



**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE**

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

“DIVERSIDAD BACTERIANA ASOCIADA A RIZÓSFERA DE  
PAPAYA (*CARICA PAPAYA L.*) EN TRES ETAPAS  
FENOLÓGICAS”

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

**Martha Ligia Garavito Parra**

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2007

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S.

Dr. Roberto Carlos Vázquez J.

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B. C. S.

Dr. Christoph Tebbe

Co-tutor

Federal Agricultural Research Centre, Braunschweig, Germany.

## **COMITÉ REVISOR**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez

Dr. Christoph Tebbe

## **MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN DE TESIS**

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez

Dr. Christoph Tebbe

Suplente: Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## RESUMEN

La Papaya (*Carica papaya* L) es la tercera fruta tropical mas importante en el mundo. México es el segundo país en producción mundial y esta condición ha generado que exista un incremento en el interés de desarrollos biotecnológicos enfocados principalmente al uso de los microorganismos en el mejoramiento de la productividad de su cosecha. En el caso de las bacterias éstas juegan un papel fundamental en la nutrición, salud y crecimiento de las plantas mediante su asociación con la zona de la raíz.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo radicó en analizar las poblaciones de bacterias dominantes asociadas a la rizósfera de la papaya a lo largo de tres etapas fenológicas (vegetativa, floración y fruto), y entre sexos de las plantas a partir de la etapa de floración, mediante una combinación de técnicas de cultivo tradicionales y análisis de SSCP del gen 16S rDNA, de las potenciales bacterias dominantes.

Con la intención de realizar un análisis mas detallado de subgrupos bacterianos en los perfiles de SSCP, se utilizaron primers específicos para diferentes grupos filogenéticos ( $\alpha$ -*Proteobacteria* y *Pseudomonas*). Los patrones de SSCP obtenidos, indicaron que la composición de la comunidad bacteriana varía en función de las distintas etapas fenológicas analizadas. La comparación de los genes del 16S amplificados mediante primers para grupos universales y  $\alpha$ -proteobacterias también mostró una diferenciación entre los sexos de la planta. Por su parte los perfiles obtenidos para los grupos de *Pseudomonas* permanecieron constantes a lo largo de las tres etapas fenológicas, así como entre los sexos de la planta. A diferencia de los perfiles de SSCP, los análisis por métodos microbiológicos no permitieron detectar las diferencias en composición bacteriana a lo largo de las tres diferentes etapas.

## ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L) is the third most important tropical fruit in the world. Mexico holds second rank in world-wide production, which has generated an increased interest in the development of biotechnology mainly focused on the use of microorganisms to improve crop productivity. Bacteria play a central role in nutrition, health, and plant growth through their association with the root zone.

The purpose of this research was to determine, by a combination of traditional cultivation techniques, 16S rDNA identification using SSCP analysis, and followed by sequencing of possible dominant bacteria, the different and dominant bacterial populations associated with the papaya rhizosphere at three phenological stages (vegetative, flowering, and fruiting) and between the plant sexes after the flowering stage.

To reduce the complexity of SSCP fingerprints and to analyze specific populations, specific primers for different phylogenetic groups were used. The comparison of SSCP patterns indicated that the composition of the rhizosphere community of bacteria, analyzed at different plant growth stages, was different. Comparison of 16S genes obtained by amplification of universal and  $\alpha$ -*Proteobacterial* primers between sexes also showed differences. However, the profiles for the *Pseudomonas* group remained constant throughout the three phenological stages and between plant sexes. In comparison with the SSCP analysis, microbiological methods were unable to detect differences in bacterial composition between the three stages.

Key words: Bacterial diversity, rhizosphere, Papaya.

## *Dedicada*

*A Dios por ser mi fortaleza y estar conmigo en cada paso que doy.*

*A mis padres*

*Dimas Ernesto Garavito y Leila Ligia Parra*

*Quienes con su amor y alegría me brindan la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*A mis hermanas*

*Cris y OlgaLu porque a pesar de la distancia siempre estuvieron a mi lado cargando de energía mi vida.*

*A Hever*

*Por su amor, y estímulo para seguir creciendo.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Posgrado del CIBNOR, por otorgar el apoyo económico necesario para culminar este estudio. A la Dra. Thelma Castellanos, Osvelia y Lety por su gentileza y apoyo incondicional durante mi estancia. A Clao, Betty y Lupita por su colaboración y amistad durante todo este tiempo.

A mis asesores de tesis: Dra. Thelma Castellanos por su apoyo y por su brindarme la oportunidad de participar en este proyecto, al Dr. Christoph Tebbe por su invaluable apoyo y asesoría en el desarrollo de esta investigación. Así mismo quiero agradecer al Dr. Roberto Carlos Vázquez por sus aportaciones en el desarrollo de este trabajo y por su amistad y al Dr. Ricardo Vázquez por sus recomendaciones finales al trabajo.

Al Institut für Agrarökologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) quien otorgo una beca para mi estancia de investigación en Braunschweig, Alemania. Al Dr. Tebbe por recibirme en su laboratorio y por su valiosa colaboración durante mi estancia. A la técnico, Evelin Schummer por su apoyo técnico. A Anita, Ingo, Charles, Christoph, Micahela y Maggy gracias por su generosa hospitalidad.

Al Gobierno del estado por permitirme desarrollar el cultivo en su campo experimental (CEPROVEG).

Al Ing. Landa por su apoyo técnico en el cultivo, de igual forma a los técnicos de campo Reymundo y Adrian. A Aldo Vargas por su ayuda en la toma de imágenes.

A Ing. Martin Aguilar por su fundamental ayuda en el trabajo de campo, y su gran amistad

A Ana María y Tony por el apoyo proporcionado en la biblioteca además Gracias por ese carisma y amabilidad.

A Horacio y Manuel por su apoyo técnico en el centro de computo.

A Angel Carrillo por su amistad, apoyo incondicional y cariño que me ha brindado durante todo este tiempo

A Paty, por ser la amiga que toda persona busca tener ....GRACIAS.

A mi amigo con alitas...Orlando.... gracias por tu apoyo y por esa amistad de (n) años

A Hector por ser mi amigo y compinche durante estos añitos.

No puedo olvidar a mis compañeros y amigos: Gustavo, Clau, Ciro, Rodolfo, Gaston, Salvador, María Helena, Marcela, Manuelin y el Oso. Gracias por los gratos momentos vividos durante mi estancia

A todos mis compañeros de laboratorio: Arturo, Cesar, José, Joseph, Betty, Mario el Master y Grecia por su compañerismo y amistad.

A mis padres por todos los motivos imaginables, por ser el eje central en mi vida y por su amor incondicional que todo lo puede. A Cris y OlgaLu por estar AHÍ en las buenas y en las malas. A toda mi familia por su amor y buena vibra.

Quiero agradecer muy especialmente a Hever Latisnere, por su asesoramiento científico y técnico, por ser mi luz, y por tener la paciencia suficiente para aguantar mi cósmica y apoyarme cuando perdía la fe. Gracias por tu amor y por hacer de esos momentos un verdadero vivir, por recordarme q hay personas valiosas en el mundo y gracias por estar en el mió.

Por último quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis.....

**A TODOS MUCHAS GRACIAS**

## INDICE

INDICE.....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
2.1 La Rizósfera.....	3
2.1.2 Compuestos orgánicos (Exudados) liberados por las raíces.....	4
2.1.3 Factores que afectan la exudación radical.....	6
2.1.4 Efecto de los exudados de raíz sobre la población microbiana de rizósfera.....	7
2.2 Comunidades bacterianas en rizósfera.....	9
2.3 Diversidad microbiana.....	13
2.4 La Papaya (Carica papaya L.).....	20
2.4.1 Importancia económica de la Papaya.....	20
2.4.2 Generalidades sobre papaya.....	22
2.4.2.1 Origen geográfico.....	22
2.4.2.3 Descripción botánica.....	23
2.4.2.4 Condiciones ecológicas y edáficas.....	24
III. JUSTIFICACIÓN.....	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo General.....	27
4.2 Objetivos Específicos.....	27
V. HIPÓTESIS.....	27
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
6.1 Pregerminado.....	29



6.1.1 Preparación de la semilla .....	29
6.1.2 Establecimiento de almácigo .....	30
6.1.3. Trasplante.....	30
6.2 Muestreo de rizósfera.....	32
6.2.1 Muestreo Campo (Etapa vegetativa).....	32
6.2.2 Etapa de Floración y Fruto.....	32
6.3 Ensayos Microbiológicos.....	33
6.4 Ensayos Moleculares .....	34
6.4.1 Extracción de DNA.....	34
6.4.2 Amplificaciones de PCR del RNA ribosomal 16S .....	34
6.4.3 PCR grupo específico para el análisis de SSCP .....	35
6.4.4 Análisis de SSCP .....	36
6.4.4.1 Digestión de hebra fosforilada.....	36
6.4.4.2 Desnaturalización de hebras simples .....	36
6.4.4.3 Electroforesis de Poliacrilamida .....	37
6.4.4.4 Tinción con Nitrato de Plata .....	38
6.4.4 Análisis de perfiles de SSCP .....	38
6.4.4.1 Secuenciación e identificación taxonómica.....	38
VII. RESULTADOS .....	40
7.1 Aislamiento e Identificación de bacterias cultivables asociadas a rizósfera de papaya en las diferentes etapas fenológicas.....	40
7.1.1. Análisis Molecular .....	41
7.1.2. Árbol Filogenético .....	44

7.2. Identificación de bacterias asociadas a rizósfera de papaya en las diferentes etapas fenológicas por técnica independiente de cultivo.....	45
7.2.1. Extracción del DNA de rizósfera.....	45
7.2.2. Amplificación del 16S rDNA.....	47
7.2.3. Ensayos de SSCP.....	49
7.2.4. Identificación de géneros bacterianos.....	58
7.2.5. Análisis comparativo de los perfiles bacterianos entre las etapas fenológicas.....	59
7.2.6. Árboles Filogenéticos.....	61
VIII. DISCUSIÓN.....	65
8.1. Bacterias aisladas de la rizósfera de papaya por cultivos dependientes.....	65
8.2. Bacterias aisladas de la rizósfera de papaya por técnica independiente de cultivo....	71
8.2.1. Análisis de grupos bacterianos dominantes mediante la técnica del SSCP.....	73
8.3. Análisis de bandas escindidas, etapas fenológicas y diferenciación sexual.....	74
8.3.1. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers Universales.....	74
8.3.2. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers $\alpha$ -Proteobacteria.....	80
8.3.3. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers para Pseudomonas.....	83
8.4. Filogenia.....	84
IX. CONCLUSIONES.....	86
X. LITERATURA CITADA.....	87

**INDICE DE TABLAS**

INDICE DE TABLAS .....	iv
INDICE DE FIGURAS .....	v
Tabla 1. Compuestos orgánicos y enzimas identificados en exudados de raíz de diferentes especies de plantas .....	6
Tabla 3. Características de la Familia AC23 con respecto a la variedad Lennia.....	29
Tabla 4. Descripción morfológica de las bacterias cultivables aisladas de rizósfera de papaya durante tres etapas fenológicas.....	41
Tabla 5. Identificación parcial de los cultivos axénicos obtenidos de rizósfera de papaya en tres etapas fenológicas.....	43
Tabla 6. Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de la rizósfera de papaya en tres etapas fenológicas.....	58

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Páginas</b>
1	Área de estudio (CEPROVEG) .....	29
2	Plano de distribución de la plantación de papaya .....	30
3	Extracción DNA genómico de cepas axénicas aisladas de rizósfera.....	40
4	Amplificación del gen 16S rDNA de cepas axénicas .....	40
5	Perfiles de SSCP para las cepas axénicas.....	41
6	Árbol filogenético de las secuencias cepas axénica.....	43
7	Extracción DNA genómico de rizósfera en etapa vegetativa.....	44
8	Extracción DNA genómico de rizósfera en etapa de floración.....	45
9	Extracción DNA genómico de rizósfera en etapa de fruto.....	45
10	Productos de PCR amplificados con primers Universales.....	46
11	Productos de PCR amplificados con primers $\alpha$ -Proteobacteria.....	46
12	Productos de PCR amplificados con primers para <i>Pseudomonas</i> .....	47
13	Amplificación Producto PCR anidado $\alpha$ -Proteobacteria y <i>Pseudomonas</i> .....	47
14	Perfiles bacterianos etapa vegetativa (Universales; $\alpha$ -Proteobacteria; <i>Pseudomonas</i> ).....	48
15	Perfiles bacterianos etapa de floración (Universales; $\alpha$ -Proteobacteria; <i>Pseudomonas</i> ).....	50
16	Perfiles bacterianos etapa de fruto (Universales; $\alpha$ -Proteobacteria; <i>Pseudomonas</i> ).....	53
17	Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers universales de muestras masculinas y femeninas en las tres etapas fenológicas.....	57
18	Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers $\alpha$ -Proteobacteria de muestras masculinas y femeninas en las tres etapas fenológicas.....	58
19	Árbol filogenético de primers Universales.....	59
20	Árbol filogenético de primers $\alpha$ -Proteobacteria.....	60

## I. INTRODUCCIÓN

Una característica importante en el suelo es la presencia de “*hot spots*” zonas de intensa actividad biológica. La rizósfera es probablemente el más grande hot spot, donde la actividad microbiana es estimulada por los sustratos orgánicos de carbón provistos por las raíces en la forma de exudados y de células muertas (Miethling *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; Eo & Nakamoto, 2006).

Las poblaciones microbianas nativas en la rizósfera son de importancia fundamental, ya que a través de sus actividades metabólicas favorecen la salud de la planta, su nutrición y la promoción de su crecimiento (Gamalero *et al.*, 2003; Marschner *et al.*, 2004). Una variación en la estructura de la comunidad bacteriana y en sus características funcionales pueden traer consecuencias imprevisibles para los procesos cíclicos de nutrientes, y productividad de las comunidades naturales de la planta (Sharma *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005), por esta razón es de considerable interés para la ecología microbiana ampliar su conocimiento acerca de la caracterización y función de las comunidades bacterianas en la rizósfera.

Una de las variables más importantes en determinar la composición microbiana en la rizósfera es el efecto de la especie de planta ya que cada especie de planta selecciona su propia comunidad bacteriana específica del reservorio de bacterias presentes en el suelo o sobre la semilla (Miethling *et al.*, 2000; Marschner *et al.*, 2001; Berg *et al.*, 2002). Por otro lado, numerosos estudios indican que la abundancia de bacterias en la rizósfera es afectada por el estado de desarrollo de la planta, donde el efecto más grande ocurre

durante los periodos de desarrollo activo y va desapareciendo a medida que llega a su madurez (Weisskopf *et al.*, 2005).

La papaya (*Carica papaya*) es uno de los cultivos tropicales de mayor importancia en el mundo y México ocupa el segundo lugar en producción a nivel mundial, sin embargo pocos estudios se han realizado acerca de la interacción planta-microorganismo y sus aplicaciones prácticas. Este trabajo forma parte de un proyecto estratégico que inicio en el año 2003 enfocado en la conservación y aprovechamiento integral de la Papaya regional en Baja California Sur, con el fin de ofrecer soluciones para asegurar y aumentar la productividad agrícola regional. El proyecto abarcó diversos tópicos que van desde la identificación, conservación y caracterización fisiológica, bioquímica y molecular del germoplasma, así como la identificación y la caracterización de la microflora asociada y su aplicabilidad entre otros.

La utilización de bacterias rizosféricas en la producción agrícola dependerá del conocimiento sobre los mecanismos de la interacción bacteria-planta y de la habilidad de mantener y manipular poblaciones benéficas. De esta manera se torna evidente la necesidad de un mejor conocimiento sobre estos mecanismos de interacción bacteria-planta pues así será posible la utilización de estos microorganismos

El presente trabajo de investigación aborda la caracterización molecular y microbiológica de las poblaciones bacterianas asociadas a rizósfera de papaya con la intención de conocer la estructura de la comunidad bacteriana nativa y en un futuro a

través de su uso eficientizar la producción agrícola mejorando las características físicoquímicas y biológicas del agrosistema.

