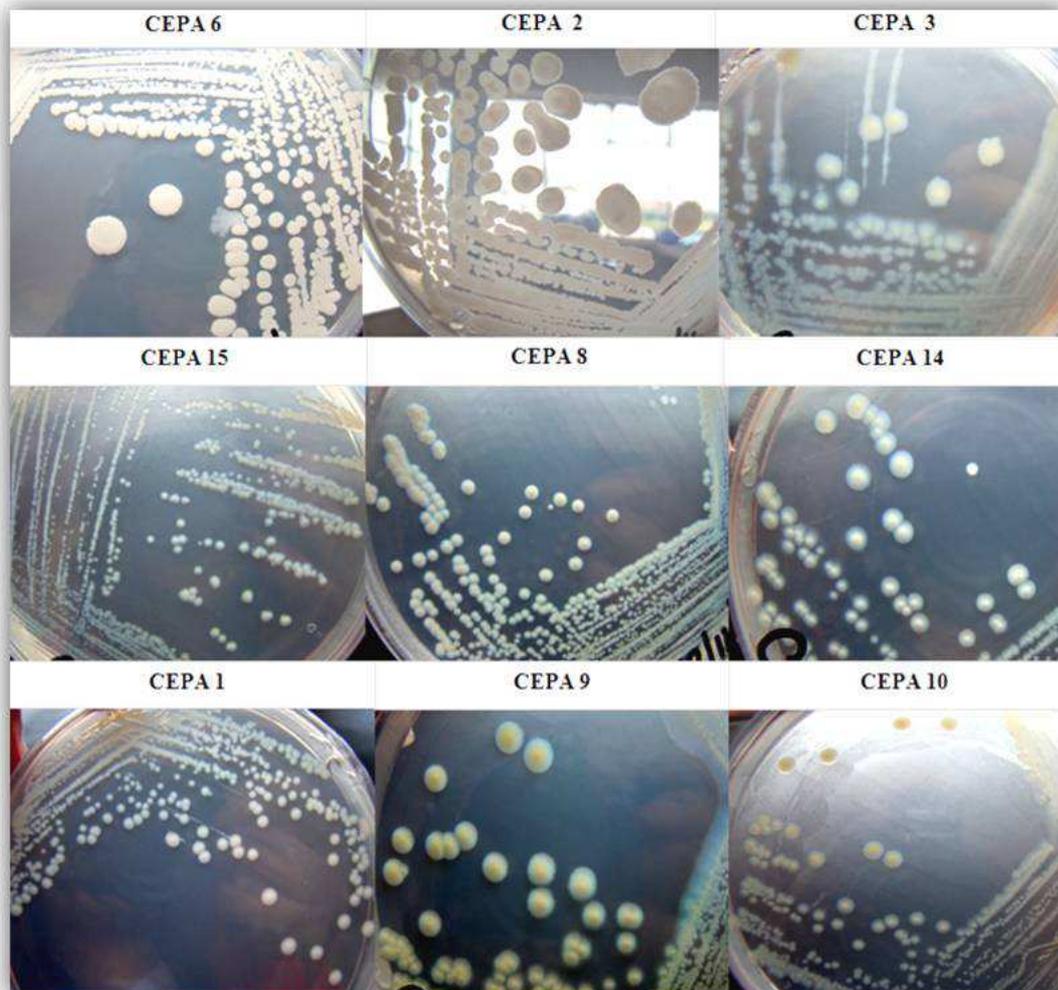


Figura 3.3. Colonias puras de las cepas bacterianas cultivadas en AN a 30°C por 48h, a partir del cual, se realizó su descripción morfológica.

3.1.2.2. Pruebas bioquímicas

3.1.2.2.1. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Azospirillum*.

Los resultados de la identificación bioquímica de las 20 cepas bacterianas, utilizando las pruebas específicas para el género *Azospirillum* descritas en el cuadro 1.5, se reportan en el Anexo D. A continuación la descripción de los resultados obtenidos:

En la prueba de tinción Gram se identificó que las cepas 2, 4, 5, 6, 16, 18 y 20 correspondieron a bacilos largos ligeramente curvados Gram (+); mientras, que el resto de cepas (1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 19) presentaron ser bacilos pequeños y rectos Gram (-). Esta primera clasificación morfológica celular se ilustra en la figura 3.4, discrepando totalmente con los resultados reportados para *Azospirillum* en la figura 1.1 y cuadro 1.5.

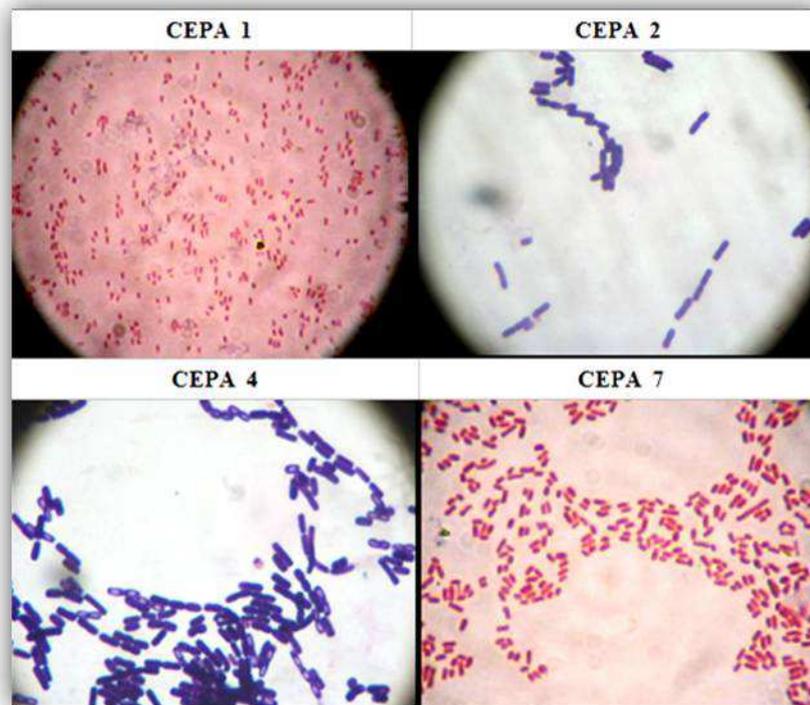


Figura 3.4. Pruebas bioquímicas de tinción Gram y forma celular realizadas a las cepas bacterianas del INIAP. Cepas 1 y 7: bacilos Gram (-). Cepas 2 y 4: bacilos Gram (+). Vista microscópica, aumento 1000X.

En cambio, la prueba de tinción del polímero Poli- β -hidroxibutirato, para todas las cepas resultó ser negativo. En la figura 3.5, se evidencia el resultado de las cepas 6 y 12, como negativos al no observarse los gránulos del polímero teñidos de color negro en el interior de la célula bacteriana, en comparación a los gránulos teñidos reportados para *Azospirillum lipoferum* en la figura 1.1.

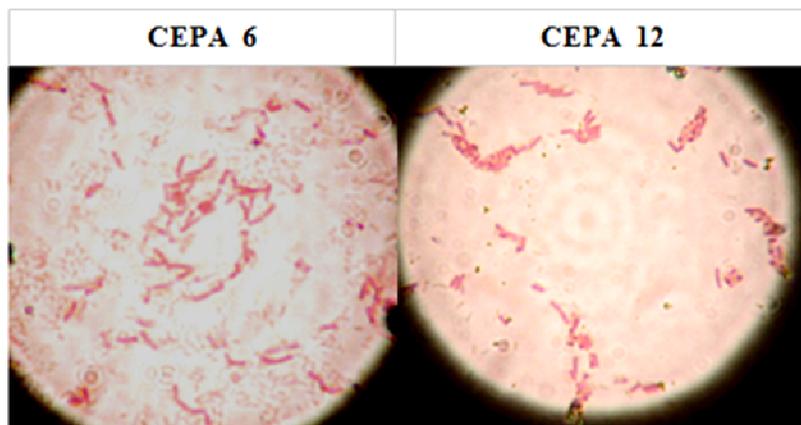


Figura 3.5. Prueba bioquímica de tinción del β -Polihidroxitirato realizada a las cepas bacterianas del INIAP. Vista microscópica, aumento 1000X.

El resto de pruebas bioquímicas reportaron resultados distintos a los esperados para el género en estudio. La prueba de ureasa indicó que únicamente las cepas 1, 2, 4, 5, 6, 13, 16, 18 y 20 degradan la urea, el resto de cepas no. Lo mismo, indicó la prueba de lactosa, donde todas fueron negativas, a excepción de la cepa 1 que resultó utilizar la lactosa como fuente de carbono. En la prueba de reducción de nitratos a nitritos las cepas: 2, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 16, 18 y 20 fueron positivas, el resto simplemente no produce ninguna reacción.

Para la prueba de crecimiento en el medio NFB semisólido, varias cepas evidenciaron que utilizan el malato, agregado al medio, como fuente de carbono al evidenciar un viraje del indicador azul de bromotimol de verde a azul. Las cepas que usaron el malato como fuente de carbono fueron: 1, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 y 19.

Por otro lado, en este medio todas las cepas crecieron mostrando la morfología de un velo blanquecino, y en otros casos de color amarillento, sobre la superficie (Figura 3,6). Este resultado indicó que ninguna de las cepas es diazotrófica (fijadora de nitrógeno), ya que para realizar este proceso se necesita de condiciones microaerófilas (concentraciones bajas de oxígeno), las cuales únicamente se consiguen creciendo bajo la superficie del medio como se reporta en la cuadro 1.5 para el género *Azospirillum*.

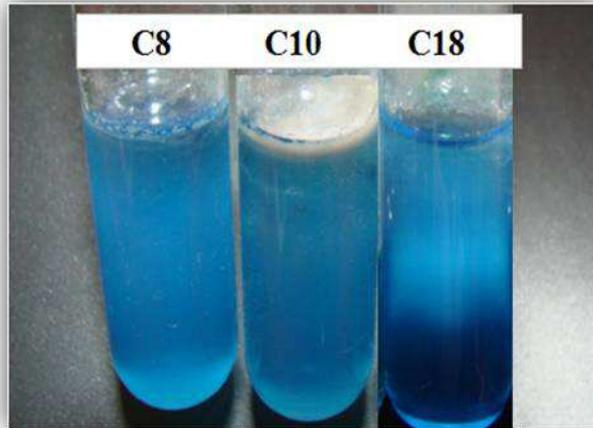


Figura 3.6. Morfología de crecimiento de las cepas bacterianas en el medio de cultivo NFB semisólido (medio libre de nitrógeno)

Las pruebas de catalasa, oxidasa y motilidad resultaron ser positivas en todas las cepas, mientras que las pruebas sulfatos e indol fueron negativas para todas las muestras (Figura 3.7).

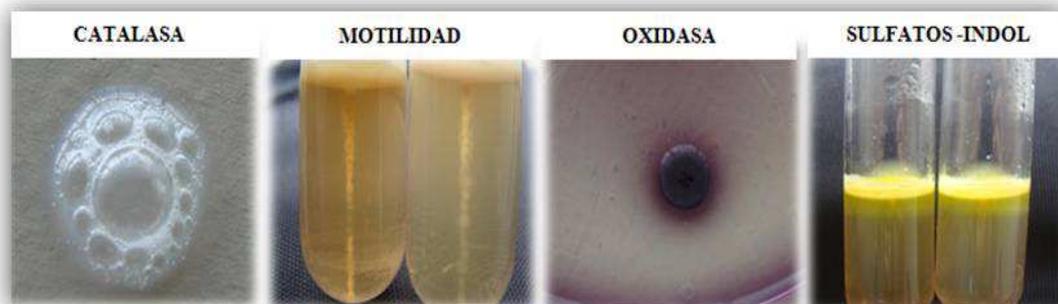


Figura 3.7. Pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacterianas. De izquierda a derecha: Prueba de catalasa positiva; prueba de motilidad positiva; prueba de oxidasa positiva y pruebas de sulfatos e indol negativas.

Por último, la descripción de la morfología de colonia para las 20 cepas sembradas en el medio de cultivo agar AM-RC se encuentran reportadas en el Anexo E. Las colonias presentaron tamaños variables con una media 1,54 mm ($\sigma = 0,13$), permitiendo calificarlas como colonias pequeñas ($<1,54$ mm), medianas ($=1,54$ mm) y

grandes (>1,59 mm). En la mayoría de las muestras la forma de colonia se presentó circular, a excepción de las cepas 3, 9, 10, 12 y 19 cuya forma fue irregular. La elevación varió entre pulvinada (c1, c8), convexa (c2,c4,c5,c6,c7,c13,c15,c16,c17,c18) y umbonada (c3,c9,c10,c11,c12,c14,c19). El margen o borde de las colonias para todas fue entero, excepto para las cepas 2, 3, 4, 9, 10, 12, 17 y 19 que presentaron un margen ondulado. La superficie para todas las colonias fue lisa variando en algunas mate (c2,c4,c5,c6,c16,c18,c20) y el resto brillantes. La consistencia en la mayoría fue cremosa, menos para las cepas 3, 13 y 15 que presentaron consistencia viscosa. Finalmente, el color varió entre rojo para las cepas 1 y 7, naranja con centros rojizos para la cepa 4 y el resto de las cepas con un color rojo anaranjado, considerando que los colores se asignaron a criterio del autor.

En la figura 3.8 se ilustra varias de las morfologías de colonia descritas, siendo evidente que estos resultados no coinciden con la morfología de colonia reportada en el cuadro 1.5 para el género *Azospirillum*, para dicho medio.

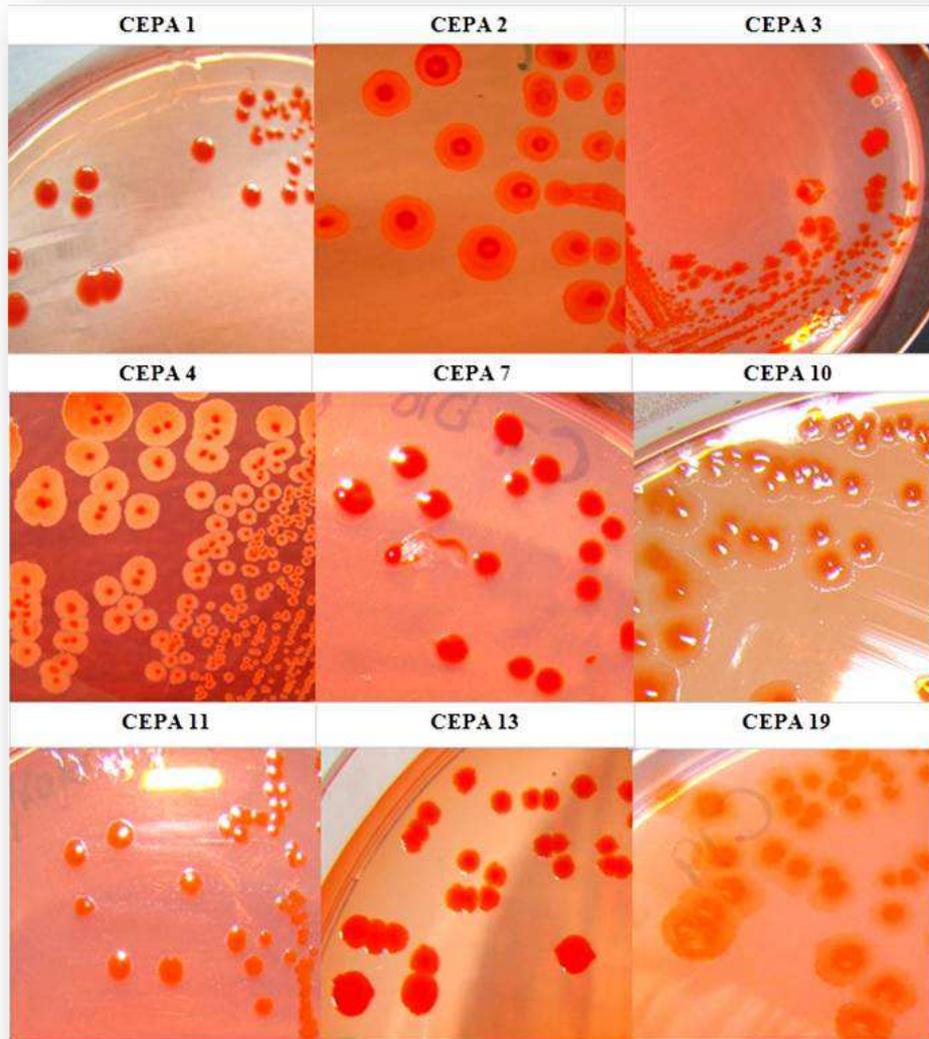


Figura 3.8. Colonias puras de las cepas bacterianas cultivadas en el medio de cultivo agar AM-RC por siete días a 30°C; a partir del cual, se realizó la descripción morfológica.

3.1.2.2.2. Pruebas bioquímicas para identificación de especies dentro del género *Azospirillum*.

Los resultados de las pruebas realizadas para identificar las especies de: *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense* se encuentran reportados en el Anexo F. Estos resultados indicaron que las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 13, 16, 18 y 20 utilizan al citrato como única fuente de carbono; mientras, el resto de muestras no lo metabolizan. La mayoría de las cepas usa la glucosa como única fuente de carbono, a excepción de las cepas 7, 8

y 15 que no la metabolizan. Finalmente, la morfología de colonia presentada por las muestras al sembrarlas en el medio agar BSM fue: colonias rosadas, convexas y rugosas para las cepas 2, 4, 5, 6, 16, 18 y 20; colonias blancas, convexas y lisas para las cepas 1, 7, 8, 9, 11, 12, 13 y 15; y, colonias amarillas, convexas y lisas en las cepas 3, 10, 14, 17 y 19.

En resumen, la figura 3.9 indica el dendrograma obtenido de la unificación de los resultados de todas las pruebas bioquímicas realizadas a las muestras, junto con los reportados en bibliografía para el género *Azospirillum*. Las muestras se agruparon por la similitud en sus resultados. Se observó que el coeficiente de similitud entre todas las muestras fue del 0,66, y a partir de este valor se dio la formación de dos grupos: grupo I y grupo II.

El grupo I se dividió en los subgrupos A, B y C, mostrando un coeficiente de similitud entre ellos de 0,80. El subgrupo A, conformado únicamente por las tres especies de *Azospirillum* (*A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*), indicó que ninguna de las cepas bacterianas presentó el mismo perfil metabólico de estas especies. El subgrupo B lo conforman las cepas 1 y 13 con un coeficiente de similitud entre ellas del 0,92, la diferencia radicó en el resultado de una prueba bioquímica (lactosa). El subgrupo C, se encuentra conformado por las cepas 2, 4, 5, 6, 16, 18 y 20 cuyo coeficiente de similitud es de 1, indicando que todos los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas fueron iguales para estas muestras.

El grupo II, se encuentra conformado por los subgrupos D, E y F. El coeficiente de similitud para estos tres subgrupos fue del 0,89. El subgrupo D se encuentra conformado por las muestras 11, 14, 17 y 19 cuya similitud en los resultados de las pruebas realizadas fue del 100%, discrepando en un resultado (prueba de citrato) la cepa 3 por lo que el coeficiente de similitud de ésta con el resto del subgrupo fue del 0,93. El subgrupo E lo conformó las cepas 7, 8 y 15, cuyos resultados fueron iguales para todas las pruebas (coeficiente de similitud 1). Finalmente, el subgrupo F lo conformó las cepas 9, 10 y 12 cuyo coeficiente de similitud también fue de 1, indicando resultados iguales en las pruebas realizadas.