## **II ANTECEDENTES**

### **2.1 La Rizósfera**

El término rizósfera fue por primera vez introducido por Hiltner (1904), para describir el estímulo de la biomasa microbiana y su actividad en el suelo cerca a la superficie de la raíz en leguminosas (Curl & Truelove, 1986; Neumann & Römheld, 2002). Este concepto se ha redefinido varias veces y actualmente se considera como la porción de suelo influida por raíces de plantas vivas (Baudoin, *et al.*, 2002; Tiquia *et al.*, 2002; Fillion, *et al.*, 2004), con alta actividad microbiana que favorece el crecimiento y salud de la planta (Lugtenberg *et al.*, 2001).

La rizósfera puede ser dividida en distintas zonas (Lynch, 1990); éstas incluyen la endorizósfera (incluye la endodermis y las capas corticales), ectorizósfera (el suelo inmediatamente adyacente a la raíz) y el rizoplano (superficie de la raíz y la capa mucilaginoso de polisacáridos) (Morgan *et al.*, 2005). Finalmente el volumen del suelo el cual no es influenciado por las raíces es definido como suelo no rizósferico o suelo libre de plantas (Gobat *et al.*, 2004).

La rizósfera difiere del suelo no asociado a raíces en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Conforme las raíces crecen el suelo alrededor de ellas es compactado y las células de las raíces son liberadas hacia la rizósfera. A lo largo de la raíz compuestos

solubles en agua son liberados y las células epidermales y corticales muertas son liberadas transformándose en compuestos complejos ricos en carbono (Kerry, 2000).

### **2.1.2 Compuestos orgánicos (Exudados) liberados por las raíces**

Las raíces liberan considerables cantidades de carbón orgánico dentro de la rizósfera. Éste carbono es adquirido por la planta mediante el proceso de fotosíntesis y una gran proporción de este carbón fijado (entre 30-60% en plantas de especies anuales) es transportado al sistema de raíz (Lynch, 1990). En la red de fijación de carbono el porcentaje que se pierde por la exudación de raíz es del 17% (Nguyen, 2003).

Fuera de esta fracción de carbono una proporción sustancial de los exudados (arriba del 40% en plantas anuales; y del 70% en árboles leñosos), puede ser liberado dentro del ambiente de la raíz. En cuanto a las plantas perennes (Harris *et al.*, 1980), éstas suelen liberar un mayor porcentaje de exudados a lo largo del año para sobrevivir ante diversas condiciones de estrés.

La exudación tiene consecuencias importantes para la actividad y composición de comunidades microbianas, la disponibilidad de nutrientes y la solubilidad de compuestos tóxicos en la rizósfera (El-Shatnawi & Makhadme, 2001). Muchos estudios, principalmente con plantas anuales que crecen bajo condiciones controladas, han mostrado que diversas especies de plantas difieren en la cantidad y composición de los exudados (Marschner *et al.*, 2005b).



Los componentes químicos liberados por la raíz se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su modo de excreción:

(1) Exudados solubles en agua que son compuestos de bajo peso molecular como: azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, hormonas, vitaminas, carboxilatos, sideróforos, fenoles y gases como el etileno, CO<sub>2</sub> y HCN son liberados a favor de un gradiente de concentración

(2) Sustancias de alto peso molecular tales como carbohidratos poliméricos y enzimas que dependen de ciertos procesos metabólicos para su liberación, lisados que se liberan cuando las células se autolisan, incluyendo las paredes celulares y con el tiempo la raíz completa y el mucílago que esta constituido por azúcares (arabinosa, galactosa, fructuosa, glucosa y xilosa) y ácido poligalacturónico además de un 6% de proteínas las cuales son secretadas de la cubierta de la raíz como una gelatina cuya función es la de proteger el meristemo de la raíz y mejorar el contacto del suelo mediante la inclusión y agregación de partículas de suelo. El mucílago con inclusiones de partículas de suelo y microorganismos es a lo que se le conoce como mucigel. La producción de estos compuestos está positivamente relacionada con el crecimiento de la raíz (El-Shatnawi & Makhadme, 2001; Neumann & Römheld, 2002; Nguyen, 2003; Bais *et al.*, 2006). Otros compuestos exudados por la raíz se indican en la tabla 1.

**Tabla 1. Compuestos orgánicos y enzimas identificados en exudados de raíz de diferentes especies de plantas**

Aminoácidos	Ácidos Orgánicos	Azúcares	Vitaminas	Purinas/ nucleósidos	Enzimas	Iones inorgánicos y moléculas gaseosas
$\alpha$ -alanina	cítrico	glucosa	biotina	adenina	acido/alcalinas	$\text{HCO}_3^-$
$\beta$ -alanina	oxálico	fructuosa	tiamina	guanina	fosfatasas	$\text{OH}^-$
asparagina	málico	galactosa	niacina	citidina	invertasas	$\text{H}^+$
aspartato	fumárico	maltosa	pantotenato	uridina	amilasas	$\text{CO}_2$
cisteína	succínico	ribosa	rivoflavina		proteasas	$\text{H}_2$
cistina	acético	xilosa				
glutamato	butírico	ramnosa				
glicina	valerico	arabinosa				
isoleucina	glicólico	rafinosa				
leucina	piscidico	desoxiribosa				
lisina	fórmico	oligosacaridos				
metionina	aconítico					
serina	láctico					
treonina	pirúvico					
prolina	glutárico					
valina	malónico					
triptofano	aldónico					
ornitina	eritronico					
histidina	tetronico					
arginina						
homoserina						
fenilalanina						
$\gamma$ -ácido						
aminobutirico						
$\alpha$ -ácido						
aminoadípico						

Fuente: Dakora & Phillips, 2002.

### 2.1.3 Factores que afectan la exudación radical

La composición de los exudados radicales se ve afectada por múltiples factores: puede ser estimulada en respuesta a altas intensidades de luz, temperaturas extremas, el impedimento mecánico del sustrato, elementos tóxicos y bajos pH en la solución de suelo, limitación de nutrientes y la presencia de microorganismos (Singh & Mukerji, 2006). La red de liberación de componentes orgánicos se ve fuertemente afectada por la expresión de mecanismos de absorción en la raíz de la planta las cuales son capaces de recuperar hasta el 90% de los aminoácidos y azúcares liberados dentro de la rizósfera. Estos descubrimientos están en completo acuerdo con la identificación de transportadores para distintos compuestos como aminoácidos, pequeños péptidos y azúcares en la raíz de la planta (Neumann & Römheld, 2002).

Otros factores incluyen la especie de planta, genotipo, cultivares (Ridder-Duine *et al.*, 2005), etapa de desarrollo (Duineveld & Van Veen, 1999), edad y estatus fisiológico (Lucas García *et al.*, 2000; Marschner *et al.*, 2004), aplicación de químicos foliares, varios factores de estrés físico en el suelo, la aireación, y el contenido de agua (Curl & Trulove, 1986; Lynch, 1990; Nguyen, 2003; Marschner & Timonen, 2005a).

#### **2.1.4 Efecto de los exudados de raíz sobre la población microbiana de rizósfera**

Las raíces de las plantas pueden estimular o inhibir las poblaciones microbianas y sus actividades a través de la exudación de diferentes compuestos (Grayston *et al.*, 1998; Yang & Crowley, 2000; Battista *et al.*, 2003). Se ha postulado que la variedad de estos son el factor clave que influencia la diversidad de microorganismos en la rizósfera de las plantas (Grayston *et al.*, 1998; Battista *et al.*, 2003). Para los microorganismos estos

exudados representan una fuente conveniente de carbono y nitrógeno puesto que son asimilados sin necesidad de sintetizar exo-enzimas. Debido a esta alta disponibilidad de exudados en la rizósfera, tanto la actividad como la biomasa microbiana son generalmente mucho más altas en la rizósfera que en el suelo (Brimecombe *et al.*, 2001).

Dependiendo de la naturaleza exacta de los exudados liberados por la raíz (flavonoides, compuestos fenólicos, etc.), estos pueden jugar un papel específico en la activación de genes responsables del reconocimiento e iniciación de asociaciones simbióticas en la rizósfera tal como la defensa de la planta a patógenos, activando o apagando genes microbianos responsables de la formación de biopelículas (Sullivan, 2004).

La rizósfera es un hábitat favorable para la proliferación y metabolismo de numerosos tipos microbianos, allí conviven cinco grupos de microorganismos, principalmente bacterias, actinomicetos, hongos, algas y protozoarios, cualquier modificación en la abundancia y densidad de los exudados orgánicos de la raíz trae como consecuencia modificaciones en las proporciones relativas de estos grupos individuales. Estas variaciones, afectan la capacidad de transformación de materia orgánica, compuestos minerales y metabolitos secundarios liberados por los propios microorganismos lo que genera una relación microorganismos-planta-especie-específicas (Curl & Truelove 1986; Lynch, 1990; Glick, 1995; Wieland *et al.*, 2001).

De los grupos de microorganismos mencionados anteriormente las bacterias sobresalen en forma especial debido a su capacidad de crecer rápidamente y de descomponer una

gran variedad de los sustratos liberados por las plantas (Alexander, 1987). Por lo tanto, la concentración de bacterias en torno a las raíces es mucho mayor que en el resto del suelo (Lynch, 1990).

## **2.2 Comunidades bacterianas en rizósfera**

Una variedad de formas bacterianas pueden ser encontradas creciendo en la rizósfera y es universalmente aceptado que miembros de algún grupo específico puedan desarrollar importantes funciones en el ecosistema (Barea *et al.*, 2005). La naturaleza cuantitativa y cualitativa de los microorganismos de rizósfera-rizoplano esta sujeta a muchos factores que la influyen en estructura y composición de especies, por tanto no debe sorprendernos que las poblaciones sean modificadas por muchos de los factores que también afectan la exudación de raíces como son tipo de suelo, especie de planta, status nutricional, edad, estrés y otros factores ambientales (Curl & Truelove 1986; Yang & Crowley; 2000; Duineveld *et al.*, 2001).

El desarrollo de la planta tiene una gran influencia sobre la estructura de las poblaciones microbianas en rizósfera (Chiarini *et al.*, 1998). Di Cello *et al.* (1997) encontraron que la diversidad genética de poblaciones de *Burkholderia cepacia* asociadas a raíces de maíz disminuyó significativamente durante el crecimiento de la planta. Alexander (1987) y Morgan (2005), mencionan que la etapa de desarrollo de la planta altera la comunidad bacteriana, y el estado de madurez controla la magnitud del efecto rizósfera y el grado de respuesta por microorganismos específicos. Este tipo de alteraciones se ha registrado en plántulas muy jóvenes permitiendo observar que organismos que

presentan rápidas tasas de crecimiento (estrategias *r*) responden a las excreciones de la raíz durante esta etapa de desarrollo. Mientras que durante el desarrollo tardío los tejidos en descomposición contribuyen apreciablemente a la dominancia de comunidades bacterianas de lento crecimiento (estrategias *K*) capaces de degradar sustratos más complejos.

Pocas investigaciones describen el efecto de la comunidad microbiana a lo largo del crecimiento de la planta. Vance (2002), encontró que entre alfalfa y el *Sinorhizobium meliloti* existe una señalización simbiótica en donde flavonoides fenólicos e isoflavonoides liberados de las raíces de la planta se enlazan a los productos de los genes NodD rizobiales activando la transcripción de proteínas que catalizan la síntesis de lipoquitos-oligosacáridos (LCO's) los cuales actúan en el bloqueo del enroscamiento de los pelos de raíz, en infecciones y en la generación de nódulos por parte del microorganismo, indicando que estos genes están involucrados en las etapas más tempranas de las interacciones simbióticas durante las etapas iniciales de desarrollo de la planta.

Por otro lado los suelos también ejercen fuertes efectos en la población microbiana, su textura limita la disponibilidad de los exudados de raíz en suelo además su composición puede influenciar el pH de la rizósfera afectando la supervivencia y crecimiento de los microorganismos (Chiarini *et al.*, 1998; Garbeva *et al.*, 2004). De igual manera las prácticas de cultivo como rotación y labranza generan variación en las poblaciones (Yang & Crowley, 2000).

El crecimiento y actividad metabólica de la población microbiana en rizósfera está limitada por la disponibilidad de nutrientes (Çakmakçi *et al.*, 2006). Factores alimenticios como nitrógeno o hierro pueden también afectar el número de bacterias y cambiar su composición (Marschner *et al.*, 2001).

La estructura de la comunidad bacteriana en la rizósfera es importante para la actividad de la planta. La interacción entre bacterias y raíces puede ser benéfica (estimulación de crecimiento), neutral, o dañina (patogénesis, competencia y parasitismo) (Ridder-Duine *et al.*, 2005; Bais *et al.*, 2006). Tales interacciones pueden influenciar el crecimiento y desarrollo de la planta, cambio en la dinámica de nutrientes, alterar la susceptibilidad de la planta a enfermedades y a procesos de estrés abióticos (Morgan *et al.*, 2005).

Los microorganismos de la rizósfera ejercen fuertes efectos sobre el crecimiento de la planta y su salud, ya sea mediante la formación de sustancias estimulantes de crecimiento (biofertilizantes), solubilización de nutrientes, fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas (Grayson *et al.*, 1998; Barea *et al.*, 2005), y entre otros, la producción de antibióticos que da como resultado la supresión de microorganismos patógenos por bacterias antagonistas (Garbeva *et al.*, 2004) y la bioremediación de ambientes (Lugtenberg & Dekkers, 1999).

Las bacterias que proveen algunos beneficios a las plantas son de dos tipos generales, aquellas que establecen una simbiosis con la planta (Rizobia) y aquellas de vida libre en el suelo pero que comúnmente se encuentran cerca o inclusive dentro de las raíces debido a su dependencia energética, las cuales son denominadas Rizobacterias Promotoras de Crecimiento en Plantas (PGPR) (Glick 1995; Bais *et al.*, 2006). Por lo

tanto, los metabolitos microbianos interfieren con el metabolismo de la planta y cualquier sustancia benéfica o tóxica producida puede causar respuestas fisiológicas inmediatas y de magnitud considerable (Alexander, 1987). Algunos grupos bacterianos considerados PGPR incluyen especies de *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Burkholderia* entre otros (Glick, 1995). Algunos de los beneficios otorgados por los microorganismos a las plantas se resumen en la Tabla 2

Tabla 2. Aspectos beneficios de microorganismos hacia las plantas.

<b>Mecanismo</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencia</b>
Fijación de Nitrógeno atmosférico	Incremento en el contenido de Nitrógeno en planta y estimulación del crecimiento	Tilak <i>et al.</i> , 2005; Gray & Smith, 2005; Çakmakçi <i>et al.</i> , 2006
Solubilización de fosfatos	Crecimiento y desarrollo de la planta	Aneesaranl & Sathiamoorthy, 1997; Tilak <i>et al.</i> , 2005; Barea <i>et al.</i> , 2005; Çakmakçi <i>et al.</i> , 2006
Producción de sideróforos	Proveen hierro a la planta e inhiben la presencia de patógenos. También está involucrado en diversos procesos bioquímicos en la planta	Glick 1995; Kapulnik & Okon 2002; Compant <i>et al.</i> , 2005
Producción de antibióticos	Inhiben el crecimiento de patógenos, y mejoran las condiciones del suelo para el crecimiento de la planta.	Sørensen <i>et al.</i> , 2001; McSpadden & Weller, 2001; Chin-A-Woeng <i>et al.</i> , 2003; Mojica-Marín <i>et al.</i> , 2006
Producción de cianuro de hidrógeno	Efecto antipatogénico	Ramette <i>et al.</i> , 2003



Producción de fitohormonas	Favorecen el crecimiento de la planta mediante la producción de ácido Indol-acético (AIA). Incrementan el número de raíces secundarias y pelos radiculares. Síntesis de giberelinas actúan en la elongación de tallos y procesos de floración y germinación	Curl & Truelove 1986; Talón 1993; Glick 1995; Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Ping & Boland, 2004.
Producción de lipopolisacáridos	Inducen resistencia sistémica (ISR) a las plantas incrementando la velocidad y los niveles de síntesis de fitoalexinas	Van Loon <i>et al</i> 1998; Alves <i>et al.</i> , 2004; Ping & Boland, 2004.
Inhibición de síntesis de etileno	Incremento en la elongación radical	Glick 1995; Mayak <i>et al.</i> , 2004; Gray & Smith, 2005
Síntesis de vitaminas	Crecimiento de la planta	Curl & Truelove 1986; Marek-Kozaczuk & Skorupska, 2001
Exposición de azúcares específicos a lectinas en pelos de raíz	Regulación de la infección	Vance 2002

Finalmente entender como todos estos procesos de la comunidad afectan al ecosistema es de vital importancia en ecología microbiana (Miethling *et al.*, 2000). Además, el conocimiento de la estructura de las poblaciones bacterianas asociadas a la planta y como estas cambian con el tiempo es esencial para el entendimiento de mecanismos concernientes a la introducción de microorganismos promotores de crecimiento en plantas dentro de la rizósfera (Di Batista *et al.*, 2003).