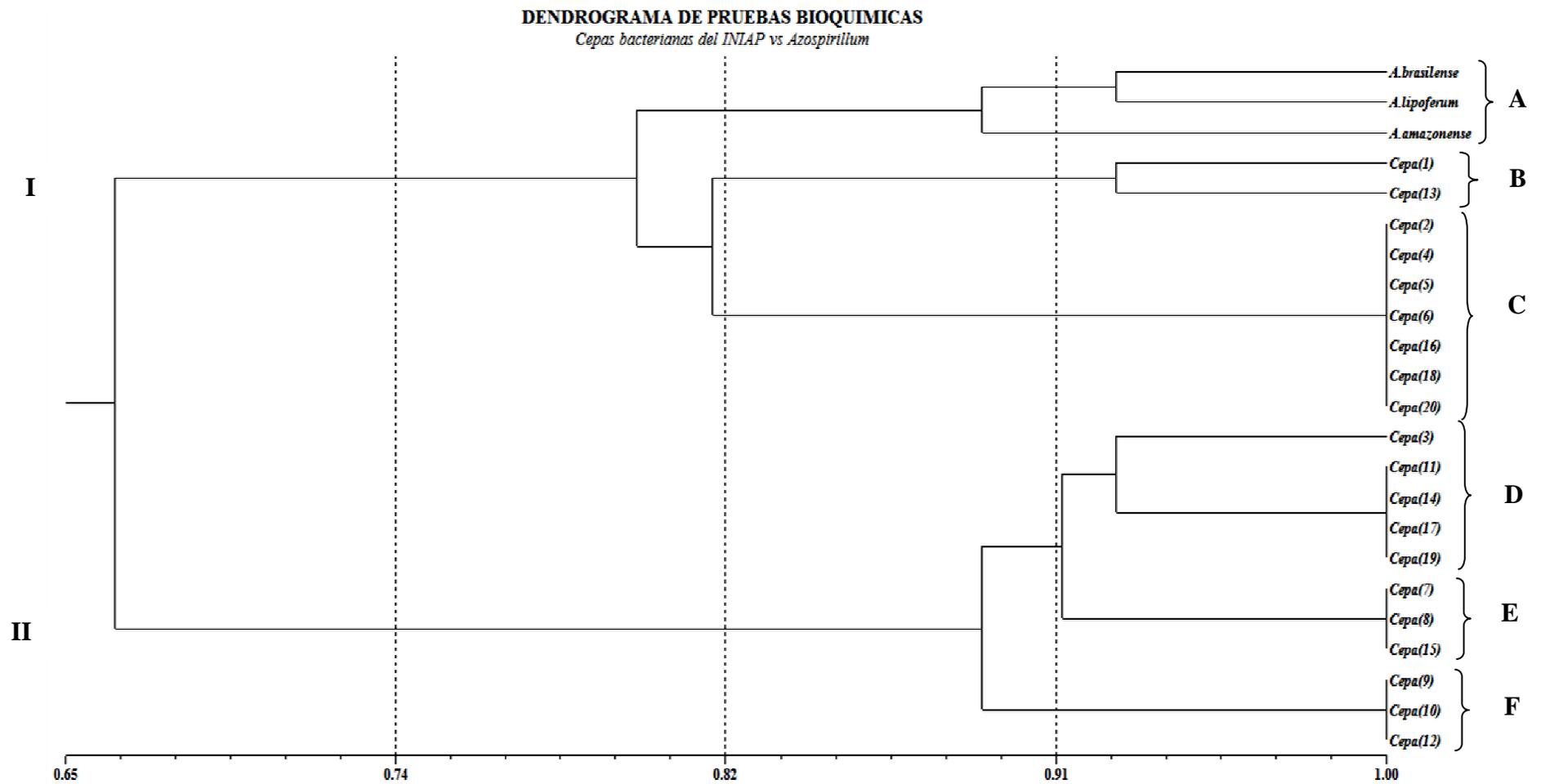


Figura 3.9. Dendrograma de agrupamiento por similitud en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las 20 cepas bacterianas, junto con los resultados reportados para las especies de *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*.

3.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

3.2.1. Extracción, calidad y cantidad del ADNg

La extracción de ADN genómico bacteriano se realizó aplicando únicamente el protocolo modificado por Francisco Jarrin de Weising *et al.*, 1995. Este fue previamente validado en el Centro Internacional de la Papa (CIP) del INIAP para bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Con este protocolo se obtuvieron ADNs genómico, de las 20 cepas bacterianas, sin signos de degradación o fragmentación y con la ausencia de contaminantes como proteínas y ARN (Figura 3.10). Todos los ADNg fueron visualizados en geles de agarosa al 1% p/v y cuantificados, tanto por electroforesis como por fluorometría, dando como resultado una concentración promedio de 62,74 ng/ μ L, para todas las muestras bacterianas.

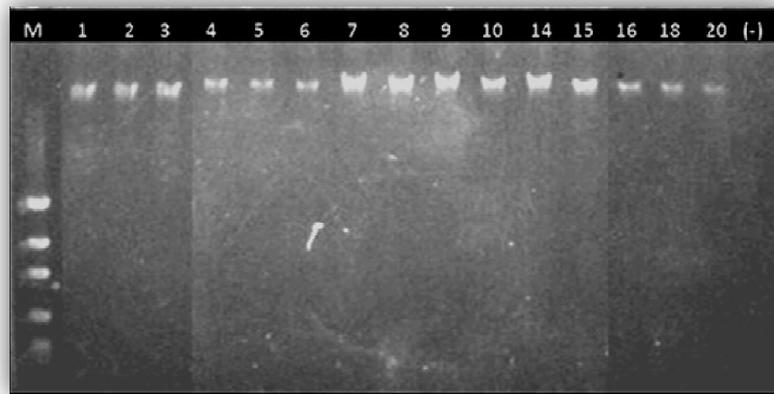


Figura 3.10. Visualización del ADN genómico extraído de las 20 cepas bacterianas en geles de agarosa al 1%p/v. De izquierda a derecha: Carril 1: Marcador molecular. Carriles 2-16: muestras de ADN bacteriano. Carril 17: Control negativo del protocolo de extracción.

3.2.2. Amplificación y visualización del gen 16S ADN ribosomal

La reacción de PCR fue eficiente con la metodología empleada. Los iniciadores universales 8f y 1492r permitieron amplificar de manera independiente el gen 16Sr de las 20 muestras de ADN bacteriano, observándose fragmentos de aproximadamente 1500 bp, variando entre 1300 a 1450 bp, según el marcador 100 bp ADN Ladder. Estos fragmentos se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% p/v (Figura 3.11).

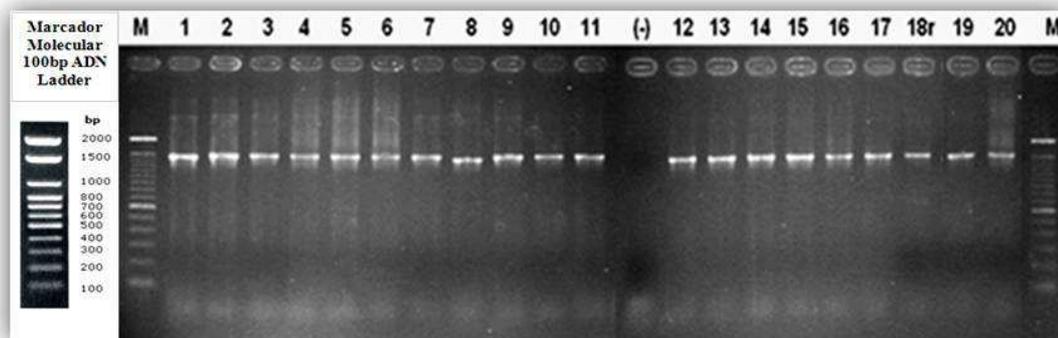


Figura 3.11. Visualización del gen 16S ADN ribosomal amplificado de las 20 muestras bacterianas, en geles de agarosa al 1,5% p/v. De Izquierda a derecha: Carril 1 y 23: marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-12: producto amplificado de las muestras bacterianas. Carril 13: control negativo de la reacción PCR. Carriles 14-22: producto amplificado de las muestras bacterianas.

3.2.3. ARDRA

3.2.3.1. Restricción enzimática virtual

Las enzimas a usarse en la técnica ARDRA, como resultado de la restricción enzimática virtual con las tres secuencias obtenidas de: *A. brasilense sp7*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*, fueron: *AluI*, *TaqI* y *EcoRI*. La selección de estas tres enzimas resultó ser idónea, debido a que generaron patrones de bandas diferentes para cada especie y un número considerable de fragmentos con sus pesos moleculares respectivos, distinguibles en geles de agarosa (Figura 3.12). En la tabla 3.1 se registra la enzima, las tres secuencias analizadas, el número de bandas obtenidas y los pesos moleculares correspondientes a cada fragmento generado con la restricción virtual.

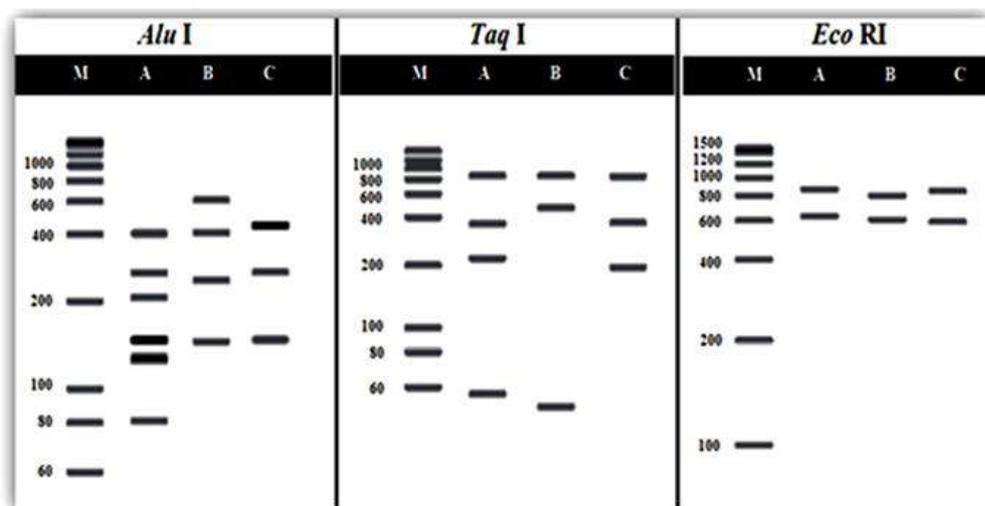


Figura 3.12. Cortes enzimáticos virtuales del gen 16S ADNr de especies de *Azospirillum* con las endonucleasas *AluI*, *TaqI* y *EcoRI*. De izquierda a derecha: Carril M: marcador molecular impuesto por el software. Carril A: *Azospirillum amazonense*. Carril B: *Azospirillum brasilense* sp7 y Carril C: *Azospirillum lipoferum*.

Tabla 3.1. Patrones o genotipos de corte enzimáticos para el gen 16S ADNr de las secuencias pertenecientes al género *Azospirillum* obtenidas del RDB.

ENZIMA	MICROORGANISMO	# BANDAS	PESO MOLECULAR (pb)
<i>AluI</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> sp7	4	150, 250,480,610
	<i>Azospirillum lipoferum</i> (T)	4	150,250,480
	<i>Azospirillum amazonense</i> N39	5*	130, 150,200,280,400
<i>Taq I</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> sp7	2*	500, 850
	<i>Azospirillum lipoferum</i> (T)	3	200, 400, 850
	<i>Azospirillum amazonense</i> N39	3*	200, 380,850
<i>EcoRI</i>	<i>Azospirillum brasilense</i> sp7	2	650, 850
	<i>Azospirillum lipoferum</i> (T)	2	600, 800
	<i>Azospirillum amazonense</i> N39	2	650,850

*número de fragmentos mayores a 100pb.

Las tres enzimas, seleccionadas virtualmente, generaron porcentajes de polimorfismo teniendo que para *AluI* se obtuvieron un total de trece bandas, de las cuales 8 fueron polimórficas y 5 fueron únicas, dando como resultado un porcentaje de polimorfismo del 61,53% y 38,46% de bandas únicas. La enzima *TaqI* generó un total de 8 bandas, donde 5 fueron polimórficas dando un 62,5% de polimorfismo y 3 bandas

únicas representadas en un 37,5%. Finalmente, la enzima *EcoRI* presentó un total de 6 bandas generando un porcentaje de polimorfismo 66.66% y 33.33% como porcentaje para bandas únicas.

Los fragmentos obtenidos mediante la restricción virtual con la enzima *AluI* para las especies *A. brasilense* sp7 y *A. lipoferum* fueron tomados como controles positivos para identificar dicho género. La validez de esta consideración radicó en que los pesos moleculares de dichos fragmentos fueron los mismos para los reportados en bibliografía en la figura 1.2, donde los pesos de los fragmentos fueron de 150, 250, 480, 610 pb para el gen 16Sr de la especie *A. brasilense* sp7 y 150, 250, 480 pb para la especie *A. lipoferum*.

A partir de esta consideración, las tres enzimas fueron empleadas para realizar los cortes enzimáticos en los genes 16Sr de las 20 cepas bacteriana del INIAP, teniendo como resultado los siguientes análisis:

3.2.3.2. Análisis ARDRA con la enzima *AluI*

Esta enzima generó 8 genotipos o patrones de restricción diferentes para todas las muestras (Figura 3.13). Cada cepa presentó un número específico de fragmentos, siendo el mayor número 5 y el menor 3. En la tabla 3.2 se evidencia los genotipos generados, el número de fragmentos obtenidos por muestra con sus respectivos pesos moleculares.

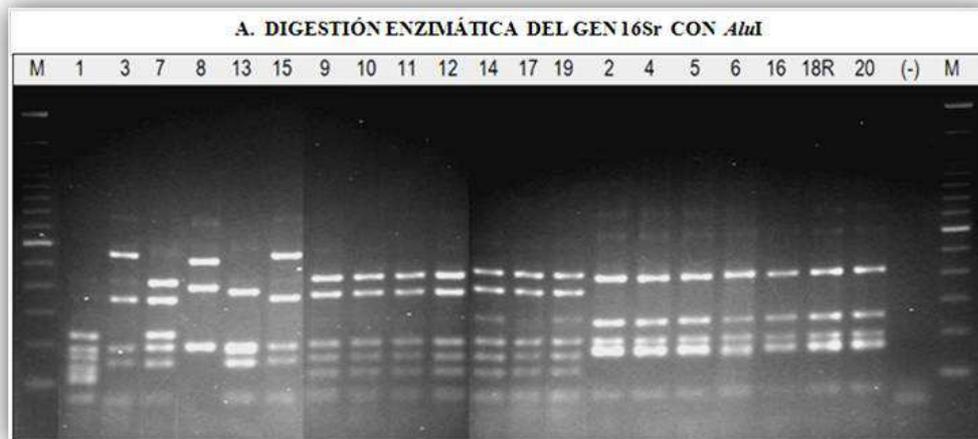


Figura 3.13. Digestión enzimática del gen 16S ADN_r de las 20 cepas bacterianas con la endonucleasas *AluI*. De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras bacterianas del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.

Tabla 3.2. Genotipos obtenidos con la enzima *AluI* para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP

GENOTIPO	MUESTRAS	# BANDAS	PESOS MOLECULARES (PB)
I	1	5	110,130,150,180,220
II	2,4,5,6,16,18,20	4	180,220, 280 ,450
III	3	4	150,200,350,550
IV	7	5	130,180,220,320, 400
V	8	3	180, 390 , 500
VI	9,10,11,12,14,17,19	5	110,150,220,350, 450
VII	13	3	130,180, 350
VIII	15	4	130,180,320,550

Números en negrillas indican bandas únicas.

La restricción con esta enzima generó un total de 122 bandas entre los 8 genotipos para todas las cepas evaluadas; de las cuales, 15 bandas fueron polimórficas y 6 bandas únicas (negrillas) dando como resultado un porcentaje de polimorfismo del 12,29% y 4,91% bandas únicas para la enzima *AluI*.

3.2.3.3. Análisis ARDRA con la enzima *TaqI*

Esta enzima también generó 8 genotipos o patrones de restricción diferentes para todas las muestras bacterianas (Figura 3.14). Al mismo tiempo que, cada cepa presentó un número específico de fragmentos, siendo el mayor número de bandas 5 y el menor 3. En la tabla 3.3 se evidencia los genotipos generados, el número de fragmentos obtenidos por muestra con sus respectivos pesos moleculares.

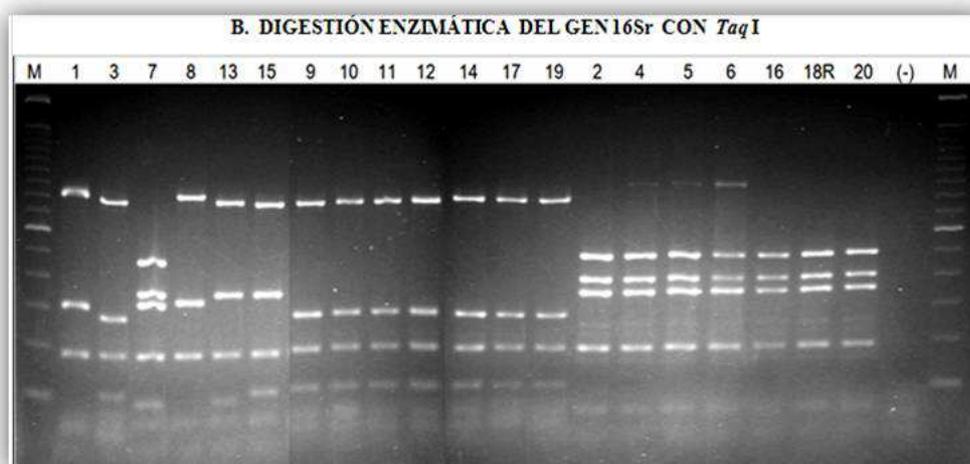


Figura 3.14. Digestión enzimática del gen 16S ADNr de las 20 cepas bacterianas con la endonucleasas *TaqI*. De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras bacterianas del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.

Tabla 3.3. Genotipos obtenidos con la enzima *TaqI* para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP

GENOTIPO	MUESTRAS	# BANDAS	PESOS MOLECULARES (PB)
I	1	3	200,300, 850
II	2,4,5,6,16,18,20	4	200, 350, 400,500
III	3	4	100,200,280,700
IV	7	5	100,200,300,350, 450
V	8	3	200,300, 750
VI	9,10,11,12,14,17,19	4	120,200,280,700
VII	13	4	100,200,350,700
VIII	15	4	120,200,350,700

Números en negrillas indican bandas únicas.

La restricción con *TaqI* generó un total de 79 bandas entre los 8 genotipos para todas las cepas evaluadas; de las cuales, 12 bandas fueron polimórficas y 5 únicas (negrillas) dando como resultado un porcentaje de polimorfismo del 15,18% y 6,32% bandas únicas para la enzima *AluI*.

3.2.3.4. Análisis ARDRA con la enzima *EcoRI*

Por el contrario, la restricción enzimática del gen 16Sr con *EcoRI*, dio como resultado un solo corte en la mayoría de las muestras visualizándose, en los geles de agarosa al 2.5% p/v, dos fragmentos de tamaños diferentes según el marcador molecular 100 bp ADN Ladder. También, dio lugar a la formación de 4 genotipos o patrones de restricción diferentes entre todas las muestras bacterianas (Figura 3.15). En la Tabla 3.4 se evidencia los genotipos generados, el número de fragmentos obtenidos por muestra con sus respectivos pesos moleculares.

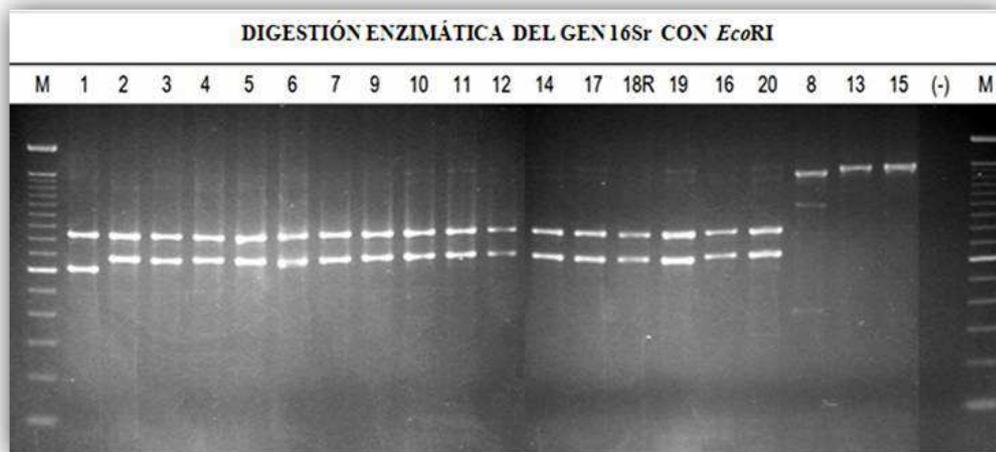


Figura 3.15. Digestión enzimática del gen 16S ADNr con la enzima *EcoRI*. De izquierda a derecha: Carril 1 y 23: Marcador molecular de 100 bp ADN Ladder. Carriles 2-21: muestras del gen 16Sr digerido. Carril: 22: control negativo de la PCR digerido.

Tabla 3.4. Genotipos obtenidos con la enzima *EcoRI* para el gen 16Sr de las cepas bacterianas del INIAP

GENOTIPO	MUESTRAS	# BANDAS	PESOS MOLECULARES (PB)
I	1	2	600,850
II	2,3,4,5,6,7,9,10,11, 12,14,16,17,18,19,20	2	650,800
III	13,15	1	1450
IV	8	1	1300

Números en negrillas indican bandas únicas.

La restricción con *EcoRI* generó un total de 37 bandas entre los 4 genotipos para todas las cepas evaluadas; de las cuales, 6 bandas fueron polimórficas únicas (negrillas) dando como resultado un porcentaje de polimorfismo del 16,21% para esta enzima.

3.2.3.5. Análisis de agrupamiento

Se realizó el agrupamiento de los resultados de cada enzima generando una matriz binaria de ausencia y presencia a partir de las bandas obtenidas en la restricción. Se incluyó los patrones de restricción virtual de las especies *Azospirillum brasilense* sp7, *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum amazonense* (Tabla 2.3), que ingresaron como patrones positivos para el análisis. El dendrograma generado con estos datos se ilustra en la figura 3.16.