### 2.3 Diversidad microbiana

Dentro de la gama de objetivos que estudia la ecología microbiana esta el de dar a conocer la estructura y composición de su diversidad. Una condición previa para describir la diversidad de la comunidad bacteriana es la caracterización de sus miembros (especies) de manera individual (Schwieger & Tebbe 1998).

La población microbiana en suelo es muy diversa y relativamente abundante, aunque depende de varios factores como se ha mencionado anteriormente. Algunos estudios han documentado la presencia de cerca de 6000 diferentes genomas bacterianos por gramo de suelo basados en reasociaciones DNA-DNA (Torsvik *et al.*, 1990; Escalante *et al.*, 2004; Kirk *et al.*, 2004).

La estructura de la diversidad y abundancia bacteriana en el suelo (riqueza y distribución) obtenida en el laboratorio por métodos dependientes de cultivo en su mayoría no reflejan la diversidad real *in situ* (Schwieger & Tebbe 1998). Aproximadamente el 1% de la población bacteriana en suelo puede ser cultivada por técnicas microbiológicas estándares (Pace 1996; Øvreås & Torsvik 1998; Suzuki *et al.*, 2005), pero debido a la selectividad intrínseca de cada técnica de cultivo seleccionada, el crecimiento de miembros específicos puede ser mejorado, disminuido o inclusive inhibido.

En este sentido, las herramientas de biología molecular ofrecen alternativas que apoyan estudios de ecología microbiana. Las técnicas moleculares permiten la detección y el monitoreo de bacterias del medio ambiente sin necesidad de cultivarlas. Estas técnicas han permitido aportar más datos que los métodos microbiológicos tradicionales y permiten, además, realizar clasificaciones filogenéticas de manera rápida, mas precisa y mas eficaz, aunque también presentan algunas limitantes (Jan & Le Borgne 2001).

Las técnicas de biología molecular generalmente involucran la extracción de ácidos nucleicos directamente de muestras ambientales o bien de cultivos (Lynch *et al.*, 2004). Estas técnicas acorde a su sensibilidad pueden detectar especies, géneros, familias e incluso grupos taxonómicos superiores (Nannipieri *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2004).

Estos métodos moleculares pueden ser divididos en tecnologías de baja o alta resolución dependiendo de la técnica que se emplee. Esto conlleva que de manera general los métodos moleculares tengan una resolución intermedia, permitiendo la detección de grupos microbianos más que de especies microbianas. Usualmente estas técnicas generan una “huella digital” (Fingerprint) que permite el análisis de múltiples muestras para estudiar la variación espacial y temporal en la composición de microorganismos del suelo (Nannipieri *et al.*, 2003). Los perfiles de replicas múltiples pueden ser analizados a la par y por lo tanto facilitan la detección de diferencias en los perfiles generados permitiendo comparar la diversidad microbiana de diferentes hábitats, y estudiar el comportamiento de comunidades individuales en el tiempo (Muyzer, 1999).

El sistema génico que más se ha utilizado en procariontes para caracterizar las comunidades bacterianas es el gen 16S del DNA ribosomal. Esta molécula está presente en todos los microorganismos vivos. Los genes del rRNA son altamente conservados y contienen un nivel de divergencia que permite que los microorganismos puedan ser diferenciados. (Øvreås, 2000; Arias *et al.*, 2005).

La identificación de estas regiones altamente conservadas, ha permitido desarrollar un conjunto de oligonucleótidos para la amplificación completa de este gen. Por ello,

gracias a la recopilación de datos de secuencias, se ha observado que la sub-unidad pequeña (SSU) del gen 16S rRNA de todos los organismos vivos contienen un total de 9 regiones variables V1 a V9 distribuidas en la molécula donde para organismos bacterianos es de aproximadamente de 1520 nucleótidos de longitud (Schmalenberger *et al.*, 2001).

Actualmente se tienen caracterizados oligonucleótidos o primers de amplio rango (universales) y específicos, que pueden distinguir dentro y entre grupos filogenéticos de bacterias, por ejemplo se tiene iniciadores específicos para: actinomicetos, *Pseudomonas*,  $\alpha$ -proteobacteria y  $\beta$ -proteobacteria (Dohrmann & Tebbe 2004). Numerosos estudios han hecho uso de éstos oligonucleótidos para caracterizar las comunidades bacterianas en suelo y rizósfera (Gomes *et al.*, 2001; Schmalenberger & Tebbe 2003; Ridder-Duine *et al.*, 2005; Fracchia *et al.*, 2006).

Gracias al conocimiento de la estructura genética y evolutiva de este complejo génico (genes ribosomales), un amplio rango de técnicas han sido desarrolladas para caracterizar comunidades microbianas. Estas incluyen técnicas de electroforesis en geles con gradiente de temperatura o desnaturizante (TGGE/DGGE), análisis de restricción de amplificaciones de DNA ribosomal (ARDRA), polimorfismo de longitud terminal en fragmentos de restricción (T-RFLP), polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) y polimorfismo en longitud del espaciador inter-génico ribosomal (RISA). Adicionalmente se están utilizando tecnologías de microarreglos para el análisis de comunidades y de genes específicos seleccionados en el medio ambiente (Garbeva *et al.*, 2004).

El estudio de la diversidad bacteriana a través de estas técnicas ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de poblaciones y comunidades bacterianas, establecer el impacto de los factores ambientales sobre la diversidad bacteriana y diseñar marcadores con fines de diagnóstico e identificación tanto de bacterias cultivables como no cultivables (Escalante *et al.*, 2004).

En este trabajo se empleó la técnica de SSCP la cual consiste en la comparación y análisis de productos de PCR, logrando detectar diferencias de hasta una base nucleotídica. Este tipo de técnica representa una herramienta prometedora para el análisis de comunidades microbianas independientes del cultivo (Tebbe *et al.*, 2001). Aunado a esto, la técnica PCR-SSCP ofrece una herramienta simple, económica y sensible para detectar si existen o no fragmentos de DNA idénticos en una secuencia (Sunnucks *et al.*, 2000).

Esta técnica electroforética ha permitido analizar la heterogeneidad de productos de PCR amplificados a partir de DNA extraídos de una comunidad. Con ella ha sido posible generar y comparar productos característicos o patrones tanto de cultivos aislados y de DNA extraídos directamente de comunidades microbianas (Schwieger y Tebbe, 1998).

El principio de esta técnica se basa en la separación de la doble hebra de DNA en hebras sencillas corridas sobre un gel de poliacrilamida y separadas debido a las diferencias de movilidad causadas por distintas conformaciones de las estructuras secundarias. Cuando

los fragmentos de DNA son de igual tamaño y no hay un desnaturalizante presente, su plegamiento y por tanto su movilidad, serán dependientes de la secuencia del DNA (Lee *et al.*, 1996). Una de las ventajas de esta técnica es que a diferencia del DGGE/TGGE los productos generados para SSCP no necesitan un anclaje rico de G+C para mantener una región no desnaturalizada. Esta carencia del anclaje G+C, así como la digestión de una de las hebras sencillas (como se verá mas adelante), evita el problema de heteroduplicidades generadas por la hibridación de hebras simples inter-específicas, las cuales se forman comúnmente durante la electrofóresis de DGGE/TGGE. Finalmente con la técnica de SSCP la selección de primers compatibles es mucho más sencilla.

Sin embargo, existen algunas limitaciones de la técnica como que algunas hebras de cadena sencilla puedan formar más de una conformación estable, por tanto una secuencia puede estar representada por más de una banda en el gel (Kirk *et al.*, 2004). En el análisis de comunidades microbianas las limitaciones que presenta es que una sola especie bacteriana puede producir varias bandas debido a la presencia de varios operones o como se mencionó mas de una conformación de los productos de PCR de hebra sencilla (Lynch *et al.*, 2004)

Es importante mencionar que la sensibilidad de esta técnica es inversamente proporcional al tamaño del fragmento. Fragmentos de entre 100 a 300 pb con una sola base de diferencia, pueden ser determinados hasta en un 99% de las veces; mayor al 80% para aquellas de 400 pb, e inclusive fragmentos de 700 pb también pueden ser analizados exitosamente. Se hace notar que la sensibilidad de detección de variación en la secuencia y la aparición de patrones de bandeo asociada con una secuencia dada

pueden ser alterados por detalles experimentales, como la alteración de temperatura, composición de buffer y del gel y las condiciones de corrida (Sunnucks *et al.*, 2000).

La técnica PCR-SSCP ha sido utilizada exitosamente en la evaluación de la sucesión de comunidades bacterianas, en el análisis de comunidades microbianas en la rizósfera de diferentes plantas (Muyzer, 1999), en el estudio de poblaciones bacterianas en bioreactores anaerobios, análisis de especies de hongos micorrizos arbusculares (AMF) en raíces (Kirk *et al.*, 2004). También se ha empleado en el análisis de suelos de bosques limosos (bacterias amonio-oxidantes de la subclase  $\beta$  de proteobacterias), en estudios de bio-aumentación del microcosmos de aguas subterráneas, identificación de comunidades bacterianas que inhiben diferentes especies de artrópodos, en la examinación de biofilm bacterianos sobre superficie de rocas, en muestras de agua y lodo de sistemas de tratamiento de agua y sedimentos de aguas subterráneas y acuíferos contaminados (Czarnetzki & Tebbe, 2004; Dohrmann & Tebbe 2004; Ortega-Morales *et al.*, 2004).

Por otro lado, a pesar de que las técnicas dependientes de cultivo son limitadas en el estudio de la composición de las comunidades microbianas naturales, son muy útiles para comprender las características de crecimiento, comportamientos ecológicos potenciales y funciones de los microorganismos de estos hábitats. Un análisis polifásico el cual se basa tanto en el uso de métodos basados en cultivo, como de cultivos independientes, es potencialmente el que producirá una mayor y más completa información sobre la composición de la comunidad microbiana (Garbeva *et al.*, 2004).

Es por ello, que debido a la alta complejidad de la comunidad microbiana de rizósfera, sólo un número limitado de ambientes rizosféricos han sido examinados lo que conlleva a un carente entendimiento del grado de diversidad microbiana en estos ambientes. Por lo anterior, la mayoría de estudios sobre la variedad de tipos de suelo y hábitat rizosféricos se vuelven necesarios con la intención de obtener una visión más comprensiva de la diversidad, estructura y función de comunidades microbianas en la rizósfera (Zhou *et al.*, 2004).

## **2.4 La Papaya (*Carica papaya* L.)**

### **2.4.1 Importancia económica de la Papaya**

La papaya es uno de los frutales con demanda creciente a nivel mundial debido a sus usos como fruta fresca y por poseer un gran potencial de industrialización en las áreas farmacéutica, culinaria, médica, industria cervecera y de bebidas no alcohólicas (García *et al.*, 2005).

La producción mundial de papaya parte de aproximadamente unos 6 millones 500 mil toneladas, y registra un crecimiento del 4.17% anual. Los principales países productores son Brasil, que a nivel mundial, ocupa el primer lugar en producción de este cultivo con 1.60 millones de toneladas y México quien a partir del 2001 pasa a ser el segundo productor mundial con 956.000 toneladas desplazando con ello a Nigeria (Quimia, 2002; Gama, 2006). Asimismo, Brasil es el principal comercializador a nivel mundial, su mercado de exportación se encuentra en los países europeos, mientras que México es



el principal exportador para Estados Unidos y Canadá (García & Escobar 2002). Los principales estados productores son: Chiapas con 10,282.8 toneladas, Yucatán con 8,383.2 toneladas y Oaxaca con 7,609.0 toneladas. En cuanto a rendimiento, el estado de Baja California Sur (BCS) ocupa el primer lugar con 25.00 toneladas por hectárea a pesar de contar con la menor superficie sembrada de 13 hectáreas (SAGARPA, 2007).

En el 2004 Baja California Sur obtuvo cerca de 60 has de producción comercial de papaya en cultivares “Maradol” y “Sunrise hawai”, sin embargo, la demanda para papaya orgánica producida en este estado va en aumento. Productores pequeños en BCS prefieren cultivar variedades criollas en traspatio, y actualmente algunos granjeros han establecido plantaciones de variedades locales para los mercados más distantes (Poghosyan *et al.*, 2004).

No se ha podido establecer de manera precisa el momento y origen de la introducción de papaya en Baja California Sur. La reciente incorporación de variedades comerciales a cultivo intensivo en la región, cultivo y mantenimiento en traspatio a través del replantado de su semilla y selección de características (tamaño y sabor) distinguen la papaya de Baja California Sur como regional respecto a las variedades comerciales debido a la insularidad atribuible a la entidad y a la adaptación de la especie a las diversas condiciones ambientales que caracterizan el estado. Esto permite reconocer la existencia de un germoplasma criollo, lo que hace necesario la identificación, caracterización y recuperación de la especie.

Para Sudcalifornia el incremento en la demanda de papaya, tanto en el consumo nacional como en el internacional, vislumbra altas expectativas y una excelente rentabilidad para el productor, debido a que en general se puede cultivar durante todas las estaciones del año por la reducida incidencia de plagas y enfermedades (Página del Gobierno de Baja California Sur, 2004). En cuanto a la economía del estado la papaya se ha mantenido por los pobladores locales como un cultivo tradicional de traspatio lo que constituye un recurso a mantener como una alternativa para la producción agrícola en el estado que contribuye a la conservación de las zonas de reserva ecológica de la región elevando los niveles de bienestar de los habitantes.

## **2.4.2 Generalidades sobre papaya**

### **2.4.2.1 Origen geográfico**

La papaya (*Carica papaya L.*) es una especie probablemente originaria de Centroamérica y Sur de México (Guzman, 1998), descrita por primera vez por el cronista Oviedo en 1526. Pronto fue cultivada en la zona tropical, ayudada su distribución indudablemente por la abundancia de semillas con una viabilidad relativamente alta. Se ha naturalizado en muchas regiones tropicales, particularmente en áreas con suelos fértiles y abundantes lluvias (Malo y Campbell, 1994).

La familia *Caricaceae* con seis géneros, encierra diversidad de especies y subespecies; siendo individuos de polinización cruzada que dan origen a nuevos genotipos (Morales *et al.*, 2004).

#### **2.4.2.3 Descripción botánica**

Son plantas dicotiledóneas, herbáceas gigantes y perennes. El frutal es de rápido crecimiento permitiendo una buena producción de frutos en un periodo relativamente corto. Se propaga principalmente por semilla las cuales germinan de dos a tres semanas (OECD 2005), las plantas comienzan a florecer entre los cinco y siete meses y a producir frutos maduros entre los nueve y catorce (Roman, 1996; Cahoon & Fernández, 2006), pueden llegar a producir frutos por más de 20 años (García *et al.*, 2005).

La papaya desarrolla tres tipos de flores: masculinas (estaminadas), femeninas (pistiladas) y hermafroditas (bisexuales). Además, algunas plantas pueden producir más de un tipo de flor al mismo tiempo. También, algunas plantas producen flores que no pertenecen a ninguna de estas formas básicas, sino que exhiben grados diferentes de masculinidad y feminidad. Esta tendencia a cambiar la expresión sexual parece ser desencadenada por factores climáticos tales como sequías y temperaturas variables (Malo & Campbell, 1994), razón por la cual las plantas macho pueden llegar a desarrollar frutos (García & Escobar, 2002).

El sistema radical de la papaya se compone de una raíz pivotante que puede desarrollarse hasta un metro de profundidad sirviéndole de apoyo, cuenta además con

otras raíces grandes y tuberosas que se desarrollan superficialmente, ellas están provistas de una gran cantidad de raíces secundarias que alimentan a la planta (Castro *et al.*, 2000; García & Escobar 2002 ).

#### **2.4.2.4 Condiciones ecológicas y edáficas**

Esta planta está presente en todos los países tropicales y subtropicales. Las condiciones óptimas para su crecimiento requieren de temperaturas entre los 18 a 35°C y áreas geográficas comprendidas desde el nivel del mar hasta los 1,000 metros de altura (Salazar, 1998; García & Escobar, 2002).

La textura del suelo es muy importante en el desarrollo radicular de la planta, los mejores resultados se pueden obtener en suelos sueltos y profundos, franco arenoso. Se comporta excelentemente en suelos con pH de 6.5 a 7.5, pH bajos perjudican su crecimiento y desarrollo pudiendo ocurrir la muerte de la planta, mientras pH superiores a 7.5 generan deficiencias nutrimentales (Roman, 1996; Castro *et al.*, 2000; OECD 2005). Los nutrimentos más importantes en la estimulación del crecimiento de papaya son: Nitrógeno (cuya acción fomenta principalmente el crecimiento vegetativo), Potasio (el cual influye en el color, textura y sabor de las frutas) y Fósforo (cuya función es incrementar la resistencia de la planta a sequías) (Roman 1996; Aneesaranl & Sathiamoorthy, 1997; Salazar 1998).

Pocos suelos pueden satisfacer la demanda de nutrientes de la papaya sin aplicación de fertilizantes químicos los cuales tienen un impacto significativo sobre la producción alimenticia, ya que son parte indispensable en la agricultura moderna. Sin embargo el

costo al ambiente y a la salud humana genera limitantes para su uso excesivo requiriendo alternativas para el mejoramiento de los cultivos.

La papaya responde satisfactoriamente a la adición de materia orgánica al suelo, razón por la cual su aplicación es indispensable al instalar un cultivo (Salazar, 1998). Asociado a esto, existen procesos microbiológicos los cuales convierten nutrientes atmosféricos en formas utilizables por la planta, ellos pueden ser utilizados como una vía alternativa a los fertilizantes. Estos procesos son mediados en la naturaleza por algunos microorganismos como son las bacterias.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las prácticas agrícolas modernas confían en los fertilizantes para alcanzar altas producciones, ello implica el uso de químicos para proteger sus cosechas contra patógenos generando consecuencias ambientales y en la salud humana. Estas prácticas actualmente se están reevaluando y han conducido al creciente interés de buscar estrategias alternativas, que aseguren las producciones de una manera más amigable al ambiente manteniendo un equilibrio ecológico.

Entre las alternativas con mayor auge que pueden ayudar a sustituir el uso de fertilizantes químicos en plantas se encuentra el uso de microorganismos, dado que ellos juegan un papel importante en la capacidad adaptativa de la misma (Ramos *et al.*, 2003). Un aspecto sumamente importante es el hecho de que estos microorganismos se asocian principalmente a la rizósfera, zona donde se lleva a cabo la mayor actividad microbiana estimulada por los sustratos orgánicos de carbón provistos por las raíces y por materia orgánica en descomposición (Miethling *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005; Eo & Nakamoto 2006).

Debido a esto, el estudio de los microorganismos y como se asocian a la rizósfera se hace necesario para poder utilizar las bacterias en programas biotecnológicos dirigidos a incrementar la productividad de las plantas (Rangarajan *et al.*, 2001; Ruíz *et al.*, 2005). Para entender el funcionamiento de bioinoculantes microbianos y su influencia sobre la planta, se debe explorar a fondo la diversidad microbiana (Chiarini *et al.*, 1998), y de esta manera aumentar el conocimiento sobre su estructura y composición de las poblaciones asociadas naturalmente a la raíz para alcanzar los máximos beneficios de los efectos de la actividad microbiana sobre la planta.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Analizar la abundancia relativa y diversidad de poblaciones bacterianas (cultivable y no cultivable) de la rizósfera de papaya así como la posible existencia de distintas poblaciones bacterianas asociadas a las etapas fenológicas de la planta.

### **4.2 Objetivos Específicos**

1. Obtener aislamientos axénicos a partir de muestras de rizósfera de papaya mediante cultivos in vitro e identificarlas a nivel de género y/o especie.
2. Analizar los perfiles moleculares (16S rDNA), de las diferentes poblaciones bacterianas usando la técnica de Polimorfismo conformacional de una sola hebra (SSCP).
3. Identificar los grupos bacterianos potencialmente predominantes en la rizósfera.
4. Comparar los perfiles moleculares obtenidos entre las etapas fenológicas de la planta y sexo

## **V. HIPÓTESIS**

Las poblaciones bacterianas presentes en la rizósfera de papaya diferirán en su composición de acuerdo a la etapa fenológica de la planta.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Como se mencionó anteriormente, el presente trabajo formó parte de un proyecto estratégico del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), que inicio en el año 2003 enfocado en la conservación y aprovechamiento integral de la Papaya regional en Baja California Sur.

El presente experimento inició en octubre de 2005 con una colecta de frutos de papaya para la obtención de semillas a partir de una plantación de evaluación constituida con el germoplasma colectado de toda la península y establecido en el Ejido “El Centenario”, Baja California Sur, situado a los 24° Latitud Norte y 110° Longitud Oeste.

La familia seleccionada para el presente estudio (AC-23) se eligió entre 24 líneas de papaya regional establecida en la plantación del Centenario debido a que presentó los tres tipos de expresión sexual (masculina, femenina y hermafrodita). Esta familia fue colectada el 16 de mayo de 2003, en la localidad de San Jorge, Municipio de Los Cabos, BCS, en una huerta ubicada en N 23°28'21.9" y W 109°47'17.7", a una altitud de 222 msnm, con una precipitación media anual de 505.3 mm, temperatura media de 25.2°C y una temperatura mínima de 15.4°C. El cultivo de esta papaya ha sido mantenido por más de 50 años.

Los frutos de las plantas de esta familia AC-23 (Tabla 3), presentaron los siguientes valores promedio comparados a los valores de la variedad Lennia (Maradol), utilizada como control en la plantación.



**Tabla 3. Características de la Familia AC23 con respecto a la variedad Lennia**

FAMILIA	LONG MAX	DIAM MAX	PESO TOTAL	BRIX	TIEMPO MADURACIÓN
AC-23	15.22 ± 0.56	9.51 ± 0.30	640.1 ± 71.0	12.39 ± 0.36	4.91 ± 0.37
MRD (Lennia)	18.94 ± 1.04	13.36 ± 0.56	1488.8 ± 132.8	12.24 ± 0.70	5.40 ± 0.69

## 6.1 Pregerminado

### 6.1.1 Preparación de la semilla

De los frutos obtenidos se seleccionaron aquellas semillas que no presentaban germinación. Una vez elegidas, estas fueron lavadas con agua purificada eliminando la pulpa que las recubre para inducirlas a la germinación. Posteriormente se colocaron 15gr de semilla en vasos de 250ml con agua purificada durante un periodo de 24 horas, pasado este lapso el agua fue cambiada cada 6 horas durante 3 días. Después de 36 horas, se eliminaron todas las semillas que flotaron (vanas) y se conservaron aquellas que se fueron al fondo del vaso.

Concluido este tiempo se retiró el agua, se extendió y se cubrió la semilla con una franela húmeda previamente desinfectada con cloro, manteniendo la humedad aplicando de 2 a 3 riegos diarios. Este procedimiento se llevo a cabo dentro de un cobertizo de

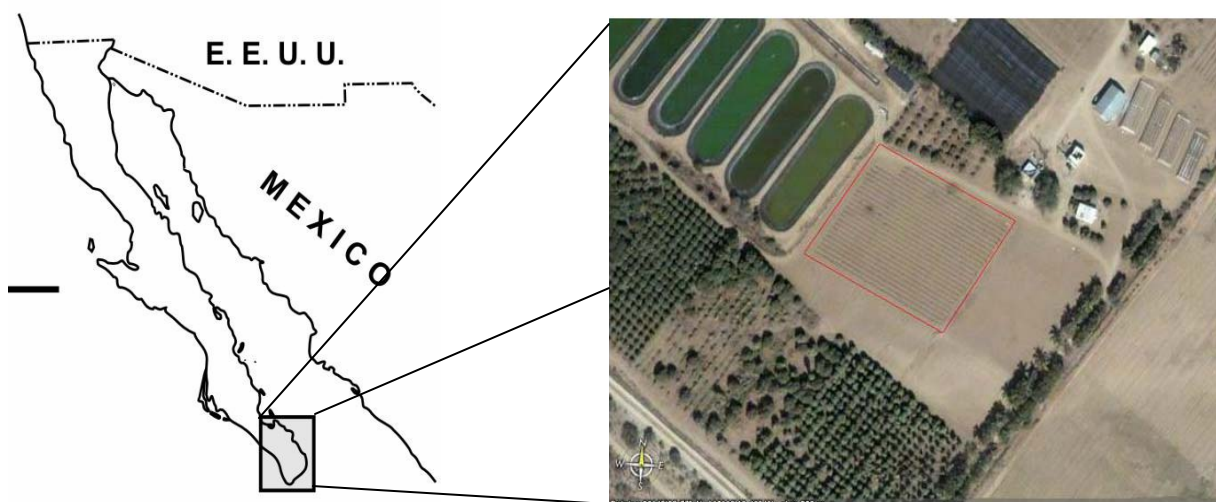
cultivo cubierto con malla anti-áfido y malla sombra al 60% en la parte superior durante 15 días.

### 6.1.2 Establecimiento de almácigo

Las plantas de papaya (*Carica papaya*) fueron crecidas bajo condiciones no estériles, una vez germinadas las semillas fueron sembradas en 400 vasos de plástico No. 12, previamente perforados con un punzón de 5 mm de diámetro y llenados con sustrato húmedo SUNSHINE, mezcla 3 (6 de noviembre de 2005). La semilla se depositó a 1 cm de profundidad en cada vaso y cubierta con una capa seca del mismo sustrato. Estas fueron colocadas en un cobertizo a temperatura entre 30 y 35°C. El riego se aplicó cada tercer día con agua purificada.

### 6.1.3. Trasplante

Transcurridos dos meses de desarrollo, el 28 de enero de 2006, las plántulas fueron transplantadas en las instalaciones del Centro de Propagación Vegetativa del Gobierno del Estado (CEPROVEG) en el valle denominado “El Carrizal” (Figura 1) localizado a los 23° 20' 47" Latitud Norte y 110° 16' 14" longitud Oeste.



**Figura 1. Ubicación del Centro de Propagación Vegetativa del Gobierno del Estado CEPROVEG en el Carrizal.**

El tipo de suelo presente en el predio es Valle aluvial de origen secundario, topografía plana, profundo, buen drenaje, textura migajón arenoso, pH 7.2–8.0, libre de pedregosidad superficial. Respecto al agua, se cuenta con disponibilidad de pozo profundo, actualmente un gasto de 45 lps de agua de calidad C<sub>2</sub> S<sub>1</sub> Wilcox, (Buena calidad).

El clima es de tipo BW y BS, desértico y seco o estepario según la clasificación de Köppen modificado por García (1987), temperaturas promedio con una máxima de 33.9°, una mínima de 10.7° y media de 21.9° C. La precipitación se presenta estacionalmente en verano e invierno, siendo las de mayor volumen de julio a septiembre con un total de 221 mm anuales.

El cultivo fue establecido en una superficie de 1ha con sistema de riego por goteo. El método de plantación utilizado fue rectangular con 2m de separación entre plantas y 3m de separación entre hileras, para un total de 4 hileras de plantas del cultivar criollo AC-23 (Figura 2).

25 HILERAS MARADOL	4 HILERAS cv. CRIOLLO	6 HILERAS HIBRIDO MARADOL LENIA
-----------------------	-----------------------------	--

Figura 2. Plano de distribución de la plantación de papaya (*Carica papaya*), en CEPROVEG, Centro de Propagación Vegetativa, El Carrizal, Baja California Sur.

## **6.2 Muestreo de rizósfera**

### **6.2.1 Muestreo Campo (Etapa vegetativa)**

Transcurridos dos meses del trasplante en campo se muestrearon las plantas en su etapa vegetativa, se utilizaron 10 plántulas para obtener la cantidad necesaria de rizósfera debido a que durante esta etapa no hay suficiente cantidad de raíz por organismo para llevar a cabo los ensayos microbiológicos y moleculares

### **6.2.2 Etapa de Floración y Fruto**

Durante estas etapas fenológicas la planta ya cuenta con suficiente cantidad de raíz, por lo tanto fue posible muestrear los organismos de manera individual (15 organismos) por sexo. Colectadas las raíces en las diferentes etapas, fueron colocadas en bolsa plástica y dentro de una hielera (4 a 6°C). Se transportaron al laboratorio para su procesamiento inmediato.

Una vez en el laboratorio, se retiró el exceso de suelo agitando las raíces cuidadosamente. Se pesaron 6gr de raíces y se resuspendieron en 100ml de buffer de fosfatos (PBS; (0.25g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ l}^{-1}$ ; pH 6.5)), en matraces Erlenmeyer de 250ml

previamente esterilizados a 15lbr de presión y a 120°C (Modificado de Ridder-Duine *et al.*, 2004). Estos fueron colocados en un agitador orbital (LAB-LINE; Melrose Park Illinois) a 150rpm y a 37°C durante 24 horas.

Posteriormente las raíces se desecharon y el sobrenadante se colectó en tubos Falcon de 50ml y se centrifugó a  $5000 \times g$  (Centrifuge BECKMAN Coulter Alegra 21R; Rotor C0650; California, USA), durante 30min a 4°C. Una vez producido el botón celular, se desechó el sobrenadante y se pesaron 500mg del botón para realizar el ensayo molecular y el resto se utilizó en los ensayos microbiológicos.

### **6.3 Ensayos Microbiológicos**

A partir del extracto del botón celular se hicieron diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .) en PBS. Se utilizaron tres medios de cultivo para realizar los aislamientos: agar suelo (Gray, 1990), agar nutritivo y agar tripticasa de soya (SIGMA) conteniendo 50  $\mu\text{g/ml}$  de ciclohexamida (fungicida), e incubadas a 37°C durante 24 horas. Posterior a las 24 horas se realizaron resiembras mediante estría cruzada hasta obtener cultivos axénicos. Los cultivos originales fueron monitoreados durante una semana más para detectar la formación de nuevas colonias. Cada colonia que presentó un morfotipo diferente en los diferentes medios fue transferida a medio LB con glicerol al 99% agregando 700 $\mu\text{l}$  del cultivo y 300 $\mu\text{l}$  de glicerol y se preservaron a -50 °C.

De los cultivos axénicos se extrajo el DNA genómico mediante la técnica de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación con alcohol absoluto descrita en

Sambrook *et al.*(2001). El DNA fue purificado con el kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega), según indicaciones del fabricante. Una vez purificadas se realizaron los ensayos de PCR (apartado 6.4.2 ensayos moleculares) y los productos obtenidos se trataron de igual manera que lo descrito en el apartado 6.4.3.

Los aislamientos obtenidos por métodos microbiológicos fueron utilizados como marcador estándar en los geles comparativos entre las etapas fenológicas, para determinar si las bacterias aisladas se encuentran representadas en los perfiles de SSCP de las comunidades.

## **6.4 Ensayos Moleculares**

### **6.4.1 Extracción de DNA**

Se extrajo el DNA geonómico de las muestras de rizósfera con el BIO-101 FastDNA®SPIN kit para suelo (Qbiogene, Carlsbad, CA) acorde a las especificaciones del fabricante. El DNA fue purificado mediante el kit Wizard-DNA Clean-Up System (Promega), según indicaciones del fabricante. La calidad del DNA se confirmó en geles de agarosa al 0.7%, teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml). La concentración de DNA fue estimada con lecturas espectrofotométricas en un Biofotómetro (eppendorf).