El dendrograma indicó que todas las muestras poseen un coeficiente de similitud genotípica del 18%, a partir del cual se formó la primera ramificación dando lugar a dos grupos: el grupo I y el grupo II.

El grupo I se encuentra conformado por los subgrupos A, B y C con un coeficiente de similitud (CS) entre ellos de 0,26. El subgrupo A asoció a las cepas 1 y 8 con un CS de aproximadamente 0,36. El subgrupo B relacionó a las cepas 2, 4, 5, 6, 16, 18 y 20 con CS equivalente a 1, indicando que se trata del mismo gen 16Sr y en términos taxonómicos pertenecen al mismo género bacteriano. Y, el subgrupo C con las cepas 3, 9, 10, 11, 12, 14, 17 y 19 presentando un CS para todas de 0,85.

En cambio, el grupo II se dividió en dos subgrupos: D y E, teniendo entre ellos un CS de 0,59. El subgrupo D relacionó a las cepas 7, 13 y 15 con un coeficiente de similitud genotípica de 0,53. Las cepas 13 y 15 presentaron genotipos similares visualizándose una similitud del 82% aproximadamente. Finalmente, el subgrupo E se encuentra conformado por las tres especies de *Azospirillum* tomadas como controles positivos para este análisis.

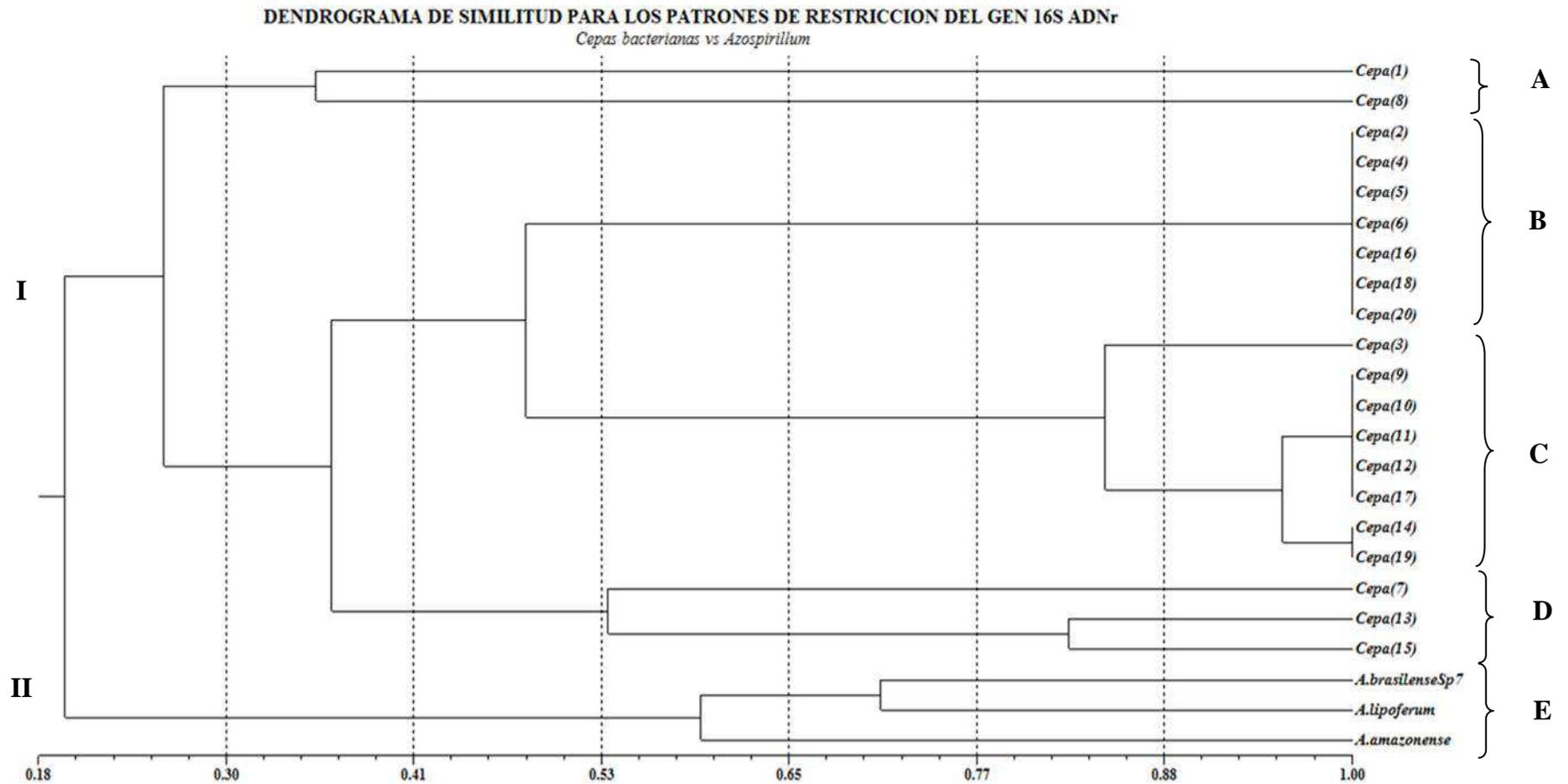


Figura 3.16. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para de los patrones de restricción enzimática del gen 16S ADN_r (ARDRA) de las 20 cepas bacterianas y tres especies del género *Azospirillum* con las enzimas: *AluI*, *TaqI* y *EcoRI*.

3.2.4. Secuenciación del gen 16S ADN ribosomal

Los productos amplificados del gen 16Sr de las 20 muestras bacterianas, fueron cuantificados en geles de agarosa al 1%p/v, obteniendo concentraciones entre 100 y 150 ng/μL aproximadamente (Figura 3.11). Los fragmentos se enviaron a los Laboratorios MACROGEN Inc. en la República de Corea (Anexo C), donde fueron purificados y secuenciados. Los resultados de la secuenciación fueron remitidos por los laboratorios en formato pdf. para los cromatogramas y en formato (.ab1) para las secuencias.

3.2.5. Edición y registro de las secuencias obtenidas

Los resultados de las secuencias junto con los cromatogramas (Figura 3.17) otorgados por MACROGEN fueron editados en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9, teniendo como resultado el alineamiento de la secuencia obtenida con el iniciador 8f con la secuencia del iniciador 1492r de cada muestra. Este alineamiento dio como resultado 17 secuencias consenso en formato FASTA (Anexo D), con las cuales se realizaron los análisis posteriores de identificación taxonómica.

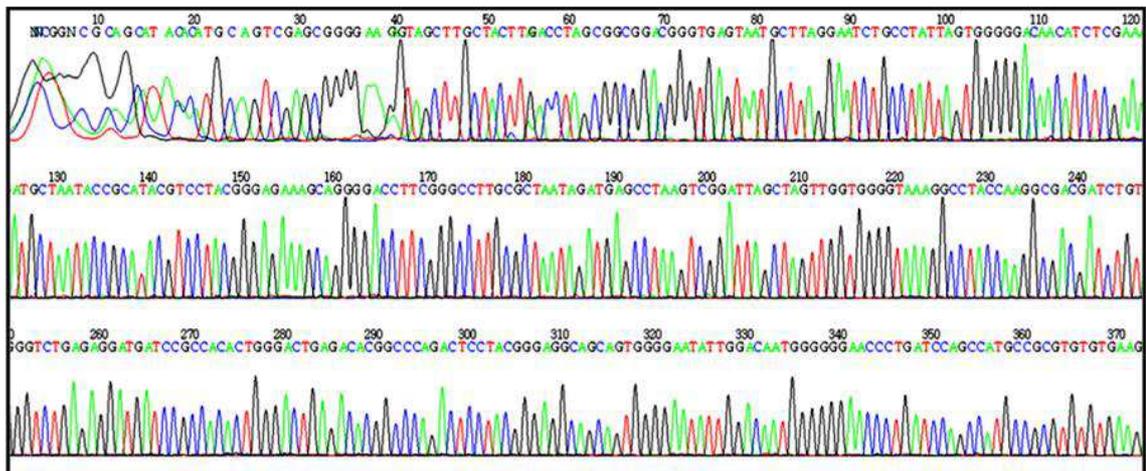


Figura 3.17. Cromatograma obtenido del secuenciador automático ABI-3730xl para la secuencia del gen 16Sr de la cepa 4 usando el iniciador 8f.

Tres de las 20 secuencias remitidas por MACROGEN, generaron inconvenientes al momento de su edición y alineamiento. Las secuencias correspondieron a las cepas 6, 10 y 15. Como se observa en la figura 3.18, los inconvenientes fueron:

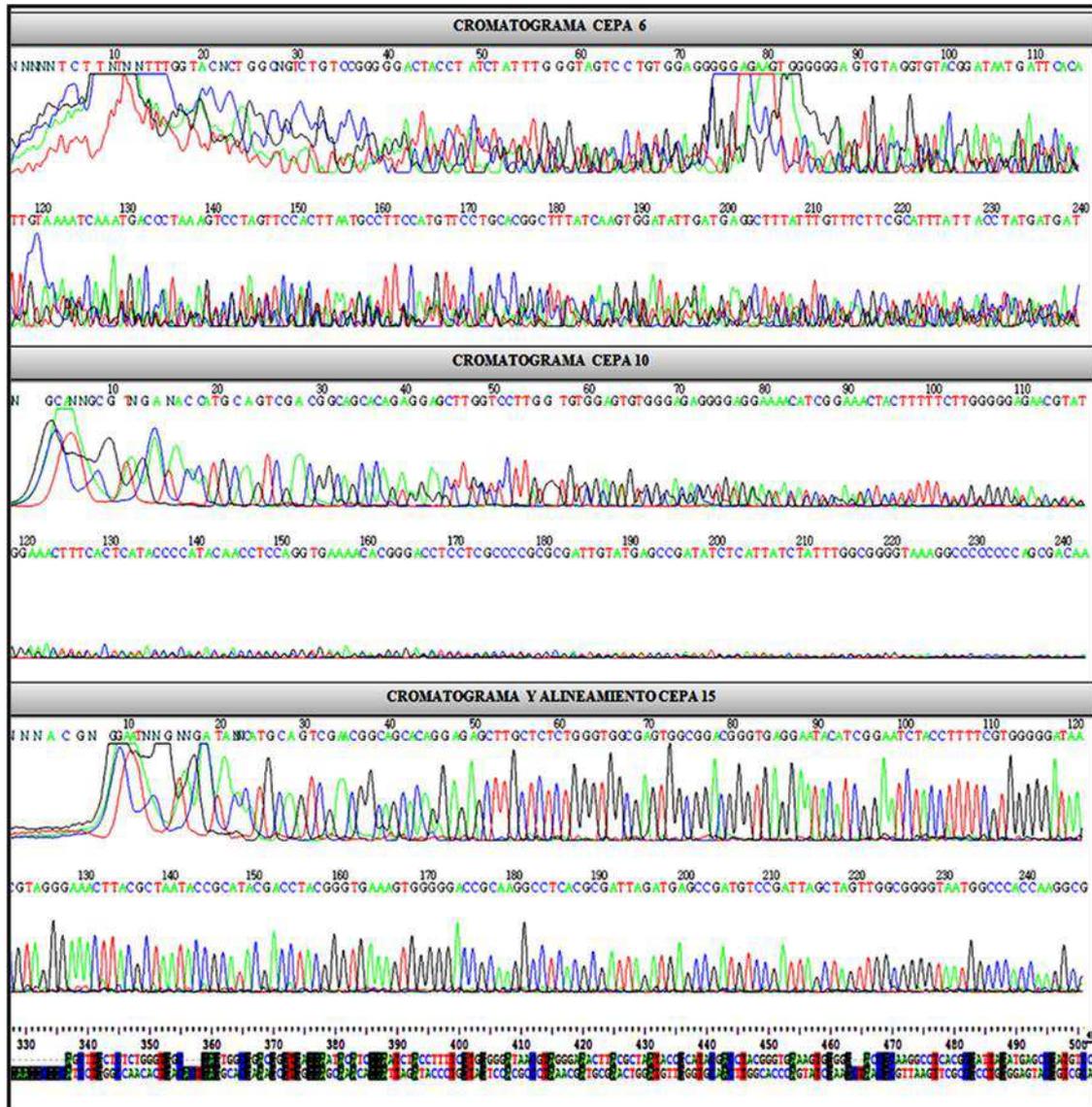


Figura 3.18. Cromatogramas problema pertenecientes a las cepas 6,10 y 15.

La cepa 6 mostró como resultado en su cromatograma la presencia de dobles picos; es decir, el ADN secuenciado se encontraba contaminado. Los picos dobles poseen cierta similitud indicando que la contaminación fue con otro gen 16Sr amplificado. Una mala manipulación de la muestra pudo causar contaminación cruzada con otra de las 20 cepas, imposibilitando el análisis de su secuencia.

La cepa 10, en su cromatograma presentó que los picos formados disminuyeron súbitamente su señal en la par de base 120, limitando la lectura del resto de nucleótidos y la credibilidad de los datos. Esto se debió a que en el proceso de purificación de la muestra se disminuyó considerablemente la concentración de ADN siendo insuficiente para secuenciarlo.

Y, la cepa 15 presentó un buen cromatograma, pero el alineamiento en el programa Bioedit de las secuencias forward y reverse no fue posible, indicando que las secuencias no eran complementarias e impidiendo la obtención de la secuencia consenso.

Finalmente, según el reporte de los Laboratorios MACROGEN (2011), bajas concentraciones de ADN y contaminación en las muestras mencionadas, limitaron el proceso de secuenciación; por lo tanto, estas cepas no entraron en los análisis posteriores de identificación taxonómica molecular.

3.2.6. Análisis y comparación de secuencias homólogas

Las 17 secuencias editadas se compararon con secuencias existentes en la base de datos del programa en web BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*); el cual, buscó la homología más significativa para cada secuencia, dando como resultado la asignación del género y especie a las 20 cepas bacterianas. Esta asignación se describe en la tabla 3.5. De todas las secuencias analizadas se obtuvo una significancia de alineamiento con un valor de $E = 0$, lo que estadísticamente hizo válida la comparación.

De igual manera, se analizó las variable de: el % de identidad con las secuencias asignadas, el cual estuvo entre los valores del 98 al 100% para todas las cepas, indicando que los genes 16Sr pertenecen taxonómicamente al género bacteriano asignado por BLAST; y, % de cobertura de la secuencia problema con el homologo, el cual fue para todas las cepas del 100%, indicando que en el alineamiento de los nucleótidos analizados (1500 aproximadamente) coincidió totalmente con los nucleótidos del género asignado.

Tabla 3.5. Análisis de comparación y asignación del BLAST para las secuencias de las muestras bacterianas.

CÓDIGO	GÉNERO Y ESPECIE ASIGNADA POR BLAST	% IDENTIDAD MÁXIMA	% COBERTURA
CEPA 1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> IAM 12048	99%	100%
CEPA 2	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%
CEPA 3	<i>Stenotrophomonas humi</i> R-32729	99%	100%
CEPA 4	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%
CEPA 5	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%
CEPA 6	*	*	100%
CEPA 7	<i>Acinetobacter lwoffii</i> DSM 2403	99%	100%
CEPA 8	<i>Brevundimonas diminuta</i> ATCC 11568	98%	100%
CEPA 9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	98%	100%
CEPA 10	*	*	100%
CEPA 11	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> ep10	99%	100%
CEPA 12	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	99%	100%
CEPA 13	<i>Pseudomonas umsongensis</i> Ps 3-10	99%	100%
CEPA 14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	99%	100%
CEPA 15	*	*	100%
CEPA 16	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%
CEPA 17	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	98%	100%
CEPA 18	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%
CEPA 19	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> IAM 12423	99%	100%
CEPA 20	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> DSM 10	100%	100%

*Secuencias no obtenidas. Fuente: BLAST

3.2.7. Análisis filogenético de las secuencias

El alineamiento de las secuencias extraídas de la base de datos NCBI con las secuencias de las cepas bacterianas, mediante el programa bioinformático Phylogeny.fr/, obtuvo como resultado el alineamiento y el árbol filogenético ilustrados en las figuras 3.19 y 3.20.

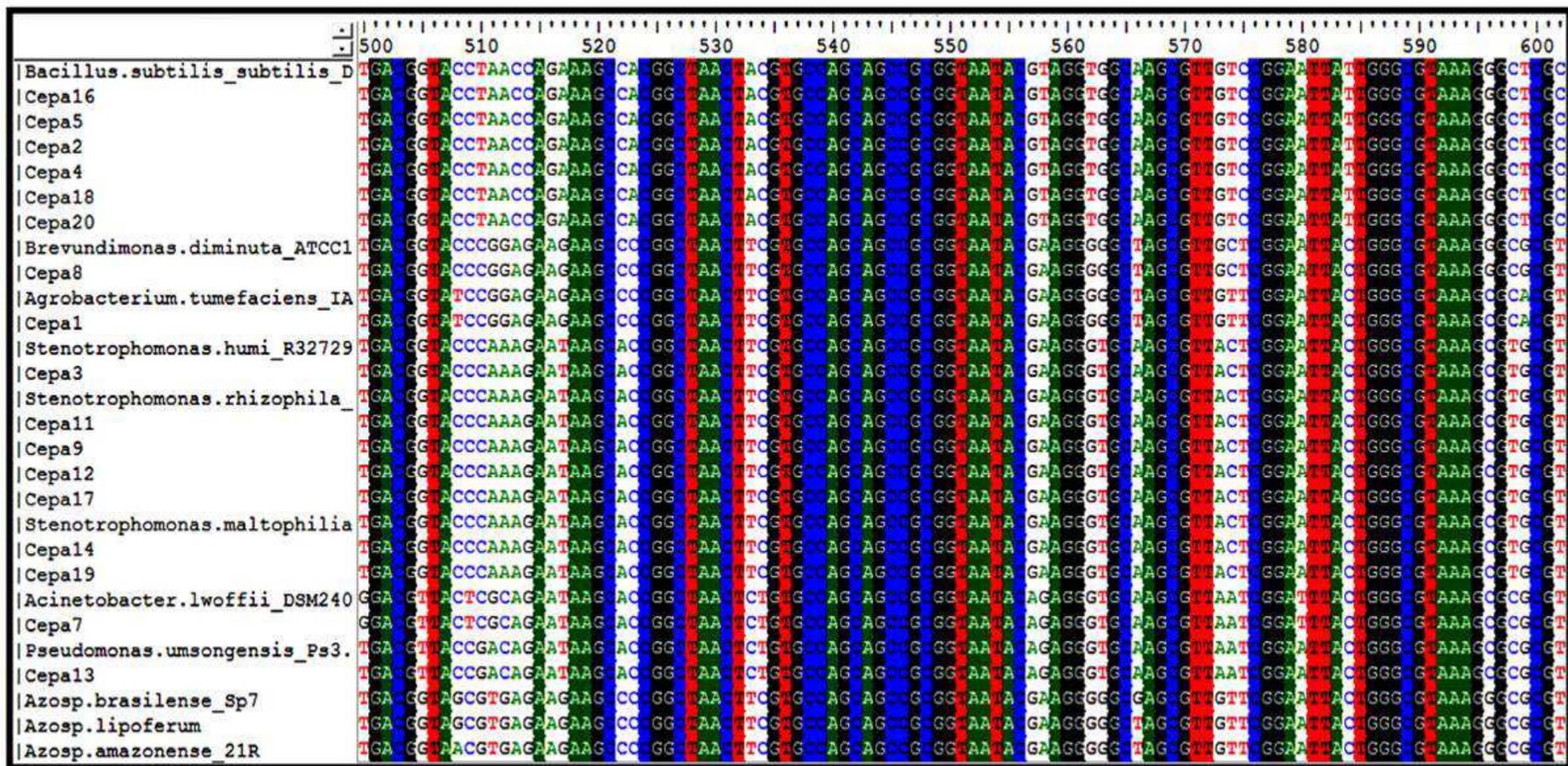


Figura 3.19. Alineamiento múltiple de los genes 16S ADNr pertenecientes al género *Azospirillum*, las 20 secuencias bacterianas en estudio y los géneros identificados mediante BLAST.

El alineamiento comprendió una sección de 1500 pb aproximadamente de la secuencia del gen 16Sr de todas las muestras. Esta region indicó el nivel de polimorfismo que presentan los distintos géneros bacterianos al igual que el agrupamiento de las cepas del INIAP al género asignado por BLAST. También se observa diferencias a nivel de nucleótidos entre los género. En la figura 3.20 las columnas marcadas con color indican que comparten el mismo nucleótido todas las muestras (T: Rojo; G:Negro; C:Azul y A:verde), en cambio las columnas sin color indican los nucleótidos que diferencian a los géneros entre si.