### **6.4.2 Amplificaciones de PCR del RNA ribosomal 16S**

Para la amplificación de fragmentos del gen 16S del rDNA se realizaron ensayos utilizando primers universales para distintos grupos bacterianos Com1 (5' CAGCAGCCGCGGTAATAC3') y Com2-Ph (5'CCGTCAATTCCTTTGAGTTT3') (Schwieger y Tebbe., 1998). Este último fosforilado en la terminación 5' para una posterior digestión de la cadena sencilla. Los fragmentos del 16S fueron amplificados bajo las siguientes condiciones: Una mezcla de reacción de 25µl conteniendo 1µl de DNA template (1-10ng), 2.5µl de buffer 10X con MgCl<sub>2</sub> a una concentración de 10mM, 0.5µl de nucleótidos 10mM de cada uno, 0.25µl de cada primer a 10pmol/µl (SIGMA-GENOSYS) y con 0.125µl de Taq Polimerasa a una concentración de 5U/µl. Todos los reactivos de la marca Promega. Las condiciones de amplificación estuvieron dadas como sigue: una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, durante 30 ciclos un período de desnaturalización a 94°C por 1 minuto; un período de alineamiento de 50°C por 1 minuto y un período de extensión a 72°C por 1.10 minutos. Un paso final de extensión por 5 minutos a 72°C se utilizó para concluir la reacción.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (10mg/ml) y revelados con luz ultravioleta y se determinó su peso molecular con el corrimiento pareado de un marcador en talla de 50-10,000 pb (Directload WIDE RANGE DNA MARKER; SIGMA). Una vez obtenido el producto de PCR esperado se purificó mediante el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), según indicaciones del fabricante.

#### **6.4.3 PCR grupo específico para el análisis de SSCP**

Para amplificar grupos bacterianos específicos (*a-Proteobacteria* y *Pseudomonas*), se llevó a cabo una PCR anidada mediante el uso de primers específicos (F203alpha: 5'CCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATT TAT3' con R1492: 5'TACGGYTAC CTTGTTACGACTT3' y F311Ps: 5'CTGGTCTGAGAGGATGATCAGT3' con R1459Ps: 5'AATCACTCCGTGGTAACCGT3', respectivamente), para el 16S. Posteriormente estos productos sirvieron como templado para una segunda amplificación utilizando los primers universales para generar la región variable (V3-V5), antes descrita.

#### **6.4.4 Análisis de SSCP**

##### **6.4.4.1 Digestión de hebra fosforilada**

La hebra fosforilada del producto de PCR de doble cadena se removió por digestión con 5 U de la enzima lambda exonucleasa, y 4µl de buffer (New England BioLabs) y fue aforado a 11.5µl con agua MilliQ. Posteriormente se incubó en un termoblock (Eppendorf; Termomixer Comfort) a 37°C durante 45 minutos, y se purificó mediante el kit MinElute PCR Purification (QIAGEN) según el protocolo del fabricante.

##### **6.4.4.2 Desnaturalización de hebras simples**

Una vez que las hebras simples de los productos de PCR se purificaron se adicionó 9µl del reactivo desnaturalizante "Loading dye" (10 mM NaOH; 0.25% xilano cianol



(wt/vol); 0.25% azul de bromofenol (wt/vol); 95% formamida (vol/vol)), y se incubó a 95°C durante 2 minutos e inmediatamente se colocó en hielo durante 3 minutos.

#### **6.4.4.3 Electroforesis de Poliacrilamida**

Los geles se pre-trataron antes del vaciado de la poliacrilamida. A uno de los cristales se le añadió 1ml de silano preparado con ácido acético y etanol absoluto, con la finalidad que la poli-acrilamida se adhiera. Al otro cristal se le agregó 1ml de un repelente de silano y ambos se dejaron reposar durante 5 minutos, finalmente se enjuagaron con alcohol al 70% esparcido con una toalla de papel.

Se procedió al armado de los cristales siguiendo las recomendaciones del sistema Dcode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). El gel de poliacrilamida se preparó a una concentración de 0.625% agregando 7.813ml de MDE gel solution 2X (BioWhittaker, Molecular Applications; Rockland ME, USA), 2.5ml de buffer TBE 10X y aforado con agua desionizada a 25ml. Se desgasificó en una cámara de vacío para evitar la formación de burbujas. Una vez desgasificado se agregaron 10µl de TEMED (SIGMA) y 25µl de persulfato de amonio (APS) al 40%. Se mezcló bien y se vertió entre los cristales dejando polimerizar durante 2 horas.

Una vez polimerizado el gel se colocó en el sistema DCode con buffer TBE 1X preenfriado a 20°C. Finalmente se cargaron 4µl de las muestras desnaturalizadas y se corrieron durante 19 horas a 400V - 50mA -20W.

#### **6.4.4.4 Tinción con Nitrato de Plata**

Una vez concluida la electroforesis se retiraron los cristales que contenían el gel, y éste se reveló mediante la técnica de tinción con plata (Bassan, *et al.*, 1991).

#### **6.4.4 Análisis de perfiles de SSCP**

El software GelCompar II (Applied Math, Kortrijk, Belgium) fue usado para calcular similitudes entre perfiles bacterianos obtenidos de las diferentes etapas de desarrollo y sexo de las plantas. Estos fueron normalizados con la ayuda de un marcador de bacterias conocidas *Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Favobacterium johnsoniae* y *Rhizobium radiobacter*. El coeficiente de correlación de Dice fue utilizado para calcular similitudes basadas en la comparación de bandas comunes y diferentes. El análisis de Cluster (agrupación) utilizado para calcular los dendogramas fue el UPGMA con media aritmética.

##### **6.4.4.1 Secuenciación e identificación taxonómica**

Una vez obtenidos los perfiles de SSCP se seleccionaron las bandas que presentaron mayor abundancia y aquellas que presentaban diferencias entre machos y hembras. Posteriormente las bandas se cortaron del gel y se diluyeron en buffer “Crush and Soak” según protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (2001).

Debido a que las bandas diluidas son hebras sencillas se realiza un ensayo de PCR para generar su cadena complementaria. Una vez obtenido los productos, se purifican

mediante el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN), y finalmente se determina su secuencia nucleotídica.

Para el análisis de secuencia se utilizó el programa Chromas Pro, una vez editadas las secuencias se sometieron a la banca genómica para su comparación e identificación a nivel de especie.

Las relaciones filogenéticas entre las bacterias fueron obtenidas mediante el análisis de la secuencia parcial del gen que codifica la subunidad 16S rDNA. Las secuencias obtenidas para los grupos de primers Universales y *Alpha-Proteobacteria* fueron alineadas y analizadas mediante el algoritmo de CLUSTAL y con el programa MEGA 4.0. Para la construcción filogenética se utilizó el programa MrBayes 3.1.2 mediante un análisis de Monte Carlo por cadenas de Markoff con un total de 3,000,000 de generaciones con una tasa de muestreo de 100 árboles por cadena.

## **VII. RESULTADOS**

Se aplicó una combinación de cultivo tradicional y técnicas moleculares (SSCP) para estudiar la diversidad bacteriana asociada a rizósfera de un cultivar de papaya.

### **7.1 Aislamiento e Identificación de bacterias cultivables asociadas a rizósfera de papaya en las diferentes etapas fenológicas.**

Con la finalidad de aislar el mayor número de cepas presuntamente diferentes, se utilizaron tres medios de cultivo: agar nutritivo, agar tripticasa de soya y agar suelo. De los aislamientos obtenidos se realizó descripción de las características morfológicas a nivel macroscópico y microscópico para evitar replicar extracciones de DNA y ensayos de secuenciación. Debido a que no se realizaron identificaciones de las bacterias a nivel

especie por métodos tradicionales (Asimilación de fuentes de carbono, perfiles de ácidos grasos y pruebas bioquímicas) tanto la morfología como la tinción de Gram solamente fueron utilizadas como indicadores de presencia de morfotipos idénticos en las diferentes etapas y sexo de la planta. (Tabla 4).

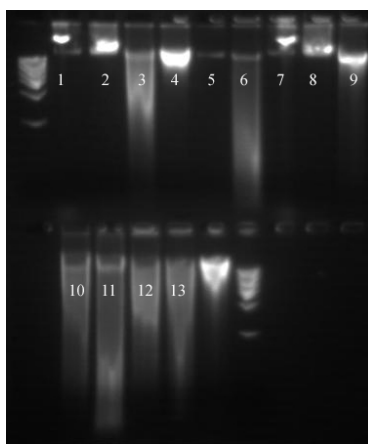
**Tabla 4. Descripción morfológica de las bacterias cultivables aisladas de rizósfera de papaya durante tres etapas fenológicas.**

No.	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Pigmento	Colorac. de Gram
1	Circular	entero	convexa	lisa	blanda	amarillo	Bacilos Gram -
2	Circular	entero	convexa	lisa	mucoide	crema	Bacilos Gram -
3	Irregular	entero	convexa	lisa	mucoide	crema	Bacilos Gram -
4	Circular	entero	plana	lisa	blanda	crema	Cocobacilos Gram -
5	Circular	entero	convexa	lisa	mucoide	blanca	Bacilos Gram -
6	Circular	entero	convexa	lisa	mucoide	crema	Bacilos Gram -
7	Irregular	ondulado	convexa	lisa	mucoide	naranja	Bacilo Gram +
8	Circular	entero	plana	lisa	blanda	rosa pálido	no identificada
9	Irregular	ondulado	convexa	lisa	blanda	arena	Bacilos Gram -
10	Circular	entero	convexa	lisa	blanda	amarillo	Bacilos Gram +
11	Circular	entero	convexa	lisa	mucoide	marron	Bacilos Gram -
12	Circular	entero	convexa	lisa	mucoide	blanca	Bacilos Gram -
13	Puntiforme	entero	plana	lisa	blanda	rosa	Cocobacilos Gram +

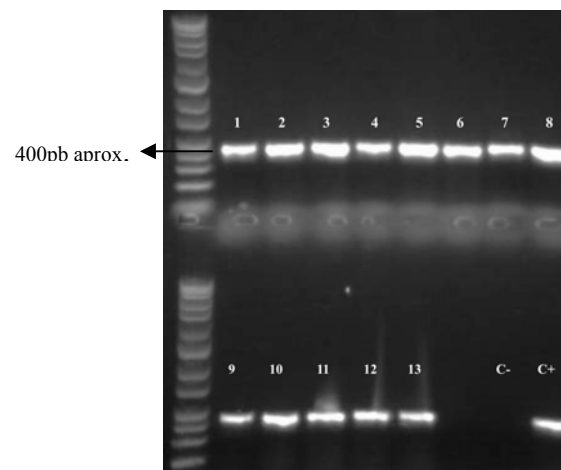
Se aislaron 51 cepas bacterianas con base en su morfología colonial. Ni los diferentes medios de cultivo ni los sexos, mostraron diferencias entre los morfotipos encontrados. Solamente en la última etapa fenológica (fruto) se evidenció el crecimiento de dos morfotipos adicionales.

### 7.1.1. Análisis Molecular

De los aislados representativos de cada grupo se extrajo el DNA genómico (Figura 3), y se amplificó la región variable (V3-V5), del 16S rDNA con primers Universales (Figura 4).

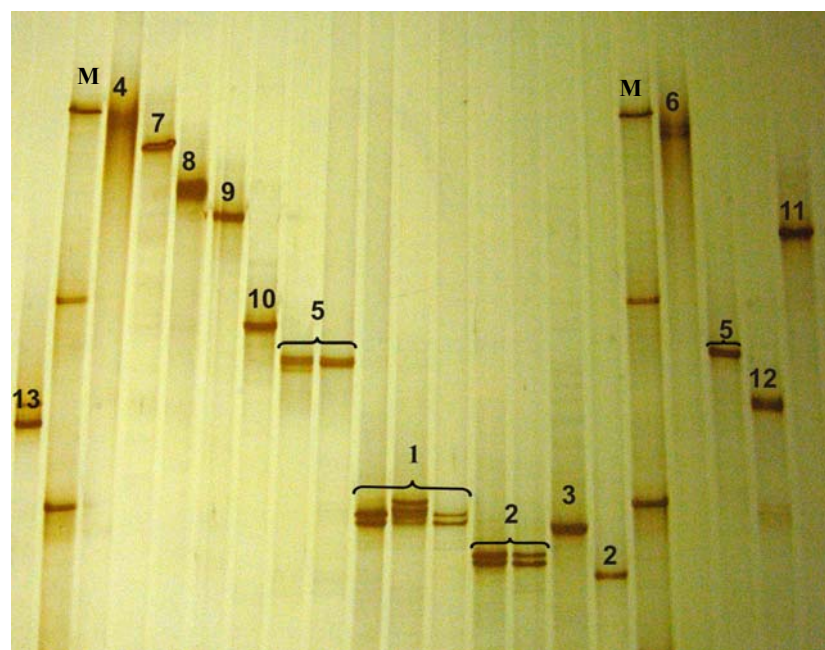


**Figura 3.** Muestras de DNA de las cepas axénicas aisladas de rizósfera de papaya. MW, Molecular Weight Marker (Directload WIDE RANGE DNA MARKER; SIGMA); 1-13, muestras de los 13 morfotipos aislados.



**Figura 4.** Productos de PCR del 16S rDNA amplificados de cepas aisladas de rizósfera por técnicas tradicionales. Línea 1: MW: Molecular Weight Marker (Directload WIDE RANGE DNA MARKER) de aproximadamente 400 pb.

Posteriormente se realizaron las digestiones de la cadena fosforilada con la enzima exonucleasa lambda para corrimiento en gel de SSCP (Figura 5).



**Figura 5.** Perfiles de SSCP de productos de PCR de cepas aisladas de rizósfera de papaya. M: Lineas 2 y 17 standard de SSCP consistente en una cadena sencilla de fragmentos de gen amplificados-PCR 16S rDNA de las especies *Bacillus licheniformis*, *Rhizobium trifolii*, *Flavobacterium johnsoniae* y *Rhizobium radiobacter* (doble banda).

En el gel de SSCP se visualizaron los perfiles correspondientes a cada uno de los morfotipos aislados y cada uno presentó una movilidad electroforética distinta. Una vez identificadas las bandas correspondientes a cada morfotipo fueron cortadas y ensayadas nuevamente por PCR y posteriormente purificadas y enviadas a secuenciar.

Finalmente las secuencias obtenidas se sometieron a la banca genómica internacional (GenBank) y se compararon utilizando la herramienta BLAST para determinar el grado de homología con las secuencias ya reportadas. De esta manera se lograron identificar a nivel de género las cepas aisladas.

Los resultados demuestran que la mayoría de los morfotipos aislados pertenecen al grupo taxonómico *Proteobacteria* siendo representado por los subgrupos alfa ( $\alpha$ ), Beta ( $\beta$ ) y gama ( $\gamma$ ). (Tabla 5). Los 13 morfotipos presentaron entre el 99 y el 100% de similitud de secuencia con las reportadas en el GenBank.

---

**Tabla 5. Identificación parcial de los cultivos axénicos obtenidos de rizósfera de papaya en tres etapas fenológicas.**

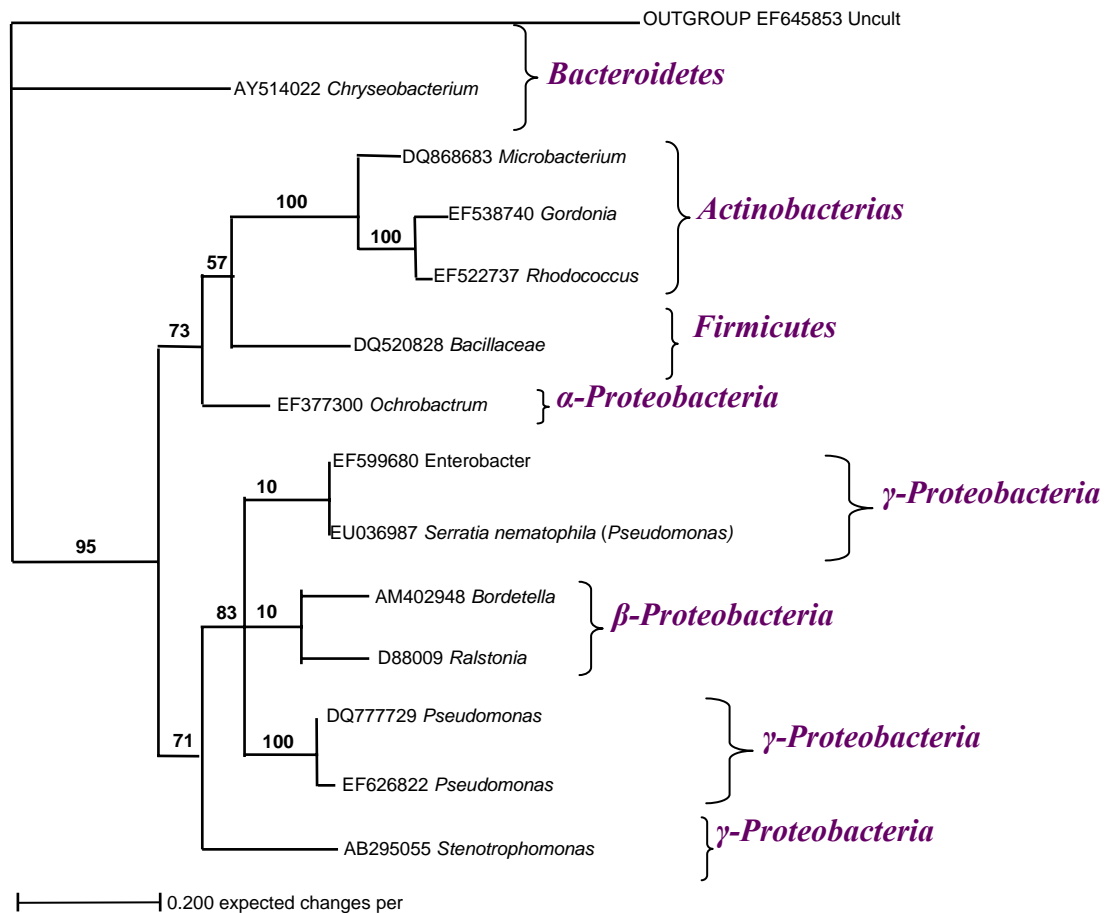
Etapa Fenológica	Cepa	Asignación Filogenética	Homología contra bacterias reportadas en GenBank	% Similitud.	No. Acceso GenBank
V; Fl; Fr	1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chryseobacterium sp</i>	100%	AY514022
V; Fl; Fr	2	$\alpha$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Ochrobactrum sp.</i>	100%	EF377300
V; Fl; Fr	3	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	100%	DQ777729
V; Fl; Fr	4	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Bordetella sp.</i>	100%	AM402948
V; Fl; Fr	5	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	99%	EF028123
V; Fl; Fr	6	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	99%	EF152284
V; Fl; Fr	7	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillaceae bacterium</i>	100%	DQ520827
V; Fl; Fr	8	<i>Actinobacteria</i>	<i>Gordonia sp.</i>	99%	DQ538740
V; Fl; Fr	9	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia.</i>	99%	AB295055
V; Fl; Fr	10	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	99%	DQ868683
Fr	11	$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Serratia sp.</i>	99%	AB288309
		$\gamma$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
V; Fl; Fr	12	$\beta$ - <i>Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia sp.</i>	99%	D88009
Fr	13	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	99%	EF101927

V:Vegetativa; Fl:Floración; Fr:Fruto.

### 7.1.2. Árbol Filogenético

Las relaciones filogenéticas entre las bacterias fueron obtenidas mediante el análisis de la secuencia parcial del gen que codifica la subunidad 16S rDNA. Las secuencias obtenidas para los grupos de primers Universales fueron alineadas y analizadas mediante el algoritmo de CLUSTAL y el programa MEGA 4.0.





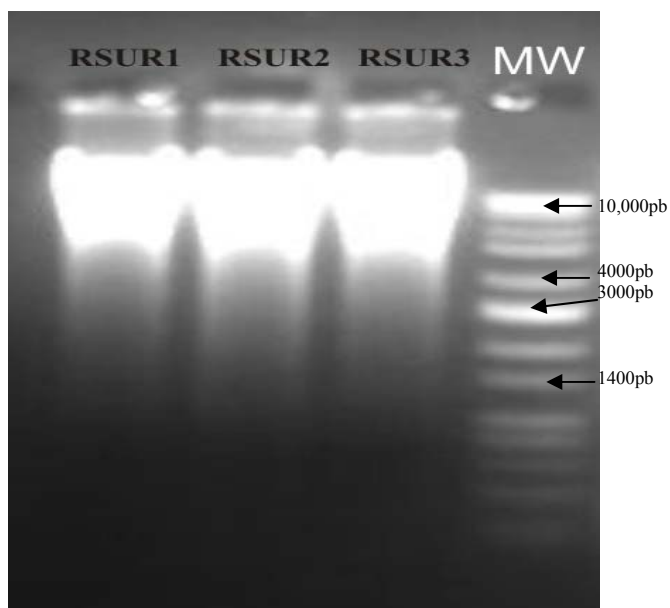
**Figura 6.** Árbol filogenético construido mediante el programa MrBayes 3.1.2 a partir de una región de 400pb que muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias de genes del 16S rDNA obtenidas con primers Universales.

## 7.2. Identificación de bacterias asociadas a rizósfera de papaya en las diferentes etapas fenológicas por técnica independiente de cultivo.

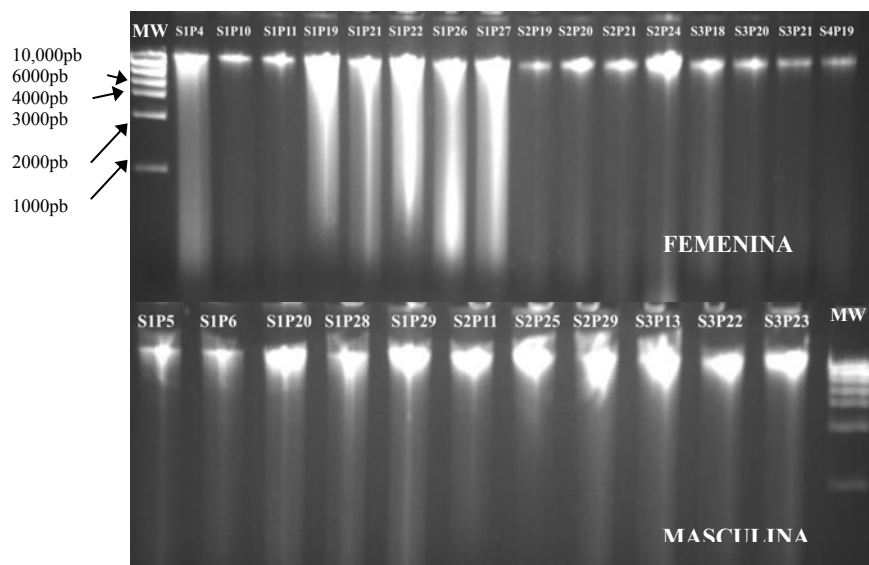
### 7.2.1. Extracción del DNA de rizósfera:

De las muestras de rizósfera aisladas de las diferentes etapas fenológicas se realizó la extracción de DNA procurando obtener una buena calidad del mismo. En la Figura 7 se observa el DNA extraído en la etapa vegetativa. Allí se observan tres muestras debido a

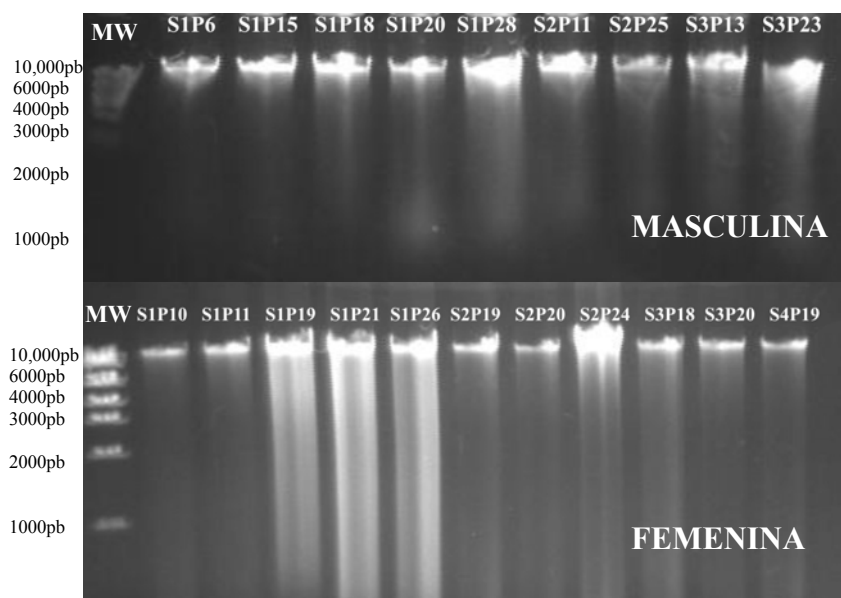
que en esta etapa no hay suficiente cantidad de raíz por organismo y estas muestras son un cúmulo de la rizósfera de varios individuos, los cuales se encontraban en diferentes surcos y que se nombraron como RSUR1, RSUR2 y RSUR3 (R= raíz; SUR= surco; # = número de planta muestreada), tomando de cada surco 10 individuos (Figura 2). Del mismo modo, cuatro meses después se realizó la extracción del DNA en la etapa de floración (S1, S2, S3 o S4 = número de surco; P# = número de planta muestreada), pero en esta ocasión fue posible realizar el muestreo individualmente además de poder clasificarlos por sexo (Figura 8). Finalmente alcanzada la etapa de fruto se realizó el mismo procedimiento que en floración (Figura 9).



**Figura 7.** Muestras de DNA extraídas en la etapa vegetativa. MW. High DNA Mass Ladder (Invitrogen) 10,000pb.



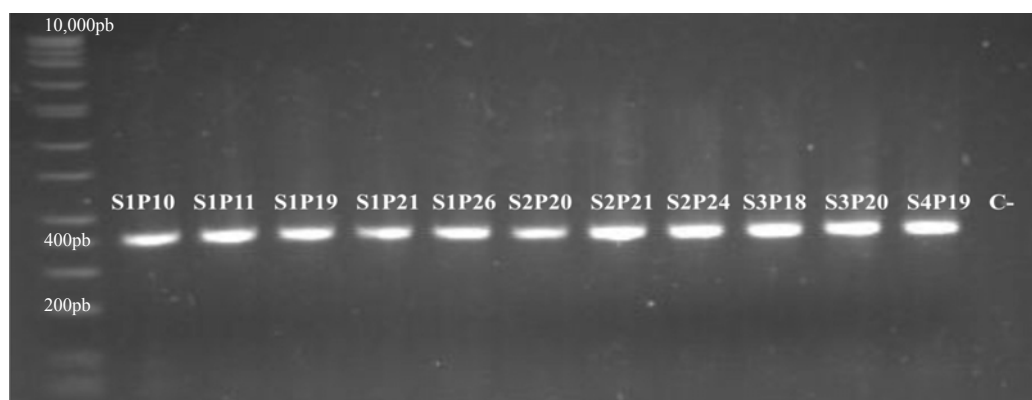
**Figura 8.** Muestras de DNA extraídas en la etapa de floración. MW. High DNA Mass Ladder (Invitrogen) 10,000pb.



**Figura 9.** Muestras de DNA extraídas en la etapa de fruto. MW. High DNA Mass Ladder (Invitrogen) 10,000pb

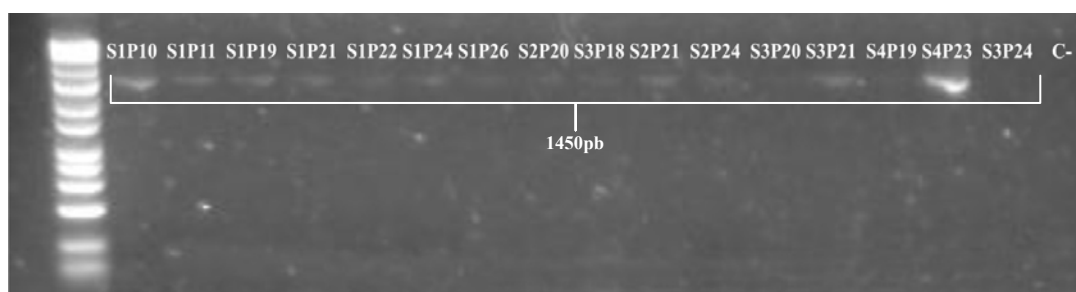
### 7.2.2. Amplificación del 16S rDNA

Los primers Universales para bacteria Com1 y Com2 fueron usados para amplificar la región variable V3-V5 del 16S rDNA. Las muestras de rizósfera de papaya durante las tres etapas de desarrollo generaron bandas discretas con un tamaño aproximado de 400 pb (Figura 10). Los productos de PCR fueron purificados usando un kit de purificación comercial (QIAquick PCR purification kit).

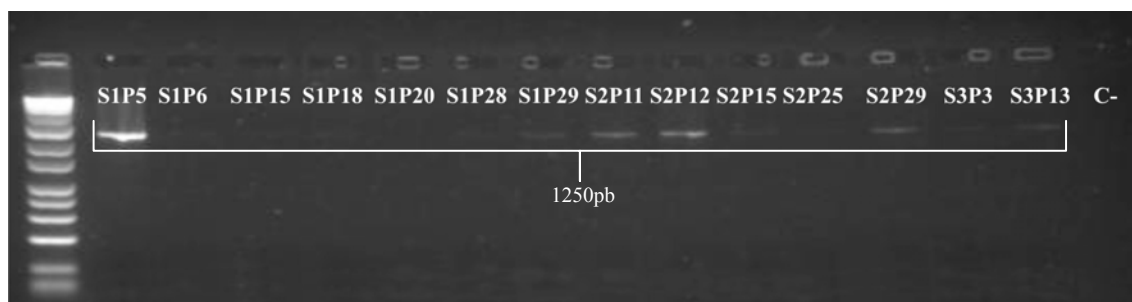


**Figura 10.** Productos de PCR amplificados con primers Universales de las muestras de DNA. MW, Molecular Weight Marker (Directload Wide Range DNA Marker; SIGMA). 1000 pb.

Para la obtención de grupos específicos (*a-Proteobacteria* y *Pseudomonas*), se realizo en primera instancia la amplificación de un fragmento de alrededor de 1450pb para organismos pertenecientes a los grupos *a-Proteobacterias* (Figura 11) y un fragmento de 1250pb para organismos del grupo de las *Pseudomonas*. (Figura 12).

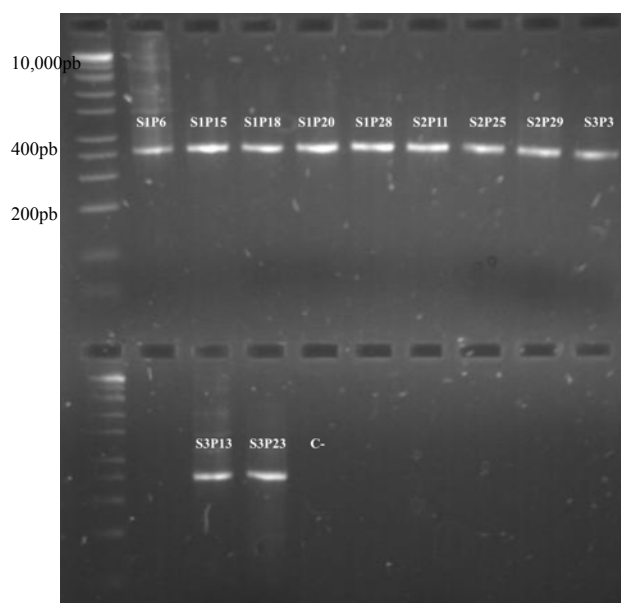


**Figura 11.** Productos de PCR amplificados con primers específicos (*a-Proteobacteria*). MW, Molecular Weight Marker (Directload Wide Range DNA Marker; SIGMA). 1000 pb.