Finalmente, el árbol filogenético obtenido indicó la formación de dos grupos principales: el Grupo I, que comprende los subgrupos A y B; y el grupo II con los subgrupos C y D. Cada subgrupo contiene a los géneros agrupados según su similitud genética del gen 16Sr. En el subgrupo A se encuentran los géneros bacterianos *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, cada género con su respectiva cepa bacteriana del INIAP. El subgrupo B: contiene únicamente al género de *Bacillus* junto con las cepas 2, 4, 5, 16, 18 y 20 pertenecientes al mismo género. En el subgrupo C se ubicaron *Agrobacterium* con la cepa 1 y *Brevundimonas* con la cepa 8. Por último, en el subgrupo D se agruparon todas las secuencias de las especies de *Azospirillum*, indicando que ninguna de las cepas pertenece a dicho género. A pesar de las diferencias de géneros, las cepas 1 perteneciente a *Agrobacterium tumefaciens* y la cepa 8 correspondiente a *Brevundimonas* mostraron estar relacionadas genotípicamente con *Azospirillum* al pertenecer al mismo grupo II.

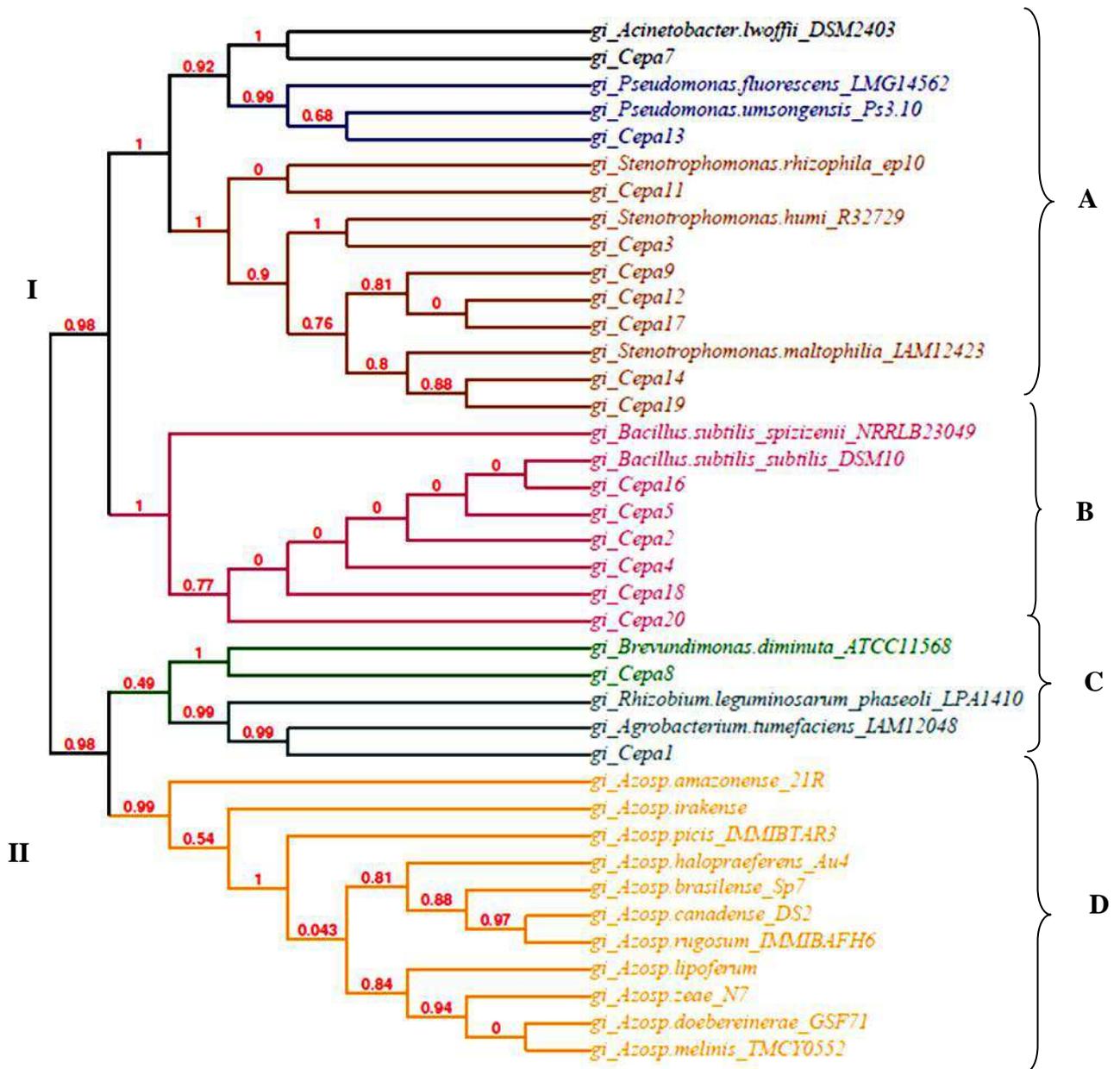


Figura 3.20. Árbol filogenético para el alineamiento múltiple de secuencias completas del gen 16S ADNr de: especies del género *Azospirillum*, secuencias bacterianas en estudio y secuencias homólogas asignadas por el BLAST a las muestras bacterianas.

3.3. FASE III. Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas

3.3.1. Germinación de las semillas de maíz I-101

La semilla de maíz de la variedad I-101 fue otorgada por el Programa de Maíz de la EESC del INIAP. Se realizó con éstas, pruebas preliminares de su capacidad para germinar, obteniéndose un 94% de poder germinativo. Posteriormente, se evaluó el protocolo de desinfección, en base a la viabilidad de las semillas y la contaminación vigente luego de la aplicación del mismo. Los resultados indicaron que la viabilidad de la semilla fue de un 95%; mientras que, la contaminación fue de un 1,8%. Evaluado el protocolo y el material a utilizar, se desinfectó y germinó la semilla, teniendo que al cabo de tres días las radículas crecieron con tamaños variables entre 1 - 3,5 cm de largo; eligiendo para el ensayo, únicamente, las que presentaron 1 cm de largo como se observa en la figura 3.21.

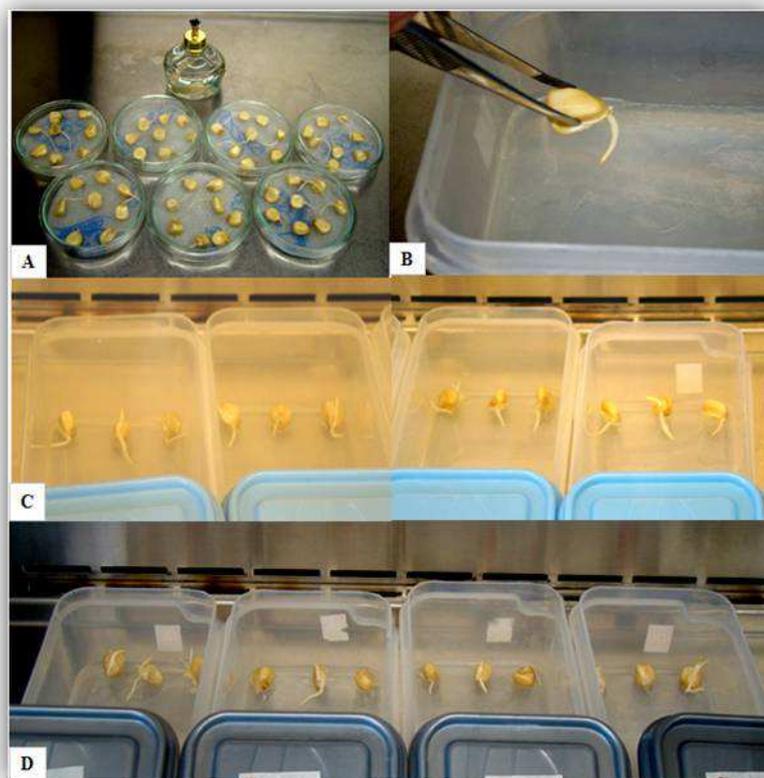


Figura 3.21. Germinación y selección de semillas. A. Semilla germinada a los tres días de la desinfección. B. Selección de la semilla por el tamaño de su radícula. C y D. Semilla seleccionada para la evaluación.

3.3.2. Suspensiones bacterianas

Se obtuvo de cada cepa bacteriana concentraciones variables en el rango de 10^7 – 10^9 UFC/mL. Después de diluciones en agua salina las concentraciones finales de las muestras fueron de 10^6 UFC/mL.

3.3.3. Evaluación del efecto bacteriano sobre las semillas de maíz

El efecto de inoculación de las suspensiones bacterianas sobre las semillas de maíz germinadas a condiciones *in vitro*, dio como resultado que al cabo de tres días después de la inoculación, las semillas presentaron variabilidad en el desarrollo de sus raíces en comparación con los dos testigo negativos implementados en el ensayo, como se observa en las figuras 3.22 y 3.23

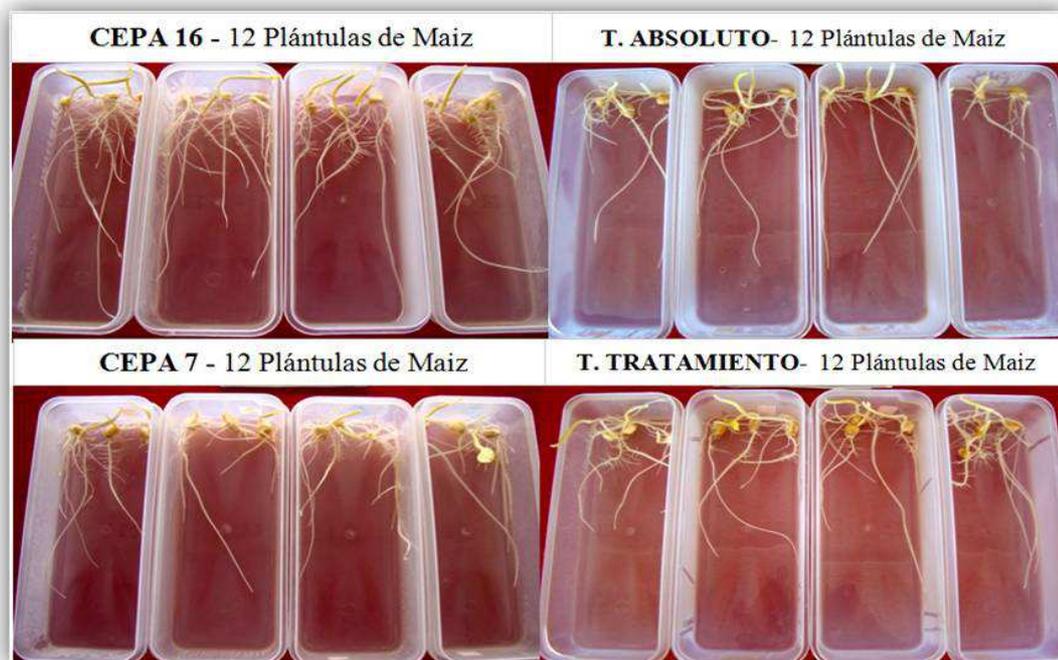


Figura 3.22. Efecto de inoculación de las cepas bacterianas sobre el desarrollo de las raíces de semillas de maíz de la variedad I-101, bajo condiciones *in vitro*.

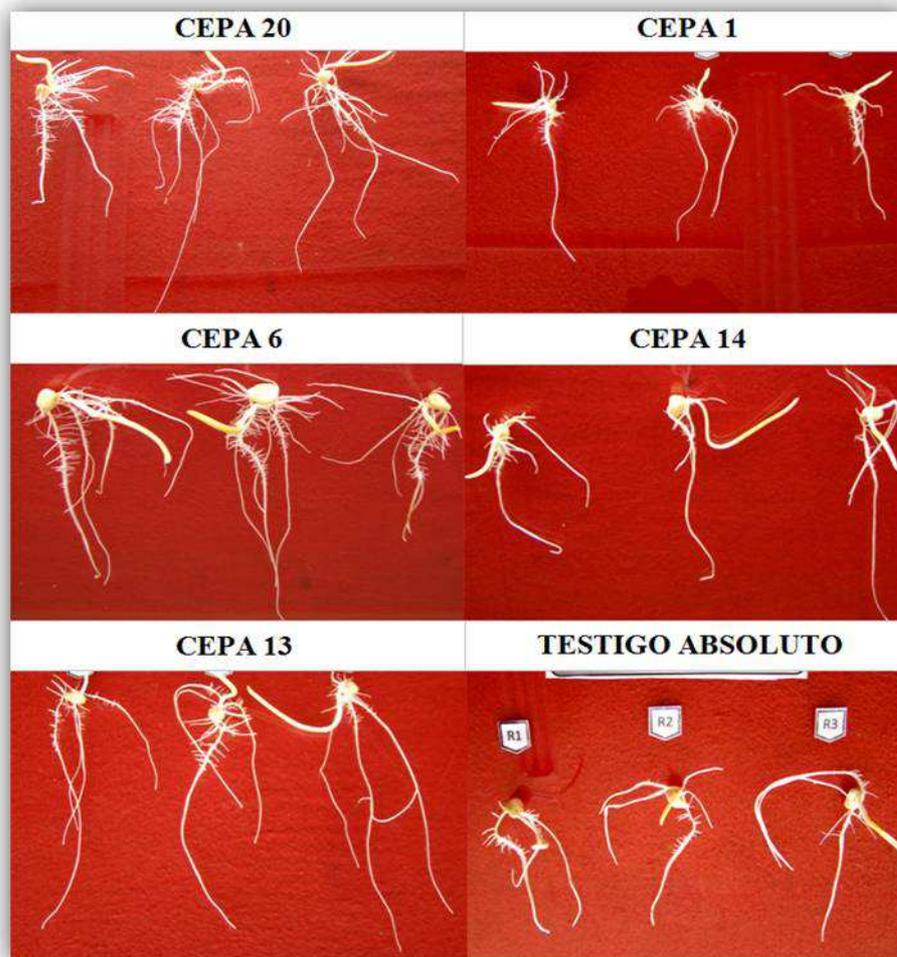


Figura 3.23 Variabilidad en el desarrollo de raíces de la semilla I-101 inoculadas con la cepa bacteriana correspondiente, bajo condiciones *in vitro*.

3.3.4. Registro de datos y análisis estadístico de las variables obtenidas

Los datos de las variables: longitud de raíz, número de raíces principales desarrolladas y % de materia seca, fueron colectados y registrados para procesarlos en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0. con la aplicación de un diseño completamente al azar (DCA). Los datos del análisis de varianza (ANOVA) y el análisis funcional con la prueba de Tuckey al 5% se registran en las tablas 3.6 y 3.7:

Tabla 3.6. Análisis de Varianza para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca y número de raíces principales desarrolladas, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre semillas pre-germinadas de maíz de la variedad I-101 a condiciones *in vitro*.

CUADRADOS MEDIOS				
FUENTES DE VARIACIÓN	GL	LONGITUD DE RAÍZ (cm)	MATERIA SECA (%)	# DE RAICES PRINCIPALES DESARROLLADAS
TOTAL	263			
TRATAMIENTOS	21	36,19 **	49,19 **	0,31 **
ERROR EXP.	242	17,14	5,81	0,11
Promedio General:		13,95	11,70	4,69
Promedio General Transformado:		-----	19,81(angular)	2,28 (raíz cuadrada)
Coeficiente de Variación (%)		29,63	12,17	14,56

Ns = No significativo;

* = Significativo al 5%

** = Altamente significativo al 1%.

Tabla 3.7. Promedios y Tukey al 5 % para las variables: longitud de raíz, porcentaje de materia seca y número de raíces principales desarrolladas, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre semillas pre-germinadas de maíz de la variedad I-101 a condiciones *in vitro*.

TRATAMIENTO	CÓDIGO, PROCEDENCIA Y ESPECIE	PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICANCIA		
		LONGITUD DE RAÍZ	%MATERIA SECA	# DE RAÍCES PRINCIPALES DESARROLLADAS
T1	C1: Bolívar, <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13,02 ab	18,61 d	2,41 ab
T2	C2: Bolívar, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	16,38 ab	20,04 bcd	2,16 ab
T3	C3: Tungurahua, <i>Stenotrophomonas humi</i>	14,96 ab	20,24 bcd	1,99 b
T4	C4: Chimborazo, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	15,29 ab	20,40 bcd	2,16 ab
T5	C5: Chimborazo, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	13,00 ab	20,38 bcd	2,17 ab
T6	C6: Tungurahua, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	12,29 b	26,06 a	2,51 ab
T7	C7: Tungurahua, <i>Acinetobacter lwoffii</i>	13,25 ab	19,51 cd	2,40 ab
T8	C8: Tungurahua, <i>Brevundimonas diminuta</i>	12,13 b	22,32 bc	2,17 ab
T9	C9: Tungurahua, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	14,88 ab	19,16 cd	2,13 ab
T10	C10: Cuba, <i>Stenotrophomonas</i>	12,71 ab	23,63 ab	2,45 ab
T11	C11: Pichincha, <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	13,25 ab	20,39 bcd	2,31 ab
T12	C12: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13,29 ab	19,25 cd	2,14 ab
T13	C13: Imbabura, <i>Pseudomonas umsongensis</i>	18,63 a	18,73 cd	2,15 ab
T14	C14: Carchi, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	14,46 ab	18,15 d	2,28 ab
T15	C15: Carchi, <i>Pseudomonas</i>	13,63 ab	19,23 cd	2,18 ab
T16	C16: Carchi, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	13,83 ab	16,94 d	2,18 ab
T17	C17: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	16,08 ab	18,29 d	2,41 ab
T18	C18: Imbabura, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	12,50 ab	19,62 cd	2,07 ab
T19	C19: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	13,75 ab	17,63 d	2,46 ab
T20	C20: Pichincha, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	16,21 ab	20,09 bcd	2,55 a
TT	Testigo Tratamientos (medio de cultivo)	12,50 ab	18,49 d	2,06 ab
TA	Testigo Absoluto	11,33 b	18,73 cd	2,19 ab

De acuerdo con el ANOVA realizado para el ensayo *in vitro* se obtuvo, de manera general, que todos los tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí para todas las variables analizadas. Además, con la prueba Tukey se identificó los mejores y peores tratamientos, para cada variable descritos a continuación:

3.3.4.1. Variable longitud de raíz

Para la longitud de raíz, el ANOVA mostró que todos los tratamientos fueron diferentes estadísticamente ($p < 0,01$) y poseen un promedio general de 13,95cm; además, su coeficiente de variación fue del 29,63%. En la prueba de Tukey al 5% para esta variable se identificó dos rangos de significancia, el primero conformado únicamente por el tratamiento T13, correspondiente a la cepa 13 procedente de la provincia de Imbabura cantón Otavalo; ésta causó la mayor longitud de raíz con 18,63 cm como media para las 12 repeticiones evaluadas. En cambio, el segundo y último rango lo ocupa el tratamiento Testigo Absoluto, donde no se colocó ningún microorganismo ni sustancia que provoque un efecto en el crecimiento de las raíces; con la menor media de 11,33cm. Dentro de este último rango, también se encuentran los tratamientos T6 y T8; que corresponden a las cepas 6 y cepa 8, procedentes de la provincia de Tungurahua cantones Pelileo y Mocha respectivamente, los cuales generaron una media de 12,29 cm para el T6 y 12,13cm para el T8, siendo promedios semejantes al tratamiento testigo absoluto. La variabilidad de los resultados para la longitud de raíz se vio reflejado en el valor promedio de incertidumbre tipo A el cual fue de 2,07 cm; éste, se obtuvo con once grados de libertad y a un nivel de confianza del 95% (Figura 3.24).

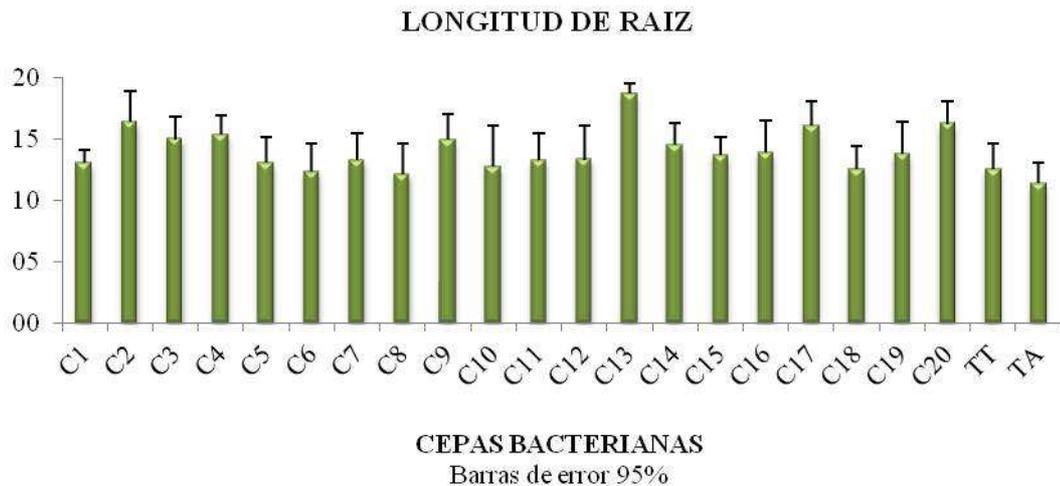


Figura 3.24. Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados *in vitro*, considerando barras de error.