**Figura 12.** Productos de PCR amplificados con primers específicos (*Pseudomonas*). MW, Molecular Weight Marker (Directload Wide Range DNA Marker; SIGMA).

Posteriormente estos productos fueron utilizados para realizar un PCR anidado, con el uso de los primers Universales (COM1 y Com2), para amplificar a partir de estos productos (1450pb y 1250pb), la región variable (V3-V5), de 400 pb, la cual es la región de la SSU utilizada para lograr identificar a nivel de especie los grupos bacterianos (Figura 13).

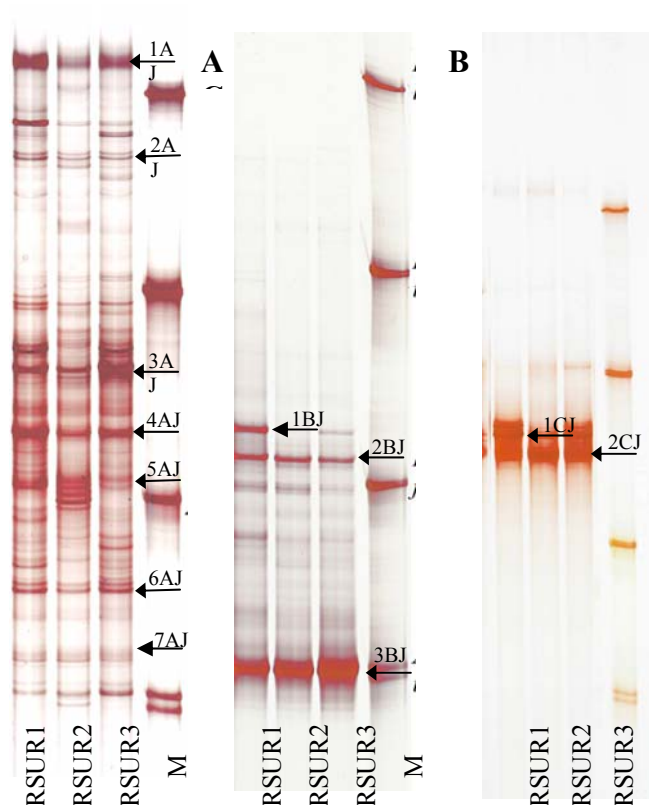


**Figura 13.** Producto PCR anidado *a-Proteobacteria* y *Pseudomonas*.

Una vez amplificada esta región variable, se realizó la digestión de la hebra fosforilada, se purificaron los productos digeridos y se desnaturalizaron las hebras sencillas resultantes para realizar el ensayo de SSCP.

### 7.2.3. Ensayos de SSCP

La Figura 14 muestra los tres diferentes perfiles bacterianos obtenidos a partir de las muestras de plantas en etapa vegetativa amplificadas tanto con primers Universales (A), primers específicos para *α-Proteobacteria* (B) y *Pseudomonas* (C).



**Figura 14.** Perfiles bacterianos etapa vegetativa de los distintos grupos de bacterias. A) Universales; B) *α-proteobacteria*; C) *Pseudomonas*. M = Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. Las cepas se indican por número y letra: 1AJ:Unculture bacterium; 2AJ:*Paenibacillus* sp.; 3AJ:*Cytophaga* sp.; 4AJ:*Flavobacterium* sp.; 5AJ:No identificada; 6AJ: *Sphingobacterium multivorum*; 7AJ:No identificada \*1BJ:*Devosia* sp.; 2BJ: *Agrobacterium tumefaciens*; 3BJ: *Agrobacterium tumefaciens* \* 1CJ: *Pseudomonas Pseudoalcaligenes*; 2CJ: *Pseudomonas* sp.

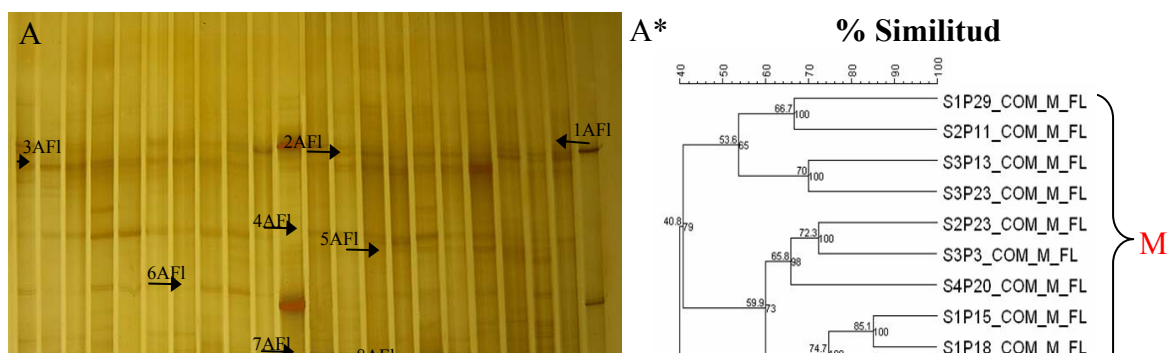
Como se describió en la metodología, aquellas bandas que fueron altamente abundantes o específicas para algunos perfiles, fueron cortadas y reamplificadas para su secuenciación. (Figura 14). La relación de las bandas escindidas se muestra en la tabla 6.

Los patrones de SSCP de la rizósfera en etapa vegetativa, realizados con primers Universales mostraron una alta complejidad debido al gran número de bandas (Figura 14A). Durante esta etapa, se observa que las bandas están localizadas a lo largo de todo el gel, indicando la presencia de una alta diversidad bacteriana.

El gel correspondiente al grupo *a-Proteobacteria* (Figura 14B) mostró varias bandas tenues y solo tres dominantes (1BJ, 2BJ y 3BJ). Para el grupo *Pseudomonas* (Figura 14C) dos bandas intensas fueron detectadas en la parte media del gel (1CJ y 2CJ). Durante esta etapa como se mencionó anteriormente no es posible realizar la distinción entre plantas femeninas y masculinas.

En la Figura 15 se muestran los diferentes perfiles bacterianos obtenidos a partir de las muestras de la etapa de Floración en plantas masculinas y femeninas amplificadas tanto con primers Universales (A), como primers específicos para *a-Proteobacteria* (B) y *Pseudomonas* (C). A la par de cada etapa, se muestra su respectivo dendograma para demostrar el nivel de diferenciación entre los perfiles con respecto al sexo (A\*, B\* y C\*)

Del mismo modo que en la etapa vegetativa, aquellas bandas que presentaron una mayor predominancia fueron cortadas e identificadas a nivel de especie (Figura 15 A, B, C)

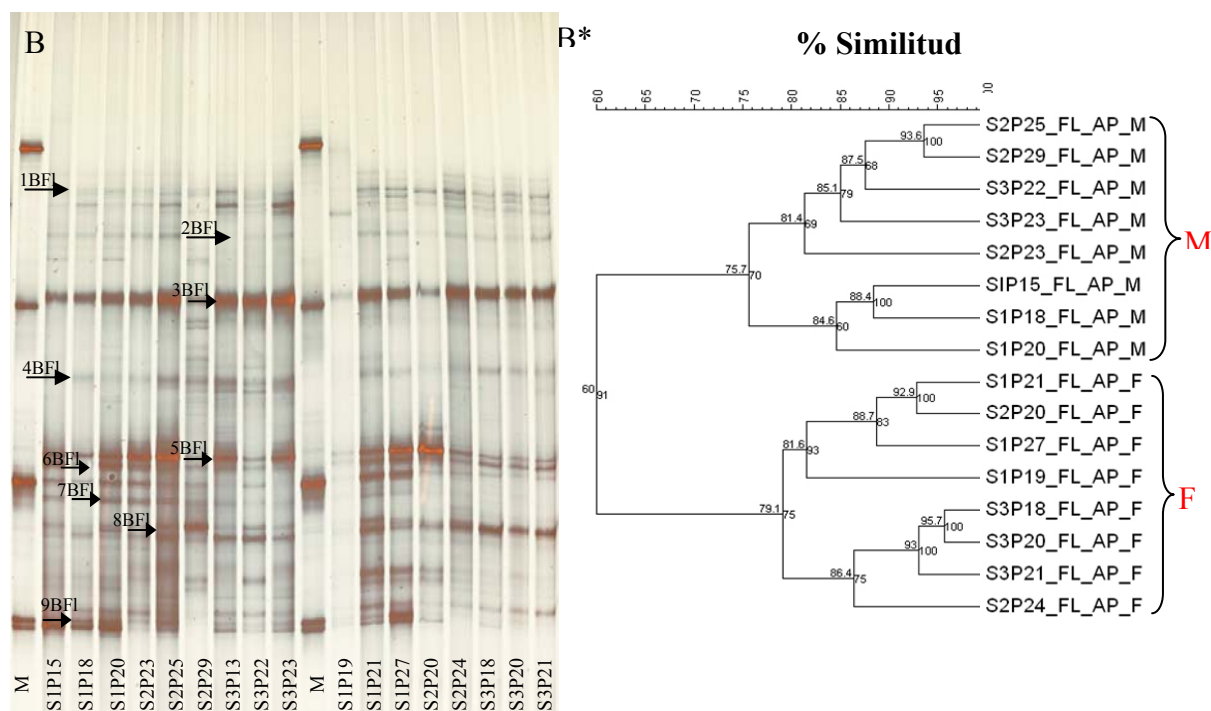


S1P12  
S1P15  
S1P18  
S1P29  
S2P11  
S2P25  
S3P3  
S3P13  
S3P23  
S4P20  
M  
S1P10  
S1P11  
S1P19  
S1P21  
S1P24  
S1P26  
S1P27  
S2P21  
S2P24  
S3P20  
M

**Figura 15A.** Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers universales de muestras masculinas y femeninas en etapa de floración. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. 1AFI: *Variovorax* sp.; 2AFI: *Bacillus licheniformis*; 3AFI: *Lysobacter* sp.; 4AFI: *Burkholderia* sp.; 5AFI: Uncultured bacterium; 6AFI: *Duganella nigrescens*; 7AFI: *Cupriavidus* sp.; 8AFI: *Pseudomonas* sp. A\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA, mediante GelCompar II Applied Maths. M (Plantas masculinas) F (Plantas femeninas).

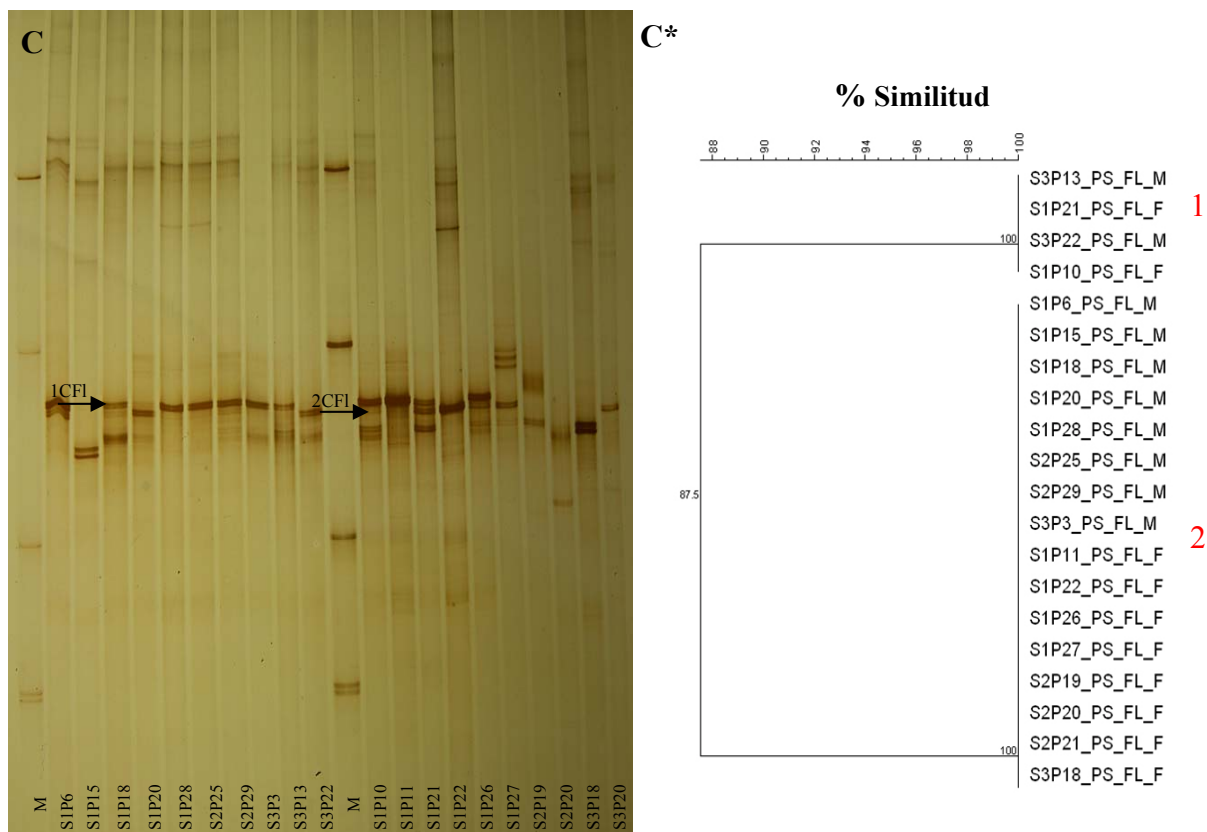
Durante esta etapa los patrones de bandeado con primers Universales muestran una disminución en el número de bandas con respecto a la etapa vegetativa, en el dendograma podemos observar que hay diferencia entre los perfiles masculinos y femeninos, con un valor de 38.6 de similitud por lo que se separan claramente en dos clados distintos los organismos pertenecientes a un determinado sexo (Figura 15 A\*).





**Figura 15B.** Perfiles bacterianos de productos de PCR anidados para  $\alpha$ -Proteobacteria de muestras masculinas y femeninas en etapa de floración. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. 1BF1:*Caulobacter* sp.; 2BF1:*Rhizobium* sp.; 3BF1: *Sinorhizobium saheli*; 4BF1:Uncultured bacterium; 5BF1:*Agrobacterium tumefaciens*; 6BF1:Uncultured bacterium; 7BF1:*Bacillus* sp; 8BF1:Uncultured bacterium; 9BF1:*Agrobacterim tumefaciens*. B\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA. M (Plantas masculinas) F (Plantas femeninas).

Contrario a lo sucedido en la etapa vegetativa, los patrones de bandeo en  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Figura 15B) incrementaron, presentando mayor heterogeneidad y posiblemente sugiriendo la dominancia por parte de este grupo. El dendograma muestra que hay diferencia entre los perfiles de las muestras masculinas y femeninas aunque su valor de similitud es alto (60.0). A pesar de esto, los perfiles lograron ser separados en los dos clados (M y F) de acuerdo a los sexos (Figura 15B\*).