3.3.4.2. Variable Porcentaje de Materia Seca

El ANOVA para el porcentaje de Materia seca indicó diferencias significativas entre los tratamientos, con un promedio general transformado de 19,81%. Su coeficiente de variación fue del 12,17%. Para esta variable la prueba de Tukey al 5%, generó cuatro rangos de significancia. En el primer rango se encuentra el tratamiento T6, correspondiente a la cepa 6 procedente de la provincia de Tungurahua cantón Pelileo; el cual, fue el mejor tratamiento en promover la formación de mayor materia seca con un porcentaje del 26,06% como media para las 12 repeticiones evaluadas. En cambio, el tratamiento que se ubica en el último rango, con un promedio de 16,94% en el desarrollo de materia seca, es el T16, que corresponde a la cepa 16 procedente de la provincia del Carchi cantón Espejo. En este último rango también se encuentran los tratamientos: T19 (cepa 19, Imbabura, Otavalo) con una media del 17,63%; T14 (cepa 14, Carchi, Espejo) con una media de 18,15%; T17 (cepa 17, Imbabura, Antonio Ante) con 18,29%, Testigo tratamiento (inoculación de caldo nutritivo sin crecimiento bacteriano) con 18,49%; y, T1 (cepa 1, Bolívar, Chillanes) con 18,61%. La variabilidad de los resultados para el porcentaje de materia seca se reflejó en el valor promedio de incertidumbre tipo A, el cual fue de 1,164%; éste, se obtuvo con once grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Figura 3.25).

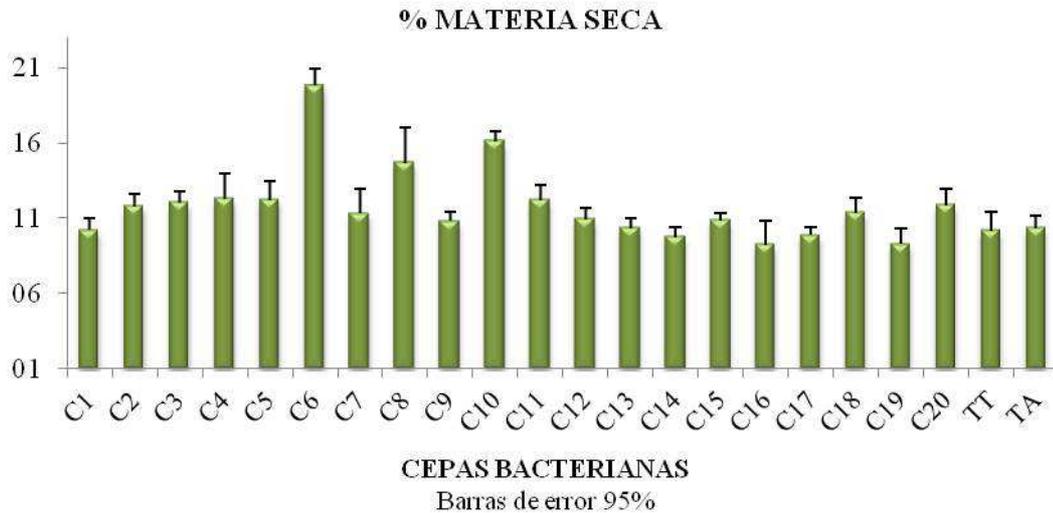


Figura 3.25. Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de materia seca para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados *in vitro*, considerando barras de error.

3.3.4.3. Variable número de raíces principales desarrolladas

Según el ANOVA, los tratamientos presentaron diferencias significativas donde el promedio general transformado fue de 2 raíces por plántula, aproximadamente. Su coeficiente de variación fue del 12,17%. En la prueba de Tukey al 5%, se generó dos rangos de significancia. El primer rango conformado por el tratamiento T20, que corresponde a la cepa 20 procedente de la provincia de Pichincha, cantón Quito; que fue el mejor tratamiento en el desarrollo de un mayor número de raíces principales con 2,55 raíces como media para las 12 repeticiones evaluadas. Por el contrario, el tratamiento que se ubica en el último rango, con una media de 1,99 raíces principales desarrolladas, es el T3 que corresponde a la cepa 3 originaria de la provincia de Tungurahua cantón Píllaro, cuyo promedio es equivalente a los promedios de los testigos negativos propios del ensayo. La variabilidad de los resultados para el número de raíces principales desarrolladas se reflejó en el valor promedio de incertidumbre tipo A el cual fue de 0,737 número de raíces; este, se obtuvo con once grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Figura 3.26).

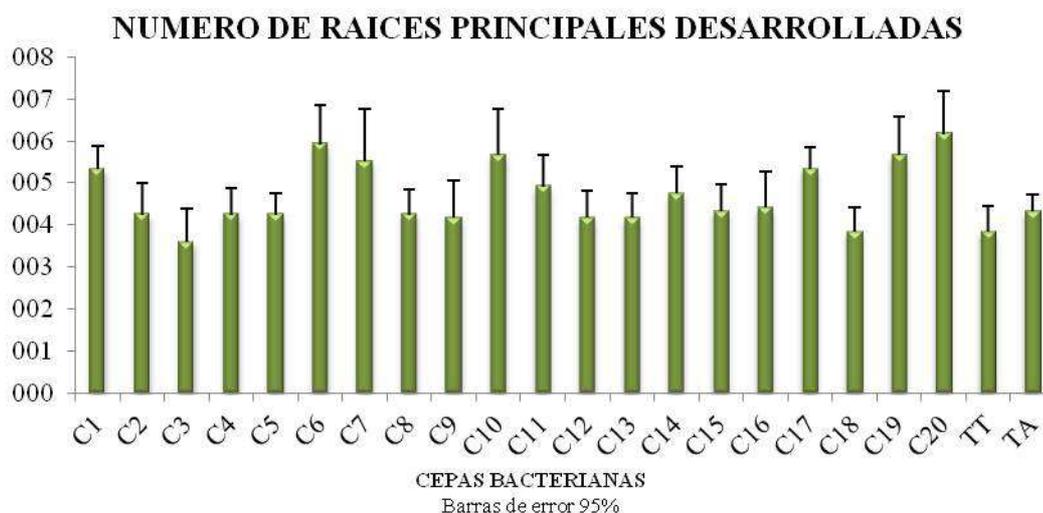


Figura 3.26. Gráfico de los datos experimentales de la variable número de raíces desarrolladas para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados *in vitro*, considerando barras de error.

3.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas

3.4.1. Análisis químico del sustrato

El sustrato empleado para la evaluación en invernadero se analizó químicamente en dos periodos distintos, el primero al momento anterior a la siembra de las semillas de maíz en invernadero y el segundo al finalizar el tiempo del ensayo. La tabla 3.7 indica la variación de la cantidad de los nutrientes y componentes químicos disponible en el sustrato para los dos periodos, siendo los niveles altos correspondientes al sustrato antes de la siembra y los menores en el sustrato después de la evaluación en invernadero.

Tabla 3.8. Parámetros evaluados en el análisis químico realizado al sustrato antes y después de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.

Muestra	UNIDADES																		
	PH	ppm			meq/100mL				ppm				(%)	PROPORCIONES			meq/100mL	%	ppm
		NH4	P	S	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe	Mn	B	M.O.	Ca/Mg	Mg/K	Ca+Mg/K	Z Bases	NTot	Cl
SUSTRATO AL INICIO	6,61 PN	44,00 M	15,00 M	49,00 A	0,90 A	10,70 A	2,00 M	1,7 B	2,1 M	82,0 A	4,6 B	0,78 B	24,20 A	5,4	2,22	14,11	13,6	0,5	4,7
SUSTRATO AL FINAL	6,42LAc	41,00 M	13,00 M	30,00 A	0,49 A	10,10 A	1,80 M	1,6 B	2,0 M	84,0 A	8,2 M	0,71 B	25,30 A	5,6	3,67	24,29	12,39	0,43	2,7

INTERPRETACIÓN

PH	ELEMENTOS
Ac Acido	B Bajo
Lac Ligeramente Acido	M Medio
PN Prácticamente Neutro	A Alto
N Neutro	T Tóxico (Boro)
Lal Ligeramente alcalino	
Al Alcalino	
RC Requiere Cal	

3.4.2. Evaluación del efecto de las cepas inoculadas sobre semillas de maíz en invernadero.

Las semillas de maíz variedad I-101 después de germinarlas y sembrarlas en macetas, evidenciaron el desarrollo de plántulas con su punta blanca a los cuatro días después de la siembra; en cambio, a los seis días todas las plántulas dieron lugar a la primera hoja llamada “hoja bandera”. Finalmente, a los nueve días, después del raleo, las plantas se encontraban en el estado vegetativo V3 con la presencia de tres hojas desarrolladas, permitiendo la inoculación de las cepas bacterianas. Después de inocular, en la figura 3.27, se observa los cambio fenológicos en las plantas durante el periodo de 6 semanas de las evaluación.

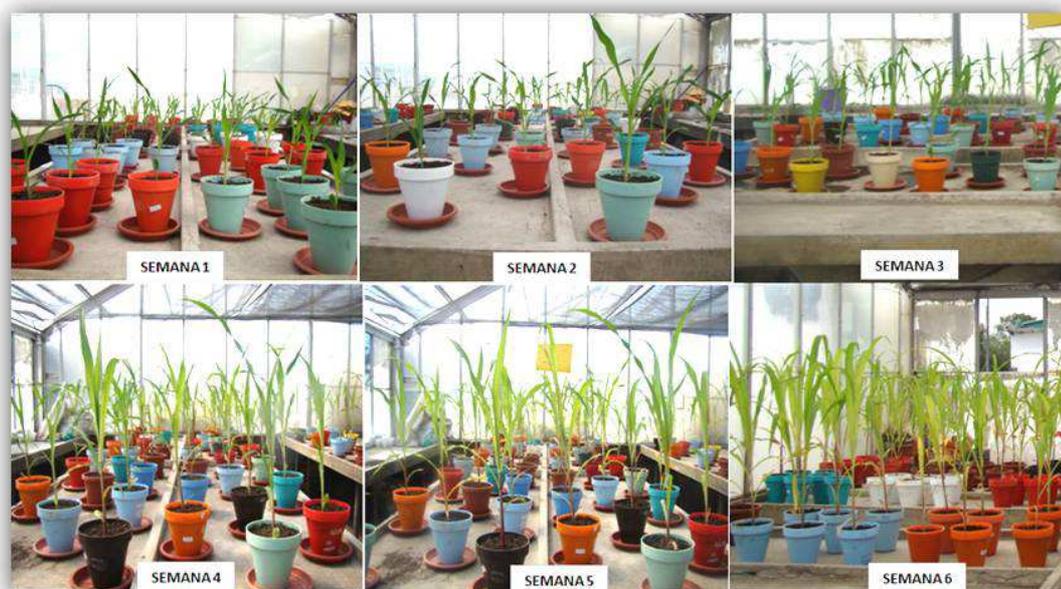


Figura 3.27. Variaciones fenológicas de las plantas de maíz tras la inoculación con las 20 cepas bacterianas por un periodo de evaluación de seis semanas.

Se observaron cambios fenotípicos en todas las plantas. Sus hojas presentaron un color verde oscuro hasta la tercera semana, pero con el pasar del tiempo se tornaron verde pálido y amarillentas, evidenciando algunas manchas o tintes marrones al finalizar el ensayo. A la sexta semana las plantas presentaron un estado de clorosis muy avanzado indicando notoriamente la deficiencia de nutrientes.

3.4.3. Registro de datos y análisis estadístico de las variables

Las variables registradas de: altura de la planta, longitud de raíz y % de materia seca, se procesaron en el software estadístico InfoStat/Estudiantil versión 2.0, obteniendo como resultado el análisis de varianza (ANOVA) y el análisis funcional con la prueba de Tuckey al 5% ; reportándose en las tablas 3.9 y 3.10:

Tabla 3.9. Análisis de Varianza para las variables: altura de planta, longitud de raíz y porcentaje de materia seca, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.

FUENTES DE VARIACIÓN	GL	CUADRADOS MEDIOS		
		ALTURA DE PLANTA (cm)	LONGITUD DE RAÍZ (cm)	MATERIA SECA (%)
TOTAL	131			
TRATAMIENTOS	21	105,49 ^{NS}	319,16 ^{NS}	53,93 ^{**}
ERROR EXP.	110	94,33	180,17	3,25
Promedio General:		79,93	74,94	16,52
Promedio General Transformado:		-----	-----	23,84 (angular)
Coefficiente de Variación (%)		12,15	17,91	7,56

NS = No significativo; * = Significativo al 5% ** = Altamente significativo al 1%.

Tabla 3.10. Promedios y Tukey al 5 % para las variables: altura de planta, longitud de raíz y porcentaje de materia seca, obtenidas de la evaluación del efecto de inoculación de las cepas bacterianas del INIAP sobre plantas de maíz de la variedad I-101 a condiciones de invernadero.

TRATAMIENTO	CÓDIGO, PROCEDENCIA Y ESPECIE	PROMEDIOS Y RANGOS DE SIGNIFICANCIA		
		ALTURA DE PLANTA	LONGITUD DE RAÍZ	%MATERIA SECA
T1	C1: Bolívar, <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	80,00 a	70,33 a	22,16 defg
T2	C2: Bolívar, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	83,33 a	82,17 a	21,07 fg
T3	C3: Tungurahua, <i>Stenotrophomonas humi</i>	74,33 a	80,83 a	20,40 g
T4	C4: Chimborazo, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	81,50 a	79,17 a	20,62 fg
T5	C5: Chimborazo, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	76,17 a	83,83 a	20,27 g
T6	C6: Tungurahua, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	86,33 a	85,00 a	32,78 a
T7	C7: Tungurahua, <i>Acinetobacter lwoffii</i>	82,17 a	74,33 a	27,79 b
T8	C8: Tungurahua, <i>Brevundimonas diminuta</i>	77,17 a	67,17 a	27,35 bc
T9	C9: Tungurahua, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	75,50 a	77,33 a	27,30 bc
T10	C10: Cuba, <i>Stenotrophomonas</i>	84,00 a	78,33 a	25,11 bcde
T11	C11: Pichincha, <i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	84,00 a	65,67 a	25,62 bcd
T12	C12: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	79,00 a	72,50 a	24,39 bcdef
T13	C13: Imbabura, <i>Pseudomonas umsongensis</i>	79,33 a	65,83 a	24,11 bcdefg
T14	C14: Carchi, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	85,67 a	79,50 a	23,87 cdefg
T15	C15: Carchi, <i>Pseudomonas</i>	68,67 a	63,33 a	23,86 cdefg
T16	C16: Carchi, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	79,83 a	71,67 a	21,46 efg
T17	C17: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	77,33 a	78,17 a	22,80 defg
T18	C18: Imbabura, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	81,00 a	59,83 a	23,78 cdefg
T19	C19: Imbabura, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	84,17 a	84,83 a	23,33 defg
T20	C20: Pichincha, <i>Bacillus subtilis subtilis</i>	77,67 a	74,67 a	23,14 defg
TT	Testigo Tratamientos (medio de cultivo)	83,17 a	82,00 a	21,34 efg
TA	Testigo Absoluto	79,00 a	72,67 a	21,70 efg

3.4.3.1. Variable altura de planta (45 días)

Para esta variable, el ANOVA realizado no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Se obtuvo un promedio general de 79,93 cm y un coeficiente de variación del 12,15%. En cambio, el análisis funcional realizado con la prueba de Tukey al 5% de significancia, no identificó rangos dentro de los tratamientos, únicamente se observó la diferencia de los promedios, ubicando al T6 (c6: Tungurahua, Pelileo) como primero al presentar la media más alta de 86,33 cm de altura de planta para las seis repeticiones evaluadas; mientras que, el promedio más bajo lo posee el T15 (c15: Carchi, Espejo) con 68,67 cm de altura de planta a los 45 días después de la inoculación. . La variabilidad de los resultados para la altura de planta se reflejó en el valor promedio de incertidumbre tipo A , el cual fue de 7,44 cm; éste, se obtuvo con cinco grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Figura 3.28).

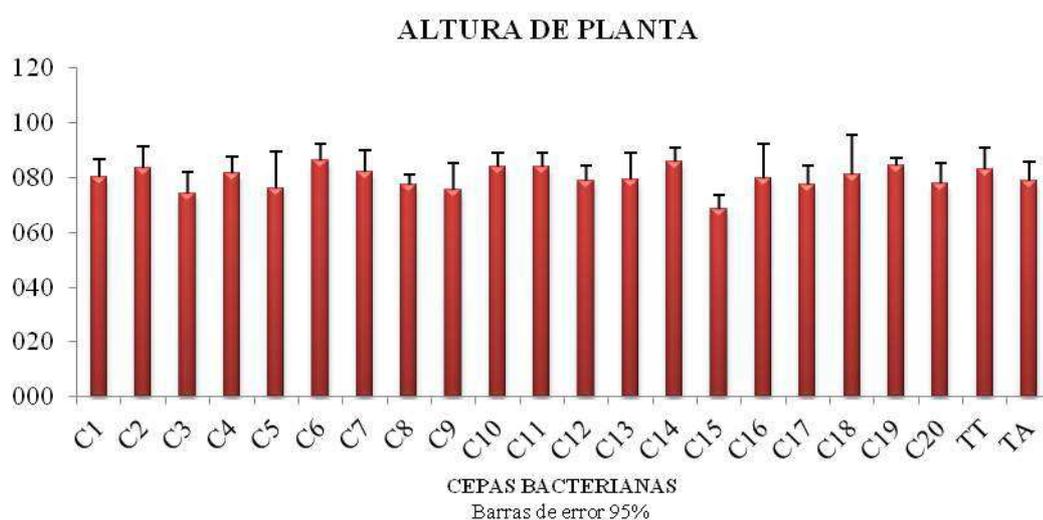


Figura 3.28. Gráfico de los datos experimentales de la variable altura de planta para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.

3.4.3.2. Variable longitud de raíz (45 días)

El ANOVA realizado evidenció diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. El promedio general de longitud de raíces fue de 74,94 cm y el coeficiente de variación fue del 17,91%. Para el análisis funcional con la prueba de Tukey al 5% de significancia no se identificaron rangos entre los tratamientos, pero si se observó sus

promedios ubicando de forma descendente al tratamiento T6 (c6: Tungurahua, Pelileo) con la mayor media para la longitud de raíz de 85 cm; mientras que, el tratamiento T18 (Cepa 18: Imbabura, Cotacachi) tuvo la menor media con 59,83 cm en la longitud sus raíces. La variabilidad de los resultados para la longitud de raíz se reflejó en el valor promedio de incertidumbre tipo A, el cual fue de 10,22 cm; éste, se obtuvo con cinco grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Figura 3.29).

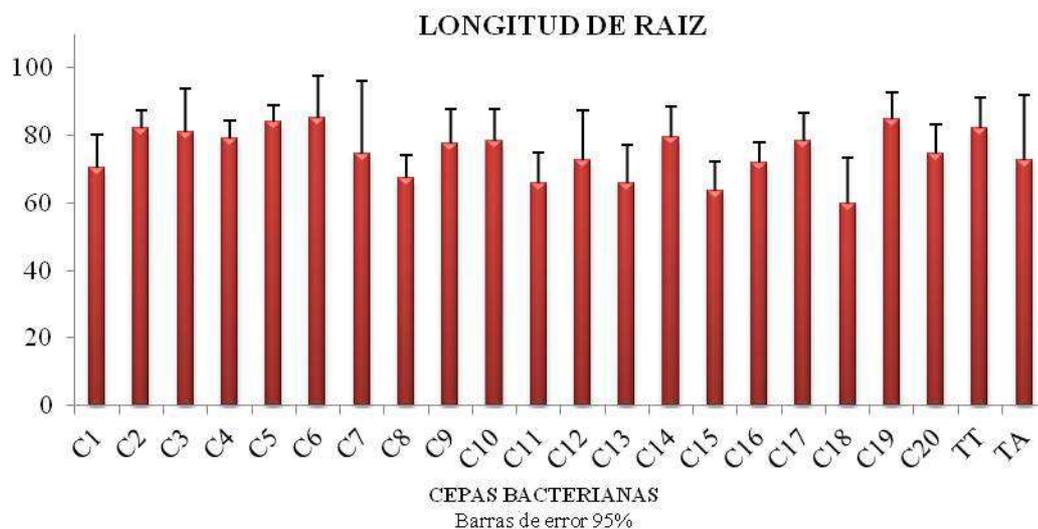


Figura 3.29. Gráfico de los datos experimentales de la variable longitud de raíz para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.

3.4.3.3.Variable: Porcentaje de Materia seca

El Análisis de Varianza para la variable porcentaje de materia seca indicó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, con un promedio general transformado de 23,84% y un coeficiente de variación del 7,56%. En la prueba de Tukey al 5% se obtuvieron siete rangos de significancia. El primer rango lo ocupa el tratamiento T6 (Cepa 6: Tungurahua, Pelileo) con el mayor promedio de % materia seca del 32,78%; mientras que, en el último rango se ubican los tratamientos T3 (Cepa3: Tungurahua Píllaro) y T5 (Cepa 5: Chimborazo, Alausí) con promedios de 20,40 y 20,27% de materia seca, respectivamente, siendo promedios menores en comparación con los testigos negativos propios del ensayo. La variabilidad de los resultados para %

de materia seca se reflejó en el valor promedio de incertidumbre tipo A, el cual fue de 1,54%; éste, se obtuvo con cinco grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (Figura 3.30).

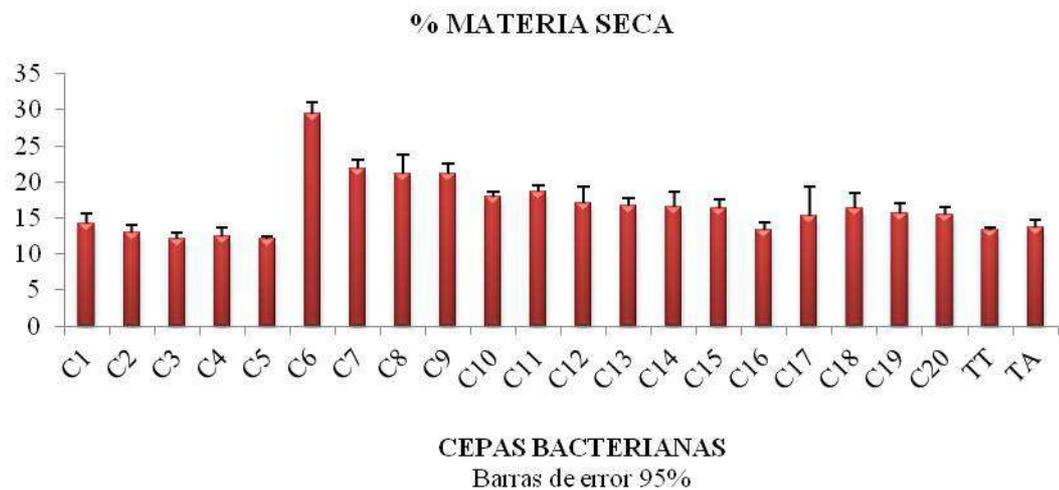


Figura 3.30. Gráfico de los datos experimentales de la variable porcentaje de materia seca para los 20 tratamientos con las cepas bacterianas mas dos testigos negativos TT: Testigo tratamiento y TA: Testigo Absoluto evaluados en invernadero, considerando barras de error.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1. FASE I. Caracterización microbiológica de las cepas bacterianas

Mantener un suelo de calidad es el interés de todo agricultor, porque esto es sinónimo de mejora en la productividad de sus cultivos (INIAP, 2007). Una de las formas de conservarlo es desarrollando tecnologías basadas en microorganismos benéficos aislados e identificados de los suelos agrícolas ecuatorianos. La elaboración de productos en base a dichos microorganismos contribuiría en gran manera a la mejora del cultivo de maíz ecuatoriano, sin dejar a un lado las técnicas tradicionales; sino, complementándolas de una manera más ecológica (Coyne, 2000).

Cultivos y suelos maiceros procedentes de varias provincias de la Sierra ecuatoriana fueron seleccionados y colectados por el Programa de Maíz de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP, para el aislamiento del género bacteriano *Azospirillum*, con el fin de identificar esta bacteria y a futuro desarrollar un biofertilizante (Espinoza, 2004). Veinte cepas bacterianas fueron aisladas e identificadas, preliminarmente, como pertenecientes al género *Azospirillum* (Espinoza, 2004). Las bacterias purificadas fueron liofilizadas y almacenadas por un periodo de seis años, antes de reactivarlas para esta investigación.

Con las 20 cepas bacterianas reactivadas y purificadas se dio inicio a la identificación microbiológica mediante el empleo de pruebas bioquímicas. Dichas pruebas fueron seleccionada según el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática elaborado por Krieg y Döbereiner (1984) para el género *Azospirillum* y las tres especies tipo: *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense*.

Las características bioquímicas de forma celular, motilidad, catalasa, oxidasa, indol y sulfatos de las 20 cepas en estudio, coincidieron con los resultados reportados por Krieg y Döbereiner (1984) para el género *Azospirillum*. De estas pruebas: forma celular, motilidad y catalasa fueron realizadas por Espinoza en el año 2004, cuando se

hicieron las colecciones de las cepas. En ese entonces, Espinoza obtuvo los mismos resultados que la presente investigación (Anexo D). Con estas pruebas, dicho autor designó a las 20 cepas bacterianas como pertenecientes al género *Azospirillum*.

Según Hernández (2003), las pruebas de forma celular, catalasa, oxidasa y motilidad son pruebas bioquímicas primarias, que indican características metabólicas muy generales para un amplio campo microbiano que habita en la rizósfera de los cultivos vegetales. Para identificar un género específico se deben emplear, aparte de las primarias, pruebas bioquímicas secundarias (indol, ureasa, reducción de nitratos, citrato, sulfatos) y pruebas terciarias (producción de coagulasa, de fenilalanina deaminasa) si se pretende identificar especies (Hernández, 2003). En conjunto estas pruebas otorgarían al microorganismo un metabolismo particular que permitiría clasificarlo taxonómicamente (Hernández, 2003).

En esta investigación se aplicaron tanto pruebas primarias como secundarias y terciarias, lo que permitió agrupar a las 20 cepas bacterianas en un dendrograma de similitud metabólica junto con el género *Azospirillum*. Se observó que ninguna de las cepas analizadas posee el perfil metabólico del género en estudio.

La primera diferencia notable entre las muestras y *Azospirillum* fue en los resultados de la tinción Gram. Este tipo de tinción contribuye a clasificar las bacterias en dos grandes grupos: gram positivas y gram negativas, de acuerdo a la coloración que desarrollen según la constitución estructural de la pared celular bacteriana (Cisternas, 2007). *Azospirillum* se encuentra clasificada como una bacteria gram negativa (Caballero, 2001). De las 20 cepas analizadas, únicamente trece presentaron el mismo resultado que *Azospirillum*, el resto se clasificaron como bacterias gram positivas (cepas 2, 4, 5, 6, 16, 18 y 20) siendo éstas las primeras en descartarse de pertenecer al género en estudio.

Otra diferencia fue en la prueba de crecimiento en el medio NFB semisólido, empleado para conocer si una cepa bacteriana es diazotrófica (fijadora de nitrógeno atmosférico) o no (Caballero, 2001). Según Hernández (2003) para identificar la fijación de nitrógeno por parte de *Azospirillum*, las bacterias deben crecer de 0,5- 1,5 cm. bajo la superficie de este medio de cultivo, donde las condiciones son

microaerófilas; es decir, la concentración de oxígeno se reduce para evitar la degradación de la enzima nitrogenasa responsable de este proceso. Las cepas analizadas crecieron sobre la superficie del medio, evidenciando que ninguna realiza este proceso de fijación biológica del nitrógeno.

En complemento a esta afirmación, el resultado de la tinción del polímero Poli- β -hidroxibutirato (PHB) para todas las cepas resultó ser negativo. Según Cholula (2005) la capacidad de acumular el polímero PHB, en los organismos diazotróficos que lo producen, solo se realiza bajo condiciones microaerófilas. Al no contar con la capacidad de acumular PHB y no crecer en condiciones microaerófilas, se puede afirmar con más certeza que ninguna de las cepas analizadas es diazotrófica.

A pesar de no ser diazotróficas ni pertenecientes al género *Azospirillum*, una característica que sobresale de las cepas 1, 2, 4, 5, 6, 13, 16, 18 y 20 es que poseen la capacidad de degradar la urea al ser positivas para esta prueba. Ésta característica sería motivo de investigación, debido a que la degradación del compuesto urea, disponible en forma de materia orgánica o en la orina de algunos animales, obtiene como producto amoníaco (Valero, 2003). El amoníaco es un elemento precursor en el ciclo del nitrógeno para la formación de productos como amonio y nitrato, que son fácilmente absorbidos por las plantas y aprovechados en su crecimiento (Valero, 2003). Una aplicación de las cepas mencionadas en los cultivos maiceros podría aportar, indirectamente, a la promoción del crecimiento vegetal, dependiendo de la urea residual presente en los suelos (Silva, 2005).

Sánchez (2004), asegura que la cantidad y el tipo de bacterias presentes en la rizósfera de suelos agrícolas varían dependiendo del cultivo vegetal, pH del suelo, humedad, temperatura, aireación, prácticas de siembra y estación del año. A pesar de esto, los géneros bacterianos que comúnmente se aíslan de ella son: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Azotobacter*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus*, *Xanthomonas*, *Nitrobacter*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Acetobacter* y *Rhizobium* (Sánchez, 2004). La gran diversidad de géneros se diferencian, microbiológicamente, por el grupo al que pertenecen ya sea Gram (+) ó (-) y porque poseen metabolismos característicos y diferentes (Sánchez, 2004).

La procedencia de las 20 cepas bacterianas fue de la rizósfera y suelos agrícolas dedicados al cultivo de maíz en la Sierra ecuatoriana (Espinoza, 2004). Es factible que las muestras al no presentar el mismo metabolismo del género *Azospirillum*, pertenezcan a uno de los géneros bacterianos mencionados.

Para tener más elementos de juicio, se analizaron las condiciones de aislamiento de las bacterias ejecutado por Espinoza en el año 2004. Las muestras de suelos colectados presentaron un pH promedio para todas las muestras de 6,33 con un % de materia orgánica en promedio de 5,43 (Espinoza, 2004). Según Jiménez (2007), el género *Azospirillum* se lo aísla, habitualmente, de suelos con pH neutros (7-7,5) y con la presencia de 8- 12% de materia orgánica, debido a que las condiciones mencionadas favorecen su crecimiento y es óptimo para la fijación de nitrógeno. Esto da la posibilidad de que las condiciones en las que se encontraban los suelos muestreados por Espinoza (2004) no fueron las óptimas para obtener una recuperación bacteriana representativa del género *Azospirillum*, dando paso al aislamiento de otros géneros bacterianos presentes en dichos suelos.

Para validar los resultados microbiológicos se realizó una identificación taxonómica empleando técnicas moleculares.

4.2. FASE II. Caracterización molecular de las cepas bacterianas

Nogales (2005) asegura que los métodos moleculares son indispensables en el estudio de clasificación taxonomía bacteriana, ya que mediante estas técnicas se pueden analizar genes específicos que permitan conocer el género al que pertenecen y sus procesos funcionales con importancia ambiental y agraria. Las técnicas empleadas en esta investigación para la identificación del género y especie de las 20 cepas bacterianas fueron ARDRA y secuenciación del gen 16S ADN ribosomal.

El gen 16Sr amplificado de todas las cepas bacterianas estuvo dentro del rango de peso molecular reportado en la literatura (1500 pb aproximadamente, Grifoni *et al.*, 1995). Este gen bacteriano se ha convertido en un marcador molecular por excelencia, debido a que posee regiones conservadas y variantes, establece relaciones filogenéticas

y se transmite verticalmente entre los individuos de la población (Rodicio y Mendoza, 2004).

En cambio, la técnica ARDRA se fundamenta en el análisis de patrones electroforéticos, obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción del producto de la amplificación del gen 16S ADNr (Jiménez, 2007). En la mayoría de casos, la aplicación de esta técnica molecular para la identificación de microorganismos, tiene un alcance taxonómico de permitir clasificarlos en género, especie y subespecies (Savelkoul *et al.*, 1999, citado por Blasco, 2009), razón por la cual, el uso de esta técnica fue la apropiada para los objetivos planteados en esta fase.

Los resultados obtenidos del ARDRA para las 20 cepas bacterianas se evidenciaron mediante el dendrograma de la figura 3.16, generado a partir del agrupamiento de las muestras según los patrones de corte enzimáticos, revelando que ninguna de las cepas bacterianas pertenece al género *Azospirillum*.

Pedraza y Díaz (2000) reportaron en una de sus investigaciones, que al emplear la técnica ARDRA con la enzima *AluI* para identificar las especies de *Azospirillum*: *A. brasilense* y *A. lipoferum*, generaron fragmentos con pesos moleculares similares a los reportados en la restricción virtual de esta investigación con la misma enzima. Esta similitud permitió considerar a los tamaños de dichos fragmentos como controles positivos para identificar el gen 16Sr de *Azospirillum*, al no contar con un control positivo in vivo para este género.

Los fragmentos tomados como controles positivos fueron comparados con los patrones de restricción del gen 16S ribosomal de las 20 cepas bacterianas. Se observaron diferencias muy notorias en los pesos moleculares entre los fragmentos comparados, demostrando que ninguna de las cepas presentó el mismo patrón de restricción para el género *Azospirillum*.

A pesar de tener resultados negativos para el género en estudio, se prosiguió con el análisis molecular. La digestión de las 20 cepas bacterianas con las enzimas *AluI* y *TaqI* reveló la presencia de ocho genotipos diferentes en la población analizada. Según

Jiménez (2007), cada genotipo obtenido de un gen específico en una población bacteriana, corresponde a una especie en particular.

Cada genotipo se forma por las diferencias en la secuencia de nucleótidos del gen analizado (Jiménez, 2007). Al contar con ocho genotipos del gen 16Sr, se atribuye que cada uno es una secuencia única del gen; por lo tanto, a nivel taxonómico las muestras analizadas corresponden a ocho especies bacterianas diferentes.

De los ocho genotipos obtenidos, dos de ellos (genotipos II y VI) fueron considerados como dominantes, debido a que agruparon un mayor número de cepas (siete cada uno). Esto indicó que las muestras contenidas en los dos genotipos estaban, posiblemente, mejor adaptadas a las condiciones que presentaron los suelos maiceros de las provincias de la Sierra ecuatoriana, aumentando su frecuencia de recuperación bacteriana (Pérez, 2005).

Por otro lado, el análisis con la enzima *EcoRI* evidenció un mayor porcentaje de polimorfismos (16,21%). A pesar de esto, el número de genotipos obtenidos fue menor (cuatro genotipos) con respecto a las dos enzimas anteriores. Esta diferencia radicó en que para las cepas 8, 13 y 15 la enzima no encontró su sitio de corte, limitando la obtención de más de patrones de restricción (Pérez, 2005).

La siguiente técnica molecular aplicada en esta fase, correspondió a la secuenciación del gen 16S ADNr. Esta técnica permitió la asignación del género y especie a las 20 cepas bacterianas. Rodicio y Mendoza (2004) aseguran que una vez determinada la secuencia del gen 16Sr bacteriano, es factible establecer comparaciones con las bases de datos existentes para el gen. Según sea el grado de similitud entre los nucleótidos de las secuencias comparadas indicará la ubicación taxonómica de las mismas (Rodicio y Mendoza, 2004).

Hoy en día, existe la disponibilidad de secuenciadores automáticos que facilitan el conocimiento del orden de los nucleótidos de un gen en particular. A pesar de esta tecnología, Rodicio y Mendoza (2004) contemplan que las secuencias obtenidas con dichos equipos podrían tener errores y/o presentar posiciones ambiguas en los nucleótidos (N), que dificulten el análisis de las mismas. Para resolver los problemas

mencionados y asegurar la validez de los resultados, las secuencias obtenidas y enviadas por los laboratorios MACROGEN fueron editadas evaluando los cromatogramas y alineando la cadena forward (5'-3') y reverse (3'-5') a través del programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.

Diecisiete de las 20 secuencias fueron editadas y se sometieron al análisis de homología empleando la base de datos BLAST. Este análisis consideró dos parámetros para dar a conocer el grado de similitud comparativo entre las secuencias: el porcentaje de cobertura entre la secuencia problema y su homólogo, y el porcentaje de identidad máxima. Mientras mayores sean los valores de estos porcentaje, mayor similitud poseen las secuencias analizadas (Altschul *et al.*, 1997). Las muestras indicaron un porcentaje de cobertura del 100% y un porcentaje de identidad máxima entre el 98% y 100%, considerando que las muestras poseen un alto grado de similitud al género y especie asignado por el BLAST.

El alineamiento de las secuencias identificadas evidenció diferencias entre el gen 16Sr de *Azospirillum* y las muestras. Estas diferencias radicarón, básicamente, en la presencia de pequeñas regiones de nucleótidos únicos para el género bacteriano que lo poseía. Jiménez (2007) denomina a estas regiones únicas como “nucleótidos firma” que aparecen en los miembros de un determinado grupo filogenético y raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Estos nucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo (Jiménez, 2007).

La presencia de los nucleótidos firma permitió la obtención de las distancias genéticas entre las secuencias analizadas de esta investigación, dando origen a la ilustración de un árbol filogenético. Rodício y Mendoza (2004) asegura que los árboles filogenéticos ilustran la genealogía molecular de la bacteria, dando a conocer su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. El árbol obtenido en esta investigación indicó que la relación evolutiva de las 20 muestras analizadas con *Azospirillum* es nula.

La comparación de genomas completos, y no la comparación de genes, es la que aporta con una exacta relación evolutiva; pero, al no contar con ella Rodício y Mendoza (2004) aseguran que para estudios de taxonomía bacteriana, valores mayores al 97% de

homología entre el gen 16Sr de las secuencias problema con las bases de datos, es suficiente para decir que probablemente éstas se encuentren relacionadas evolutivamente a nivel de especies. El porcentaje de identidad de las secuencias analizadas con las secuencias de la base datos BLAST fue del 98 - 100%, demostrando con alta probabilidad que se encuentran relacionadas evolutivamente al género y especie asignados.

Ocho fueron las especies identificadas dentro de las 20 cepas bacterianas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomonas humi*, *Acinetobacter lwoffii*, *Brevundimonas diminuta*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Stenotrophomonas rhizophila* y *Pseudomonas umsongensis*. Este resultado confirmó que los ocho genotipos identificados con las enzimas de restricción *AluI* y *TaqI*, correspondieron a una especie bacteriana diferente por su secuencia única en el gen 16Sr (Collados, 2006).

Adicionalmente, la identificación realizada permitió complementar el resultado del ARDRA en cuanto a la existencia de dos genotipos dominantes en las 20 cepas bacterianas. Estos dos genotipos correspondieron a los géneros *Bacillus* y *Stenotrophomonas*. Sánchez (2004) menciona que al aislar microorganismos del suelo, de cada cien aislados aproximadamente el 67% pertenecen al género *Bacillus*, el 20% a *Stenotrophomonas*, el 15% a *Pseudomonas*, el 10% a *Agrobacterium* y menos del 5% a otros géneros bacterianos. La frecuencia de aislamiento medida en porcentaje coincide proporcionalmente a la población de las 20 cepas bacterianas en estudio junto con los géneros mencionados.

Para la identificación taxonómica y validación de análisis de un microorganismo se deben aplicar tanto: criterios morfológicos, bioquímicos y moleculares (Rodício y Mendoza, 2004). Al contar con el género y especie de cada muestra, se verificó que los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas correspondan a los géneros identificados. Cada resultado de las 20 cepas bacterianas coincidió con los reportados en el manual de Mc Faddin (2003) para los géneros: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Brevundimonas* (Anexo I).

Con este análisis también se identificó a las muestras cuyas secuencias no se determinaron por problemas en el proceso de secuenciación. Para esto se tomó como

criterios el dendrograma metabólico y molecular, obteniendo que las tres cepas pertenecen a los géneros: *Bacillus* (cepa 6), *Stenotrophomonas* (cepa 10) y *Pseudomonas* (cepa 15). Estas especies pertenecen a los géneros bacterianos que comúnmente se aíslan de suelos y rizósfera de las plantas (Sánchez, 2004).

El dendrograma bioquímico también dio a conocer que a pesar de que las muestras pertenezcan a géneros bacterianos diferentes, éstas poseen algunas funciones metabólicas similares entre ellas y con *Azospirillum*, reflejado en un coeficiente de similitud de 0,66. Mc Faddin (2003) reporta que los géneros con procedencia edáfica poseen metabolismos similares, ya que provienen de un mismo hábitat y similares condiciones ambientales. Los géneros identificados bioquímica y molecularmente son de procedencia edáfica siendo posiblemente la razón de que sus metabolismos poseen dicho grado de similitud.

Según Mc Faddin, cada género microbiano posee pruebas bioquímicas y moleculares específicas para diferenciarlo de otros microorganismos. Dichas pruebas no se realizaron en esta investigación, debido a que la identificación preliminar de las cepas las ubicaba dentro del género *Azospirillum* (Espinoza, 2004). Esta identificación fue el patrón para la selección de la metodología a emplear en el análisis taxonómico. A pesar de esto, la identificación bioquímica y molecular se complementó dando conocer el tipo de microorganismo que el Programa de Maíz del INIAP había colectado de los suelos maiceros de las provincias de la Sierra.

4.3. FASE III. Evaluación funcional *in vitro* de las cepas bacterianas

Las rizobacterias más estudiadas para el desarrollo de biofertilizantes son aquellas que poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico o promueven el crecimiento vegetal (PGPR) o son solubilizadores de compuestos (Jiménez, 2007). Dentro de estos se encuentran los géneros bacterianos: *Bacillus*, *Clostridium*, *Klebsiela*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Rhizobium* (Jiménez, 2007).

Según las fases anteriores, el programa de Maíz del INIAP cuenta con 20 cepas bacterianas identificadas, donde siete de ellas pertenecen al género *Bacillus*, dos a

Pseudomonas y una a *Agrobacterium*. En teoría, estos géneros son idóneos para elaborar un biofertilizante aplicable al cultivo de maíz de la sierra ecuatoriana. Este interés permitió evaluar *in vitro* a las 20 cepas identificadas para dar a conocer su capacidad funcional.

La diversidad bacteriana de las cepas del INIAP es de ocho especies distintas. Para el ensayo *in vitro* se empleó la metodología del INIFAP (2008), ya que esta permite evaluar funcionalmente distintos géneros y especies bacterianas, homogenizando las variables: concentración de biomasa, volumen del inóculo, preparación del cultivo líquido de las cepas y la temperatura de incubación. Esto permitió descartar la variabilidad en el ensayo por la diversidad de géneros bacterianos evaluados (Sánchez, 2002).

El análisis estadístico de esta fase determinó que la cepa 13, identificada como *Pseudomonas umsongensis*, presentó el mayor promedio (13,95 cm) para la variable longitud de raíz, catalogándose como el mejor tratamiento. Según Barreto *et al.* (2007), explica que algunas especies del género *Pseudomonas* son destacadas por su capacidad de producir sustancias promotoras del crecimiento (auxinas), que estimulan la germinación de semillas, incrementan el tamaño de raíces y el desarrollo de pelos radiculares.

Estudios publicados por Valero (2003) y Sánchez *et al.* (2005), registran la producción de ácido indol acético (AIA) en cultivos líquidos de *Pseudomonas* sp. en cantidades de 51 mg/L a las 72 horas de incubación. La suspensión bacteriana preparada con la cepa 13 para este ensayo, tuvo un periodo de incubación de 48 horas, antes de ser inoculada a las semillas de maíz, siendo probable que en dicha suspensión, a parte del medio de cultivo y la bacteria, se inoculó metabolitos de AIA que promovieron la elongación de la raíz *in vitro*.

Se desconoce si la especie *umsongensis* del género *Pseudomonas* produce reguladores de crecimiento, al no contar con investigaciones que relacionen esta especie con aplicaciones en cultivos vegetales *in vitro*. Sin embargo, con los resultados obtenidos es probable que la causa de la elongación radicular de las semillas de maíz es porque la cepa *Pseudomonas umsongensis* es una rizobacteria PGPR.

En contraste al mejor tratamiento para la variable longitud de raíz, se observó que el testigo absoluto (semillas de maíz sin inoculación) fue el tratamiento con el menor promedio (11,33 cm) y se ubicó en el último rango según Tukey para la variable longitud de raíz. Este resultado validó que la cepa 13, *Pseudomonas umsongensis*, promovió la mayor elongación de las raíces en comparación al crecimiento normal de las semillas de maíz I-101. La cepa 13 podría ser seleccionada para el desarrollo de un bioestimulante aplicable para las semillas de maíz, si el interés es la elongación del sistema radicular.

La variable número de raíces principales desarrolladas, obtuvo que el mejor tratamiento fue con la cepa 20 identificada como *Bacillus subtilis*, con un promedio de 2.55 raíces desarrolladas. Felici *et al.* (2008) describe que *Bacillus subtilis* pertenece a las rizobacterias PGPR por secretar reguladores de crecimiento, como el AIA en cantidades de 55µg/mL en medios de cultivo líquidos a las 48h de incubación.

El medio de cultivo líquido preparado con la cepa 20 para el ensayo, tuvo un período de incubación de 48 horas antes de colocarla en las semillas de maíz, observando que según lo reportado, *Bacillus subtilis* secretó AIA al medio y al inocularlo en las semillas la solución contenía el regulador de crecimiento. Cassán *et al.* (2002) reportan que el AIA exógeno al ser absorbido por las raíces, activa un mecanismo homeostático para modificar el sistema hormonal endógeno llegando a un equilibrio para estimular el desarrollo prematuro del sistema radical.

Estos resultados contrastan con la cepa 3, identificada como *Stenotrophomonas humi*, que presentó el menor promedio de todos los tratamientos para la variable número de raíces (1,99 raíces desarrolladas). El género *Stenotrophomonas* al ser una bacteria de vida libre su distribución abarca varios ambientes edáficos (Reinhardt *et al.* 1990). Hauben, *et al.* (1999) asegura que algunas especies de *Stenotrophomonas*, entre ellas: *S. maltophilia*, *S. rizophila* y *S. humi*, se clasifican dentro de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) que habitan en la rizósfera de varias especies vegetales.

La cepa 3, *Stenotrophomonas humi*, presentó un promedio menor a todos los tratamientos, incluidos los tratamientos testigos, indicando que la presencia de esta bacteria causó un posible retardo en el crecimiento radicular de las semillas. Ensayos de

inoculación con bacterias PGPR reportan que la desaceleración o inhibición del crecimiento radicular en la plántulas inoculadas se debe a dos razones: concentraciones elevadas de biomasa bacteriana y una producción excesiva de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citoquininas o etileno) por parte del microorganismo inoculado (Caballero, 2001).

Stenotrophomonas humi al ser considerada como PGPR se le atribuye estas dos razones de inhibición, aunque se descarta la primera opción sobre la concentración elevada de biomasa bacteriana; debido a que, esta fue una variable controlada en el ensayo *in vitro*. De cada cepa se inoculó 10^6 UFC en las semillas de maíz pregerminada. Esta concentración, según Caballero (2001), causa tanto la elongación como el aumento de la superficie total de la raíz; poniendo a consideración, que una producción excesiva de fitohormonas por parte de la cepa 3 pudo causar la inhibición del crecimiento radicular.

Glick *et al.* (1998) confirma lo mencionado al reportar que una concentración excesiva de AIA producida por las rizobacterias sumado al AIA producido endógenamente por la planta pueden activar la producción del 1-Acido 1-aminociclopropano 1-carboxílico (ACC), precursor del etileno, el cual puede anular la acción del AIA endógeno y exógeno inhibiendo la elongación y desarrollo radicular de las plántulas inoculadas.

Una promoción del crecimiento exitosa por parte de una cepa no se da únicamente por el potencial de producción de AIA, sino también influye la colonización y expansión de la biomasa bacteriana en la raíz durante un tiempo considerable para que se produzca un efecto promotor del crecimiento (Compant *et al.*, 2005). Esto se debe a que los compuestos hormonales producidos por las rizobacterias deben proveerse de forma continua y en concentraciones constantes y bajas, ya sea en el exterior de las raíces o en el interior de la planta, para que estos sean suplementos beneficiosos para el vegetal (Compant *et al.*, 2005).

La última variable analizada fue el porcentaje de materia seca, donde también el género *Bacillus subtilis* destacó como promotor en el desarrollo de biomasa radicular. La cepa 6, *Bacillus subtilis*, evidenció el mayor promedio de todos los tratamientos con

un porcentaje de materia seca del 26,06%. Esto a comparación con el tratamiento de la cepa 16, identificada también como *Bacillus subtilis*, que produjo el menor promedio de 16,94% en materia seca. Aunque las dos cepas bacterianas (6 y 16) pertenecen a la misma especie, se observa que existen diferencias funcionales entre ellas.

Según Robles y Barea (2004), las rizobacterias pueden modificar su rango de compatibilidad funcional con la planta hospedera en función de diversas variables, como: la especie vegetal, los aportes nutricionales del medio, las condiciones ambientales de crecimiento y el manejo que recibe el sistema. Con los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* para la variable porcentaje de materia seca, se observó que la cepa 6 modificó su compatibilidad funcional para generar resultados positivos en la promoción de la biomasa radicular, mientras que la cepa 16 generó resultados contrarios, a pesar de que las dos cepas pertenecen a la especie *Bacillus subtilis subtilis*.

Finalmente, en las gramíneas el crecimiento de la raíz es uno de los parámetros fisiológicos de mayor interés a la hora de caracterizar funcionalmente y seleccionar una cepa promotora del crecimiento vegetal (Cassán *et al.*, 2002). La cepa seleccionada deberá producir la elongación de la raíz principal y/o la proliferación de las raíces adventicias, aportando beneficios adaptativos en la planta al mejorar su capacidad de anclarse al suelo y obtener agua y nutrientes del ambiente en cada etapa de su desarrollo vegetal (Cassán *et al.*, 2002).

Las tres variable evaluadas en la fase *in vitro* se enfocaron específicamente en el desarrollo fisiológico de la raíz, observándose que las cepas 13, 20 y 6 son las que promovieron el crecimiento radicular de las semillas de maíz; esto, las posiciona como microorganismos potenciales para elaborar un biofertilizante. Para validar los resultados obtenidos del ensayo *in vitro*, las mismas cepas se evaluaron a condiciones de invernadero para corroborar que su efecto funcional se mantiene estable.

4.4. FASE IV. Evaluación funcional en invernadero de las cepas bacterianas.

La evaluación en invernadero se llevó a cabo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y luz. La variable que brindó información funcional de las cepas fue el porcentaje de materia seca, donde el análisis de varianza indicó que todos los tratamientos tuvieron diferencias significativas ($p < 0,01$) con la formación de siete rangos en la prueba de Tukey al 5%. En el primer rango como el mejor tratamiento se colocó la cepa 6, identificada como *B. subtilis*, con un promedio del 32,78% de materia seca formada, en comparación con el tratamiento de menor promedio que fue la cepa 5, también identificada como *B. subtilis*, con un promedio del 20,37% de materia seca.

La diferencia funcional entre cepas de la misma especie sigue siendo evidente, ya que las nuevas condiciones ambientales modifican el comportamiento y la adaptación bacteriana, limitando en parte la acción funcional de la misma (Robles y Barea, 2004). A pesar de esta limitación, la cepa 6 (género *B. subtilis*) resultó ser el mejor tratamiento para la variable porcentaje de materia seca, tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero. La constancia en dichos resultados indicó que esta cepa promueve el desarrollo de mayor biomasa vegetal tanto en semillas como en plantas desarrolladas de maíz I-101.

El alcance de este hallazgo radica en que el desarrollo de biomasa radicular (materia seca) es de suma importancia para la planta de maíz, especialmente para maíces del tipo suave al cual pertenece la variedad I-101. Según García y Watson (2003) una de las principales causas de pérdidas del rendimiento para este tipo de maíz es el “acame” o volcamiento de la parte aérea de la planta por debilitamiento y falta de un buen desarrollo de materia vegetal.

Los genotipos de maíz suaves son los más demandados a nivel del consumo humano y son los más susceptibles al acame, siendo la causa de pérdidas significativas para los agricultores que lo cosechan (García y Watson, 2003). Una mejor absorción de los nutrientes del suelo, por parte de las raíces, conlleva al desarrollo de tallos más fuertes y gruesos con resistencia al volcamiento ante condiciones adversas. Esta absorción de nutrientes por parte de las raíces se mejora cuando se promueve el aumento de su superficie y biomasa radicular (García y Watson, 2003).

La cepa 6, perteneciente al género *B. subtilis*, refleja su capacidad funcional sobre el maíz suave de la variedad INIAP-101, mediante el desarrollo de un alto porcentaje de materia seca, tanto a nivel de raíces y tallos permitiendo seleccionarla para el desarrollo de un biofertilizante como aplicación tecnológica en el cultivo de maíz suave.

Un biofertilizante desarrollado en base a *B. subtilis* (cepa 6) no solo permitiría contrarrestar las pérdidas de producción por el acame o volcamiento del cultivo de maíz; sino que, también contribuiría al control biológico del mismo contrarrestando la acción de hongos, nemátodos y otros microorganismos patógenos que atentan con la salubridad de este cereal (Felici *et al.*, 2008).

Según Cuervo (2010), señala que la bacteria *Bacillus subtilis* secreta proteínas con propiedades anti fúngicas, utilizándolo para el control biológico de *Phytophthora infestans*, *Phytophthora sojae* y *P. capsici* en suelos infestados con el mismo y es un bicontrolador de larvas de *Anopheles Psudopunctipennis* y *Culex Quinquefasciatu*. Adicionalmente, *Bacillus subtilis* aparte de secretar fitohormonas, asegura la promoción del crecimiento de la raíz y la planta por el incremento en el contenido de lípidos, triglicéridos y esterol en su entorno, que son aprovechados exclusivamente por las raíces vegetales (Cuervo, 2010).

Sin embargo, el crecimiento y desarrollo de las plantas en invernadero por el periodo de evaluación de 45 días, manifestó claramente problemas de clorosis en las hojas de todas las plantas. Este resultado se debió a que el sustrato empleado para el crecimiento de las plantas no presentó ningún tipo de fertilización química, simplemente contaba con los nutrientes descritos en el análisis químico del sustrato, donde el nitrógeno y el fósforo se encontraban en niveles medios; mientras, que el potasio se encontraba en niveles altos, siendo estos niveles aceptables para el desarrollo vegetal, durante las primeras etapas de crecimiento (hasta el estado fisiológico V3 del maíz) (INIAP, 2007).

La cantidad de nutrientes disponibles en el sustrato, durante el tiempo de permanencia en invernadero, se agotaron poco a poco evidenciando que estos siguieron un comportamiento de tendencia decreciente, determinado por la producción de

biomasa vegetal, independientemente de la inoculación bacteriana (Robles y Barea, 2004). Esta decreciente en los nutrientes fue esperada en el ensayo, permitiendo dar paso al aporte funcional de las cepas inoculadas sobre las plantas de maíz I-101.

Si las cepas hubieran pertenecido a microorganismos diazotróficos su función se hubiera centrado en suplir, parcialmente, la ausencia de nitrógeno mediante la fijación atmosférica del mismo, retardando la clorosis de las plantas (Caballero, 2001). Esto no sucedió, debido a que de todas las 20 cepas bacterianas ninguna es diazotrófica (Sánchez, 2004).

Roble y Barea (2004) señala que la cantidad de nutrientes aportados por las cepas bacterianas PGPR es muy baja para suplir completamente la demanda nutricional de las plantas; siendo éstas las responsables del agotamiento de la fertilidad del suelo. Al observarse este resultado en el ensayo de invernadero, se evidenció que las cepas inoculadas no suplen la ausencia de nutrientes y por ende no reemplazan la fertilización química.

Es obvio que los efectos benéficos de los biofertilizantes brindan ventajas tanto funcionales como económicas sobre los fertilizantes químicos; sin embargo, el fin de un biofertilizante es complementar el proceso natural de nutrición de las plantas, regenerar la población microbiana del suelo y proteger el sistema radicular de la planta contra microorganismos patógenos, mas no reemplazar la fertilización inorgánica; teniendo como meta modernizar la agricultura tradicional mediante la aplicación de tecnologías ecológicas que aprovechan los recursos de manera más eficiente (Morales, 2002).

Con la afirmación realizada el papel funcional de las cepas inoculadas fue minimizado por los altos requerimientos nutricionales de las plantas durante el tiempo de la evaluación (45 días) (Roble y Barea, 2004). Este hecho se manifestó en el análisis de las variables altura de planta y longitud de raíz, al no presentar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. A pesar de esto, la cepa 6 (*B. subtilis*) no definió su acción funcional al promover el mayor desarrollo de materia seca (biomasa vegetal) colocándola como el mejor tratamiento de esta variable y ensayo funcional.

Finalmente, los resultados de esta investigación contribuyen al conocimiento de las especies bacterianas presentes en los suelos dedicados al cultivo de maíz de las provincias de la Sierra ecuatoriana, observándose que algunas de ellas tienen potencial de ser promotoras del crecimiento vegetal. Con la información obtenida, éstas bacterias pueden ser utilizadas en la preparación de biofertilizantes para aplicarlos en ensayos de campo, esperando resultados en la mejorar la productividad de los cultivos de maíz, especialmente de la variedad I-101; además, de minimizar la utilización de productos químicos, mejorar de la economía regional, recuperar la fertilidad del suelo y la conservación del medio ambiente.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. La caracterización microbiológica alegó que las 20 cepas bacterianas del INIAP poseen un metabolismo completamente diferente al género *Azospirillum*.
2. El análisis ARDRA dio lugar a ocho genotipos del gen 16Sr, correspondientes a ocho especies bacterianas diferentes presentes en la población analizada.
3. La técnica de secuenciación identificó las ocho especies bacterianas como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus subtilis subtilis*; *Stenotrophomonas maltophilia*; *Stenotrophomonas humi*; *Stenotrophomonas rhizophilia*; *Acinetobacter*; *Brevundimonas diminuta* y *Pseudomonas umsongensis*.
4. La caracterización funcional *in vitro* identificó a las cepas 6, 13 y 20 como rizobacterias con actividad promotora del crecimiento vegetal (PGPR).
5. La cepa 13- *Pseudomonas umsongensis* promovió la elongación de las raíces principales en las semillas de maíz I-101, a condiciones *in vitro*.
6. Las cepas 6 y 20 - *Bacillus subtilis subtilis*, obtuvieron el mayor promedio de porcentaje de materia seca y número de raíces principales, al inocularlas sobre semillas de maíz I-101 bajo condiciones *in vitro*.
7. La caracterización funcional en invernadero identificó a la cepa 6-*Bacillus subtilis subtilis* como el mejor tratamiento en promover el desarrollo de biomasa vegetal en plantas de maíz, variedad I-101.
8. La cepa 6-*Bacillus subtilis subtilis* evidenció su capacidad funcional sobre el maíz suave INIAP-101, mediante el desarrollo de un alto porcentaje de materia seca tanto a condiciones *in vitro* como invernadero

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

1. Realizar una segunda colecta para el aislamiento de ejemplares perteneciente al género *Azospirillum* spp. en los suelos maiceros de la Sierra ecuatoriana, teniendo como base la identificación taxonómica y la evaluación funcional descritas en esta investigación.
2. Emplear pruebas bioquímicas primarias, secundarias y terciarias para la identificación microbiológica de aislados bacterianos.
3. Contar con ejemplares bacterianos certificados que pertenezcan al género que se desea identificar, para utilizarlos como patrón de referencia y compararlos con las muestras a analizar.
4. A nivel molecular para la identificación de bacterias diazotróficas, se recomienda trabajar con genes involucrados en la fijación de nitrógeno como los genes *nif*.
5. Realizar la misma evaluación en condiciones *in vitro* e invernadero de las 20 cepas bacterianas en semillas y plantas de maíz diferentes a la variedad evaluada, para constatar si el efecto promotor del crecimiento varía según la planta hospedera.
6. Elaborar una metodología para cuantificar la producción de reguladores de crecimiento en las cepas identificadas como rizobacterias PGPR en esta investigación.
7. Realizar pruebas en invernadero y en campo sobre la interacción de las cepas bacterianas identificadas como PGPR con fertilizantes químicos nitrogenados en cultivos de maíz de la Sierra ecuatoriana.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, E. (2005). Fisiología del rendimiento Maíz. Universidad de Chile. Extraído el 6 de Noviembre del 2011 del sitio web: [http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/Fisiologia del rendimiento maíz.pdf](http://www.sap.uchile.cl/descargas/fisiogenetica/Fisiologia_del_rendimiento_maíz.pdf)

Aguirre-Medina, J. Irizar-Garza, M. Duran-Prado, A. Grajeda-Cabrera, O. Peña del Rio, M. Loredo-Osti, C. y Gutiérrez-Baeza, A. (2009). Los Biofertilizantes microbianos: alternativa para la agricultura en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Rosario Izapa, Tuxtla Chico, Chiapas. México. pp 86.

Altschul, S. Gish, W. Miller, E. y Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25: 3389-402 p. Sitio web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Arteaga, E. Torres, L. y Tobalina, C. (2004). Análisis de la Cadena Productiva y Comercializadora del maíz y como fuente de exportación. Universidad Escuela Superior Politécnica del Litoral. p 12. Extraído el 15 de Octubre del 2011 del sitio web: <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/524/1/1013.pdf>.

Asturias, M. A. (2004). Maíz, de alimento sagrado a negocio del hambre. Acción Ecológica. Red por una América Latina libre de transgénicos. Quito- Ecuador. pp 111.

Baldani, V. Baldani, J. y Döbereiner, J. (1983). Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 29:924-929.

Barreto, D. Valero, N. Muñoz A. y Peralta A. (2007). Efecto de microorganismos rizosféricos sobre germinación y crecimiento temprano de *Anacardium excelsum*. Universidad Popular del Cesar. Colombia. *Revista zonas Aridas* 11(1). p 240-250.

Bashan, Y. y Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadian Journal of Microbiology 36:591-608.

Benitez, M. Tustal, F. Rotenberg, D. Kleinhenz, M. Cardina, J. Stinner, D. Miller, S. y McSpadden Gardener, B. (2007). Multiple statistical approaches of community fingerprint data reveal bacterial populations associated with general disease suppression arising from the application of different organic field management strategies. Soil Biology & Biochemistry 39 (9): 2289-2301.

Blasco, L. (2009). Aplicación de técnicas FISH, PCR específica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada con el proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Departamento de Microbiología y Ecología. Facultad de Ciencias Biológicas. Valencia. pp 173.

Bradshaw, L. (1976). Microbiología de Laboratorio. Traducido del inglés por Gonzalo Peña. El Manual Moderno. México, D.F. 26-28, 231 pp.

Bolton, H. Fredrickson, J. y Elliot, L. (1993). Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyls elongation. Fisiología de Plantas. 1075-1082 pp.

Caballero - Mellado, J. (2001). El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM. México. pp 22.

Cassán, F. Sgroy, V. Perrig, D. Masciarelli, O. y Luna, V. (2002). Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la interacción planta-microorganismo. Departamento de Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina. 61-86p.

Castañedo, P. (1990). El maíz y su cultivo. Editorial AGTEditor S.A. primera edición México, D.F. México. pp 256.

Caviedes, M. Yáñez, C. Silva, E. Dobronsky, J. Zambrabo, L. Caicedo, M. y Heredia, J. (2002). Nueva Variedad de Maíz Blanco Harinoso INIAP-101. Boletín divulgativo No. 82. Programa de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador. pp 8.

Chenoll, E. Macián, M.C. y Aznar, R. (2006). Isolation and characterization of malolactic bacteria from Israeli red wines. *Journal of food Science*. 42, 939-943.

Cholula, L. (2005). Estudio de la producción de poli β -hidroxibutirato (PHB) EN *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis Maestro en ciencias en Biotecnología Genómica. Tamaulipas- México. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. pp 67.

CIAT. (1988). Manual de métodos de evaluación, selección y manejo. Simbiosis leguminosa- Rhizobium. Proyecto Especial CIAT- UNDP. Capítulo 11. 36-42 pp.

Cisternas, O. (2007). La tinción de Gram como herramienta de uso diario en el diagnóstico precoz de algunos patógenos. *Revista del Hospital del niño*. Vol. 23: 141-146. Panamá.

Cool, A. (2010). Evaluación del biofertilizante a base de cepas de *Azospirillum* spp. en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) variedad INIAP-101, en complemento con tres tipos de fertilización, en el sector Ainche, provincia de Chimborazo. Tesis Ingeniero Agrónomo. Guaranda - Ecuador. Universidad Estatal de Bolívar. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Ingeniería Agronómica. pp 104.

Collados, C. (2006). Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizósfera de trigo y maíz. Tesis doctoral. Granada. Universidad de Granada. Departamento de microbiología. pp 162.

Compant, S. Duffy, B. Nowak, J. Clement, C. Barka E.A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and environmental microbiology*, 71(9): 4951–4959.

Coyne, M. (2000). Microbiología del Suelo: Un Enfoque Exploratorio. Editorial Paraninfo. Madrid- España.

Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Tesis para la obtención del título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Bogotá DC. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá D.C. Departamento de Biología. Facultad de ciencias. pp 28

Díaz, P. Ferrera, J. Almaraz, J. y Alcántar, G. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra 19. 327-335.

Dicks, L. Vann Vuuren, H. y Dellaglio, F. (1990). Taxonomy of *Leuconostoc* species, particularly *Leuconostoc oemos*, as revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns, ADN base compositions, and ADN – ADN Hybridizations. International Journal of Systematic Bacteriology. 40, 83-91.

Döbereiner, J., Marriel, I. y Nery, M. (1976). Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*. Canadian Journal of Microbiology 22: 1464-1473.

Döbereiner, J. (1980). Forage Grasses and Grain Crops: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Editado por F. J. Bergersen. John Wiley & Sons. 545, 549–555.

Döbereiner, J. (1995). Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. En: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Editado por Kassem Alef y Paolo Nannipieri. Academic Press Limited. London, Great Britain. 134-139 pp.

Dobronski, J. Silva, E. y Vásquez, J. (1999). Control del gusano de la mazorca de maíz mediante el uso de aceite vegetal. Plegable Divulgativo No. 166. INIAP-COSUDE. Quito- Ecuador.

Echeverría, F. Castro, M. y Arias, V. (2000). Plan de Acción 2000. Programa Nacional de Agricultura Orgánica. IICA. San José, Costa Rica. 14 pp.

Enciclopedia Terranova. (1995). Producción agrícola 1. Editor Terranova. Bogotá-Colombia. 110-115 pp.

Espinoza, L. (2004). Caracterización y selección de la bacteria diazotrófica *Azospirillum* spp. asociado con el maíz de altura (*Zea mays* L). INIAP. Tesis Licenciatura. Quito-Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Biología. pp 164.

Fallick, 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 tuning of inoculation. *Soil Biol. Biochem.* 20: 25 – 49.

FAO. (2010). Perspectivas Alimentaria. Sistema de Información Mundial sobre Agricultura y alimentación (SMIA). Extraído el 24 de Agosto del 2010 del Sitio web: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/ai474s00.pdf>

Felici, C. Vettori, L. Giraldi, E. Forino, L. Toffanin, L. Tagliasacchi, L. Nuti, M. (2008). Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 40:260–270.

Fernández, B. Brunker, T. y Ryan, K. (1978). Microbiología Básica y Aplicada. Manual de Laboratorio. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 6, 7, 9 y 117 pp.

Ferrera - Cerrato, R. (1995). Efecto de rizósfera. En *Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sostenible*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo. México. 36-53 pp.

Fernández, J. (2007). Energía renovable. Editorial Sacal. Barcelona España. pp 20.

Gamazo, C. López -Goñi, I. Díaz, R. (2005). Manual práctico de Microbiología. 3ra. Editorial Masson S.A. Barcelona-España. p. 47-52.

García, M. y Watson, E. (2003). Herencia de la resistencia al acame de raíces en maíz dulce (*Zea mays* L.). INIA Monagas Estación Experimental Caripe. Monagas Venezuela Revista UDO Agrícola 3 (1): 24-33.

Girard, H. y Rougiex, R. (1964). Técnica de Microbiología Agrícola. Zaragoza-España. pp 244.

Glick, R. (1995). The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41:109-117.

Glick, B.R. Penrose, D.M. Li J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical biology. 190:63-68.

Gobernado, M y López, J. (2003). Identificación Bacteriana. Presente y futuro de la Microbiología Clínica. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario La Fe. Valencia España. 21(Supl. 2):54-60.

Grifoni, A. Bazzicalupo, M. Di Serio, C. Fancelli, S. y Fani, R. (1995). Identification of *Azospirillum* strains by restriction fragment length Polymorphism of the 16S rADN and of the histidine operon. FEMS Microbiology Letters 27:85-91.

Guerrini, S. Bastianini, A. Blaiotta, G. Granchi, L. Moschetti, G. Coppola, S. Romano, P. y Vincenzini, M. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strains isolated from Italian wines. International Journal of Food Microbiology. 83, 1-14.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl.Acids. Symp.Ser.41:95-98.

Hartmann, A. Singh, M. y Klingmüller, W. (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. Canadian Journal of Microbiology. 29:916-923.

Hauben, L. Vauterin, L. Moore, E. Hoste, B. y Swings, J. (1999). Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 1749-1760.

Hernández, W. (2003). Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum*, y evaluación de su capacidad para suplir las necesidades de nitrógeno en plantas de *Oryza sativa* (arroz). Informe de práctica de especialidad. Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Carrera de Ingeniería en Biotecnología Escuela de Biología. pp 46.

Holguín, G. Bashan, Y. y Ferrera-Cerrato, R. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos: III. Procedimientos para el aislamiento y caracterización de hongos micorrizicos y rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas. *Terra*. Volumen 14. Número 2. 211-227 pp.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. y Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 39-56 pp.

Hugh, R. y Leifson, E. (1953). La importancia taxonómica de metabolismo fermentativo contra la oxidación de hidratos de carbono por varias bacterias Gram-negativas. *Journal of Bacteriology*. 66: 24-26. 66: 24-26.

INIAP. (2004). Informe Anual. Programa de Maíz. Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito Ecuador. 41-56 pp.

INIAP. (2007). Informe Anual. Manejo de Nutrientes por sitio específico con Labranza de Conservación en el Cultivo de Maíz. Laboratorio del Departamento de Manejo de Suelos y Aguas. Estación Experimental Santa Catalina. INIAP. Quito-Ecuador. pp 27.

INIAP. (2008). Modulo de capacitación para el cultivo de maíz suave. Manual de Capacitación para capacitadores. Dirección de transferencia de tecnología: Programa de maíz y Núcleo de transferencia y comunicación. pp 32.

INIFAP. (2008). Potencial de bioinoculantes microbianos como una alternativa para reducir costos de fertilización en maíz temporal. Campo Experimental Bajío. Unidad de Biotecnología. México - Guanajuato. pp 58.

INEC y ESPAC. (2009). Sistema Agroalimentario del Maíz. Extraído el 20 de Enero del 2012 del sitio web: <http://www.ecuadorencifras.com/sistagroalim/pdf/Maíz.pdf>

Jiménez, J. (2007). Caracterización Molecular de Cepas Nativas Colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de Restricción del ADN ribosomal 16S. Tesis Microbiólogo Industrial. Bogotá-Colombia. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Microbiología Industrial. pp 105.

Jugenheimer, R. (1988). Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas. Limusa. México. pp 847.

Junior, F. Silva, M. Teixeira, K. Urquiaga, S. y Reis, M. (2004). Identification of *Azospirillum amazonense* isolates associated to *Brachiaria* spp. At different stages and growth conditions and bacterial plant hormone production. Revista Brasileña de Ciencias del suelo Vol. 28. 103-113 pp.

Kato, T.A. Mapes, C. Mera, L. Serratos, J. A. y Bye, R. A. (2009). Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. pp 116.

Kirchhof, G. y Hartmann, A. (1992). Development of gene-probes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. Symbiosis 13:27-35.

Krieg, N. y Döbereiner, J. (1984). Genus *Azospirillum* Tarrand, Krieg and Döbereiner 1979. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1. Editado por Noel Krieg y John Holt. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 94-104 pp.

Kumar, S. Parthiban, T. y Rao, G. (2008). Molecular characterization of *Jatropha* genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol Biol Rep* 36, 1951 – 1956.

Kunc, F. y Macura, J. (1988). Mechanisms of adaptation and selection of microorganisms in the soil. En *Asociaciones Microbiológicas del suelo*. Amsterdam: Elsevier. 281-299 pp.

Ladha, J. Barraquio, W. y Watanabe, I. (1982). Immunological techniques to identify *Azospirillum* associated with wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology* 28:478-485.

Lamo de Espinoza, J. (2009). El Nuevo Sistema Agroalimentario en una Crisis Global. Fundación CAJAMAR. Mediterráneo Económico: Colección e estudios socioeconómicos. Artículo #15. Extraído el 1 de Junio del 2011 del sitio web: <http://www.fundacioncajamar.com/mediterraneo/revista/agroalimentario.pdf>

Legendre, P. y Legendre, L. (2000). Numerical Ecology. Developments in Environments Modelling 20. Second English Edition. Elsevier. 251-561, 319-321 pp.

Levanony, H. Bashan, Y. y Kahana, Z. E. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. *Applied and Environmental Microbiology* 53:358-364.

MACROGEN. (2011) Advancing through Genomics. Publicaciones y Servicios [en línea]. Sitio web: http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp

Mc Faddin, J. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana. 3ra. edición. pp 850.

Madigan, M. Martinko, J. y Parker, J. (2004). Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid. pp 1096.

Marín, A. Cepeda, V. y Grasto, G. (1999). Fijación Biológica de Nitrógeno: Bacterias Fijadoras de nitrógeno de importancia para la agricultura tropical. Extraído el 23 de Agosto del 2011 del sitio web: <http://www.cnpab.embrapa.br>

Martínez, R. Toledo, N. y Arguelles, C. (1999). Introducción al conocimiento de los biofertilizantes. Universidad Tecnológica de la Huasteca Hidalguense, México. 43p.

Merharg, A. y Killham, K. (1995). Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. *Plant Soil* 7. 345-349 pp.

MAGAP. (2009). Agro cadena de maíz y avicultura - panorama nacional del maíz amarillo. Ficha técnica cultivo de Maíz, Consultado el 14 de Diciembre del 2011 del sitio web: http://www.magap.gob.ec/sinagap/charts/maíz_panoramanacional.htm#

Monar, C. (2000). Informe anual. Proyecto Integral Noreste de Bolívar (PI- NEB)- INIAP-FEPP, Guaranda - Ecuador, pp. 34.

Morales, M. (2002). ANÁLISIS: Los biofertilizantes. Una alternativa productiva, económica y sustentable. Informe. Escuela Nacional de Agricultura. Consultado el 6 de Junio del 2012 en el sitio web: http://www.pa.gob.mx/publica/rev_36/Marcel%20Morales%20Ibarra.pdf

Morillo, E. y Miño, G. (2010). Protocolos de Marcadores Moleculares (compilación). Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). pp 60.

Motsara, M. Battacharya, P. y Srivastava, B. (1995). Biofertilizer Technology, Marketing and Usage. Fertilizer Development and Consultation Organization. New Delhi, India. 1- 58 pp.

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg. Área de Microbiología, Departamento de Biología. Universidad de las Islas Baleares. España. *Revista Científica y Técnica de Ecología y medio ambiente: Ecosistemas* 14 (2): 41-51.

Noroña, J. (2008). Caracterización y evaluación agromorfológica de 64 accesiones de maíz negro y 27 accesiones de maíz chulpi (*Zea mays* L.) colectados en la serranía del Ecuador. Tesis Ingeniero. Agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi, Ciencias Agrícolas, Ambientales y Veterinarias, Ingeniería Agronómica. pp 32- 34.

Okon, Y. Albrecht, S. y Burris, R. (1976). Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology* 127:1248-1254.

Okon, Y. y Kapulnik, Y. (1986). Development and function of *Azospirillum* inoculated roots. *Plant Soil* 90: 30-35.

Okon, Y. y Labandera – González, C. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry* 26:1591-1601.

Peralta - Díaz, H. (2007). *Azospirillum*, Micorrizas y *Rhizobium*. Biofertilizantes Microbianos para una Agricultura Sustentable. Capítulo 8 de Biofertilizantes, Bacterias Promotoras del Crecimiento y Biofumigación. Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Chamilpa, Cuernavaca, México. 121-132 pp.

Pérez, L. (2005). Variabilidad genética de cepas nativas de *Azospirillum brasilense* mediante análisis tipo PCR RFLP del ADN 16S ribosomal. Tesis Maestro en ciencias en Biotecnología Genómica. Tamaulipas- México. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. pp 84.

Prescott, L. M. Harley, J.P. y Klein D.A. (2004). Microbiología. Traducida de la 5ta. Edición en inglés. McGraw Hill-Interamericana de España, S.A. España. pp 1240.

Reinhardt, E. Ramos P. Manfio, G. Barbosa, B. Pavan C. Moreira-Filho, C. Reyes C. (1990). El maíz y su cultivo. AGT-EDITOR S.A. México, D.F. pp 78.

Rizzo, P. (2001). El maíz duro amarillo y sus perspectivas para el 2001. Proyecto S.I.C.A. banco mundial. Consultado el 20 de Marzo del 2011 del sitio web:

<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/266/3/03%20AGP%2094%20TESIS.pdf>

Robles, C. y Barea, J.M. (2004). Respuesta de la planta y del suelo a inoculación con *glomus intraradices* y rizobacterias en maíz en cultivo intensivo. TERRA Latinoamericana Volumen 22 número 1. p 59-69.

Rodicio, M. y Mendoza, M. (2004). Identificación Bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: Fundamento, metodología y aplicaciones en Microbiología Clínica. Departamento de Biología Funcional. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España. Cap. 11.7.

Rodríguez, E. y Cáceres, A. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied Microbiology and Environmental. 44(2): 940-991.

Rodríguez - Mendoza, N. (1995). Microorganismos libres fijadores de nitrógeno. En: Agromicrobiología: Elemento útil en la agricultura sostenible. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo. México. 105-126 pp.

Rodas, A. Ferrer, S. y Pardo, I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 55, 197 – 207.

Saíto, S. y Graciolli, L. (1981). Relationships between *Azospirillum* spp. isolates from maize and sugar cane. En: Associative N₂-Fixation. Volume II. Editado por: P. Vose y A. Ruschel. CRC Press. Florida, U.S.A. pp. 163-168.

Sánchez, J. (2002). Introducción al Diseño experimental. Departamento de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito- Ecuador. pp 217.

Sánchez, M. (2004). Microbiología de Suelos. Técnicas, métodos y medios de cultivos. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Editorial PEPIME. México. pp 53.

Sánchez, J. Valencia, H. y Valero N. (2005). Producción de ácido indolacético por microorganismos solubilizadores de fosfatos presentes en la rizósfera de *Espeletia grandiflora* y *Calamagrostis effusa* del páramo El Granizo. En: M.A, Bonilla. Editor. Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque alto andino en la cordillera Oriental de Colombia. Bogotá. pp 177-193.

Sánchez, J. (2009). Evaluación Técnica- Económicas para la producción de una bebida a partir de Morocho Blanco (*Zea mays* variedad morochón) y leche. Tesis de Ingeniero Agroindustrial. Quito- Ecuador. Universidad Escuela Politécnica Nacional. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustrias. pp 187.

Savelkoul, P. Aarts, H. Haas, J. Dijkshoorn, L. Duim, M. Rademaker, J. Schouls, L. y Lenstra, J. (1999). Amplified-fragm Polymorphism analysis: the State of an Art. Journal of Clinical Microbiology. 37, 3.

Schroth, M. y Hancock, J. (1982). Disease - suppressive soil and root-colonizing bacteria. Ciencia 19. 1376-1381 pp.

SICA. (2007). Cultivos controlados. Disponible en: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/Biblioteca/Ing%20Rizzo/maíz/respuesta_niveles_fertilizacion.htm

Silva, C. 2005. Maíz genéticamente modificado. Publicación de AGRO-BIO. Primera edición. Bogotá - Colombia. 61 p. Consultado el 23 de Julio del 2011 del sitio web: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Maíz20Geneticamente20Modificado.pdf>

Silva, E. Caviedes, M. Dobronsky, J. Zambrabo, L. Caicedo, M. y Heredia, J. (1997). Variedad de Maíz Blanco Precoz INIAP-101. Boletín divulgativo No. 292. Programa de Maíz, Estación Experimental Santa Catalina. Quito-Ecuador. pp 10.

Sorensen, J. (1997). The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. Microbiología Moderna de Suelos. Editada por: J.D. Van Elsas, J.T. Trevors, E.M. Wellington. Nueva York. 21-45 pp.

Sprent, J. y Sprent, P. (1990). Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall, 2 ed. London England. 5- 256 pp.

Sundaram, S. Arunakumari, A. y Klucas, R. (1988). Characterization of *Azospirillum* isolated from seeds and roots of turf grass. Canadian Journal of Microbiology 34:212-217.

Suslow, T. y Schoroth, M. (1982). Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. Fitopatología 2. 111-115 pp.

The Latin American Alliance. (1997). Los biofertilizantes en la agricultura cubana. Consultado 13 de Agosto 2010 del sitio web: <http://www.latinsynergy.org/microorganismoscuba2.htm>

Tarrand, O., Krieg, N. y Döbereiner, J. (1979). *Azospirillum*. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology 2005, Class I., Order I., 7-26, DOI: 10.1007/0-387-29298-5_2

Umali - García, M. Hubbell, D. Gaskins, M. y Dazzo, F. (1984). Adsorption and mode of entry of *Azospirillum brasilense* to grass roots in: Associative N₂-Fixation. Volume I. Editado por: P. Vose y A. Ruschel. CRC Press. Florida, U.S.A. pp 49-62.

Valero, N. (2003). Potencial biofertilizante de bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fosfatos asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) Tesis de maestría. Maestría interfacultades Microbiología, Universidad Nacional de Colombia.

Vizcarrondo, M. y Gutiérrez, S. (2002). Identificación microbiana mediante métodos basados en sistema de utilización de sustratos, inmunoensayos y detección molecular. pp 13.

Weising, K. Nybom, K. Wolff, K. y Meyer, W. (1995). ADN fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. USA. Modificación de Francisco Jarrin, Centro Internacional de la PAPA. INIAP. pp 320.

Weisburg, W. Barns, S. Pelletier, D. Lane, D. (1991). 16S ribosomal ADN amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.

Yáñez, C. Zambrano, J. Caicedo, M. Sánchez, A. y Heredia, J. (2003). Catálogo de Recursos Genéticos de Maíces de Altura Ecuatorianos. Programa de Maíz. INIAP. Ecuador. 1- 28 pp.

Yáñez, C. (2007). Manual de Producción de Maíz para Pequeños Agricultores y Agricultoras. Proyecto de emergencia para la rehabilitación Agro productiva de la Sierra Del Ecuador. Programa de Maíz. EESC- INIAP. Quito-Ecuador. pp 23.

Yáñez, C. (2010). Inventario Tecnológico del Programa de Maíz. Programa de Maíz. EESC- INIAP. Quito- Ecuador. pp 26.