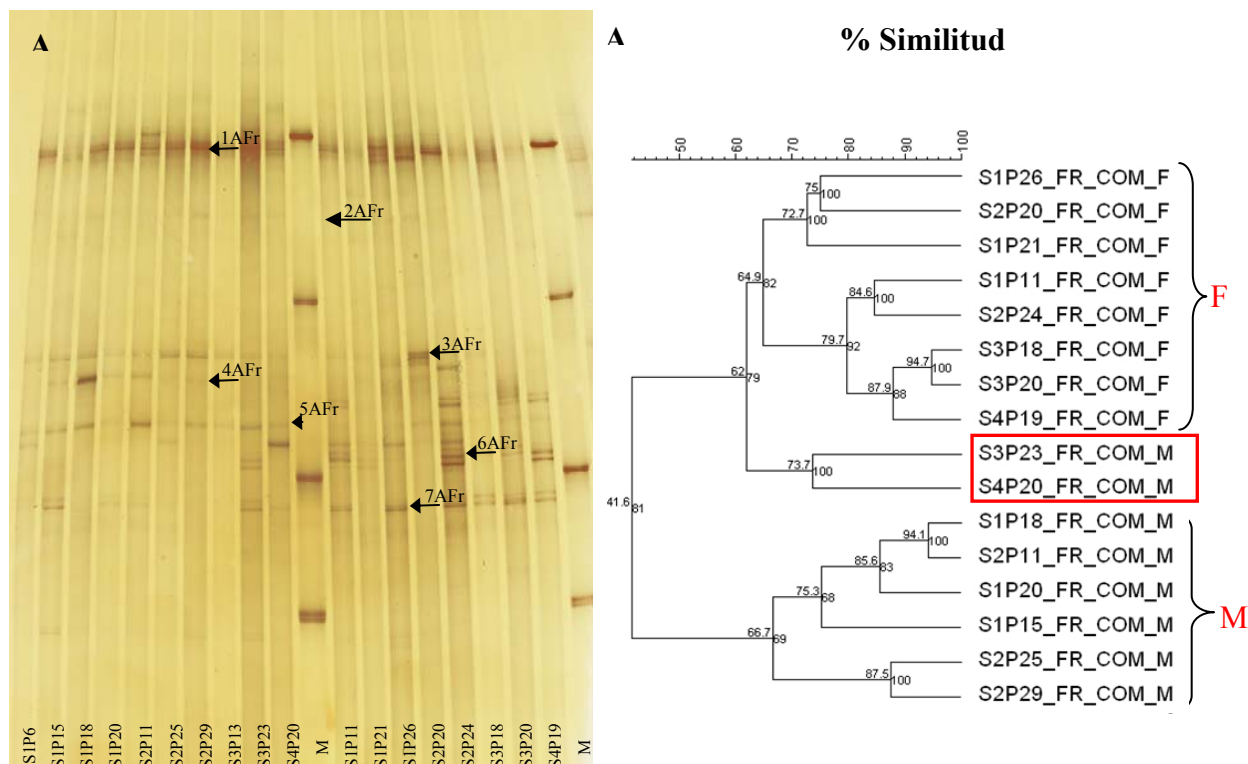


**Figura 15C.** Perfiles bacterianos de productos de PCR anidados para *Pseudomonas* de muestras masculinas y femeninas en etapa de floración. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. 1CFI: *Pseudomonas plecoglossicida*; 2CFI: *Pseudomonas* sp. C\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA. M (Plantas masculinas) F (Plantas femeninas).

Durante esta etapa no se observan cambios en los patrones de bandeo para el grupo de las *Pseudomonas*. El dendrograma claramente revela una alta similitud entre las muestras masculinas y femeninas con un valor del 87.5 agrupados en dos cládos debido a la presencia de unas cuantas bandas adicionales (Fig. 15C\* cládo 1 y 2)

De la misma manera, la Figura 16 muestra los diferentes perfiles bacterianos obtenidos a partir de las muestras de la etapa de fruto en plantas masculinas y femeninas amplificadas con primers Universales (A), primers específicos para *α-Proteobacterias*

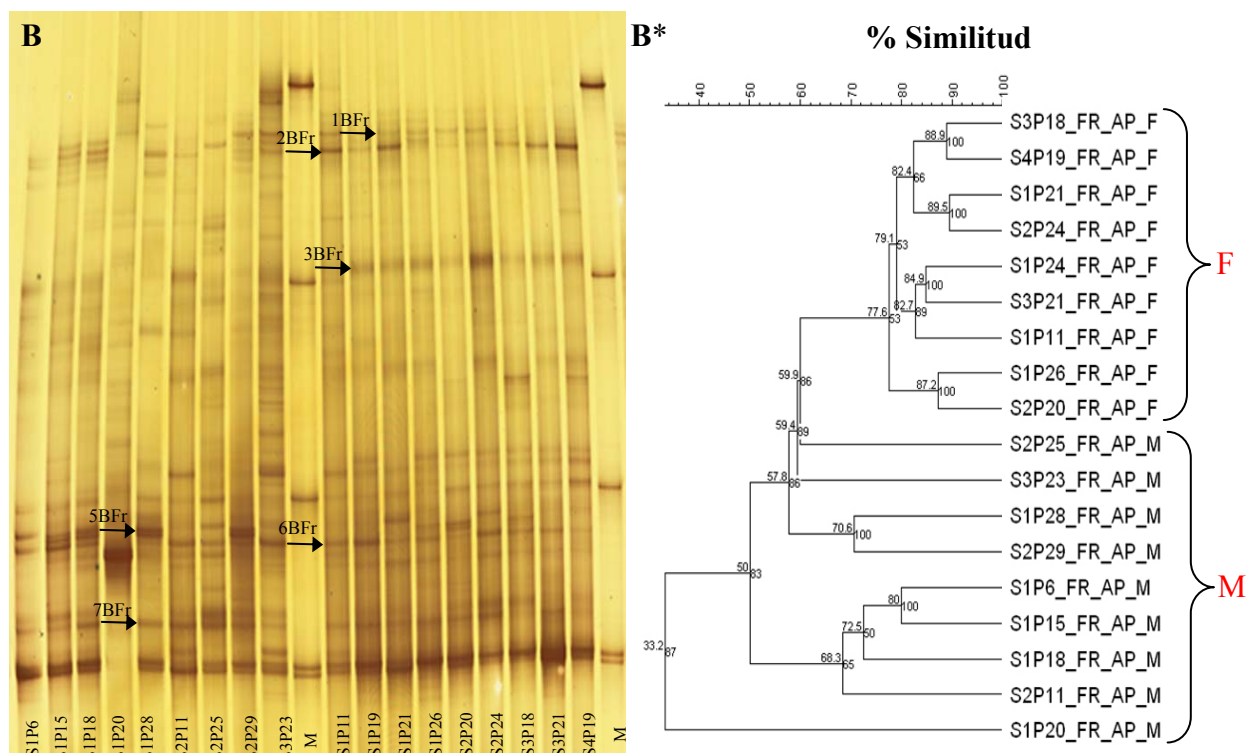
(B) y *Pseudomonas* (C), así como las bandas que fueron escindidas por ser las mas predominantes. Igualmente se muestra su respectivo dendograma para demostrar el nivel de diferenciación entre los perfiles con respecto al sexo (A\*, B\* y C\*)



**Figura 16A.** Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers Universales de muestras masculinas y femeninas en etapa de fruto. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. 1A-Fr:Uncultured bacillus; 2A-Fr:*Cupriavidus* sp.; 3A-Fr:*Pseudomonas plecoglossicida*; 4A-Fr:Uncultured bacterium 5A-Fr:*Bacillus cereus*; 6A-Fr:*Clostridium* sp.; 7A-Fr:*Clostridium* sp A\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA GelCompar II Applied Maths. M (Plantas masculinas) F (Plantas femeninas). El recuadro muestra dos plantas del sexo masculino que se agrupan más cerca de las hembras.

Durante esta etapa los perfiles muestran una mayor disminución en el número de bandas con respecto a las etapas vegetativa y de floración. La mayoría de las bandas se localizan en la parte media del gel, en la parte baja se presentan algunas de manera tenue (Figura 16A). En el dendograma podemos observar que hay diferencia entre los perfiles de las muestras masculinas y femeninas, con un valor de 41.6 de similitud por

lo que se separan en dos clados distintos los organismos pertenecientes a un determinado sexo. Sin embargo, dos individuos masculinos (recuadro) al parecer se relacionaron más al grupo de las femeninas.

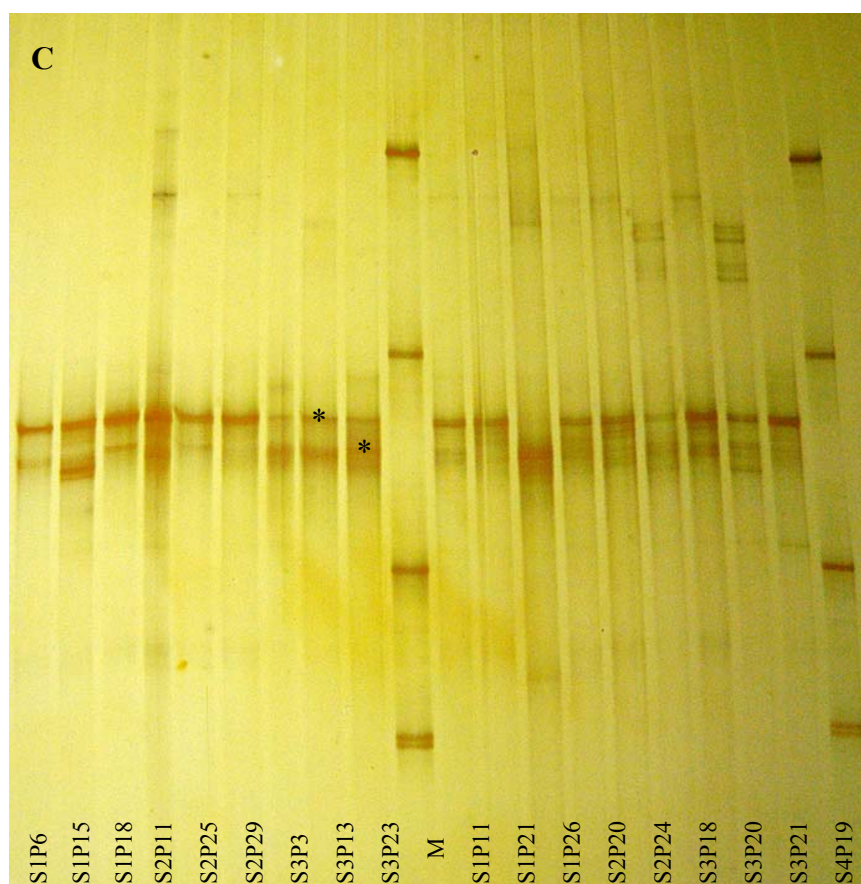


**Figura 16B.** Perfiles bacterianos de productos de PCR anidados para *a-Proteobacteria* de muestras masculinas y femeninas en etapa de fruto. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. 1BFr: *Caulobacter* sp.; 2BFr: *Rhizobium* sp.; 3BFr: *Sinorhizobium saheli*; 4BFr: Uncultured bacteria; 5BFr: *Rhizobium* sp.; 6BFr: *Sinorhizobium* sp. B\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA GelCompar II Applied Maths. M (Plantas masculinas) F (Plantas femeninas).

Los perfiles de SSCP tomados durante esta etapa mostraron algunas variaciones con respecto a los encontrados en la etapa de floración. Esto fue evidente por inspección visual de los perfiles, suportada por análisis de agrupamiento y por análisis de similitud entre los perfiles. Al parecer los organismos del grupo de las *a-Proteobacteria* no se diferencian tan significativamente como en la etapa anterior. Sin embargo, el dendrograma muestra una distribución mucho más heterogénea entre las muestras de las

plantas masculinas a diferencia de las femeninas que tienen una mayor similitud entre ellas (Fig. 16B\*). Lo que si es evidente es que el número de organismos del grupo de las *α-Proteobacteria*, aumentó significativamente durante esta etapa.

Debido a que el patrón de migración para el grupo de las *Pseudomonas* en la etapa de fruto fue idéntico al de floración, en este ensayo de SSCP no fue necesario escindir ninguna banda (Figura 16C; las bandas no escindidas son indicadas con \*).



**Figura 16C** Perfiles bacterianos de productos de PCR anidados para *Pseudomonas* de muestras masculinas y femeninas en etapa de fruto. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). Las flechas indican las bandas que fueron escindidas para su posterior identificación a nivel de especie y/o género. \* = Ver texto.

#### 7.2.4. Identificación de géneros bacterianos

Obtenidas las secuencias de las bandas individuales cortadas del gel, éstas fueron alineadas e ingresadas en la base de datos (GenBank) utilizando la herramienta BLAST para determinar similitud e identificar el género al cual pertenecen.

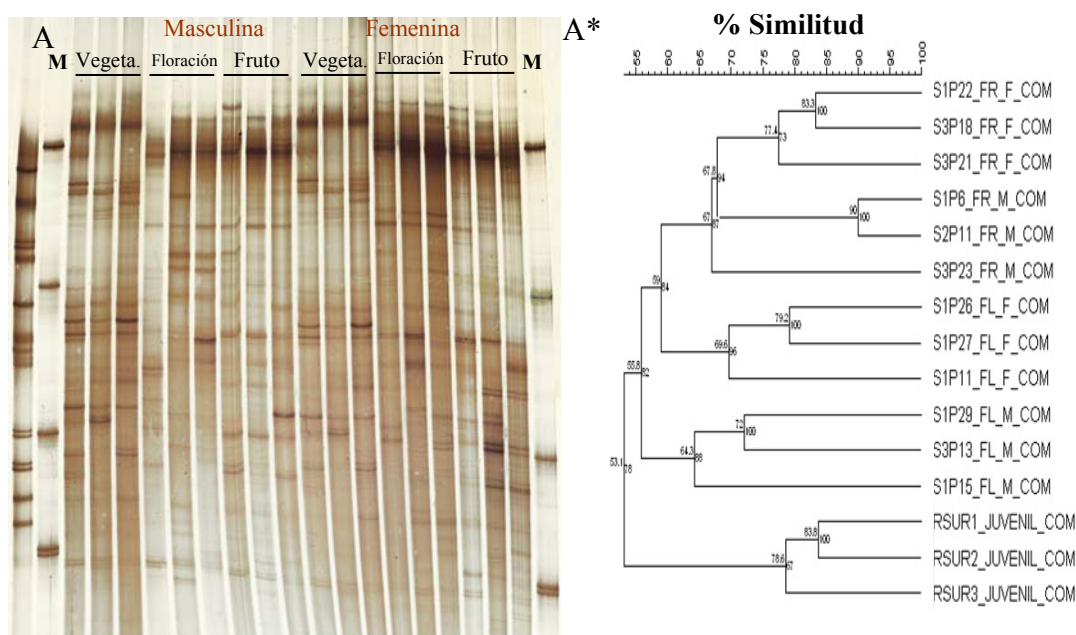
La tabla 7 muestra como fueron identificadas las cepas mediante la comparación de secuencias en la banca genómica. Posteriormente tras realizar el análisis filogenético aquellas cepas que no pudieron ser identificadas a nivel de género pudieron ser asignadas a distintos grupos (Figuras 19 y 20).

**Tabla 6. Identificación parcial de secuencias individuales de los perfiles de SSCP de la rizósfera de papaya en tres etapas fenológicas.**

Asignación filogenética	Homología con bacterias reportadas en el GenBank	% similitud	No. Acceso GenBank
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	100%	AY364329
	<i>Devosia</i> sp.	99%	EF494195
	<i>Caulobacter</i> sp.	99%	AF361188
	<i>Rhizobium</i> sp.	99%	DQ395341
	<i>Sinorhizobium</i> sp.	99%	AF298836
	<i>Sinorhizobium saheli</i>	100%	AM181753
	Uncultured <i>Alpha-Proteobacteria</i>	99%	AB074652
	Uncultured bacterium	99%	DQ532316
	Uncultured bacterium	97%	DQ327686
	<i>Duganella nigrescens</i>	99%	EF584756
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	99%	EF090740
	<i>Variovorax koreensis</i>	99%	DQ432053
	<i>Bulkholderia</i> sp.	99%	EF149007
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Lysobacter</i> sp.	99%	DQ191179
	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99%	DQ837704
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99%	EF544606
	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp	99%	EF626822
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i> sp.	97%	EF633685
	<i>Bacillus licheniformis</i>	100%	DQ870721
	<i>Bacillus cereus</i>	100%	DQ298082
	<i>Clostridium</i> sp.	99%	DQ839378
	<i>Paenibacillus</i> sp.	100%	EF690425
	Uncultured Bacilli bacterium	100%	AB265893
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i> sp.	99%	DQ072106

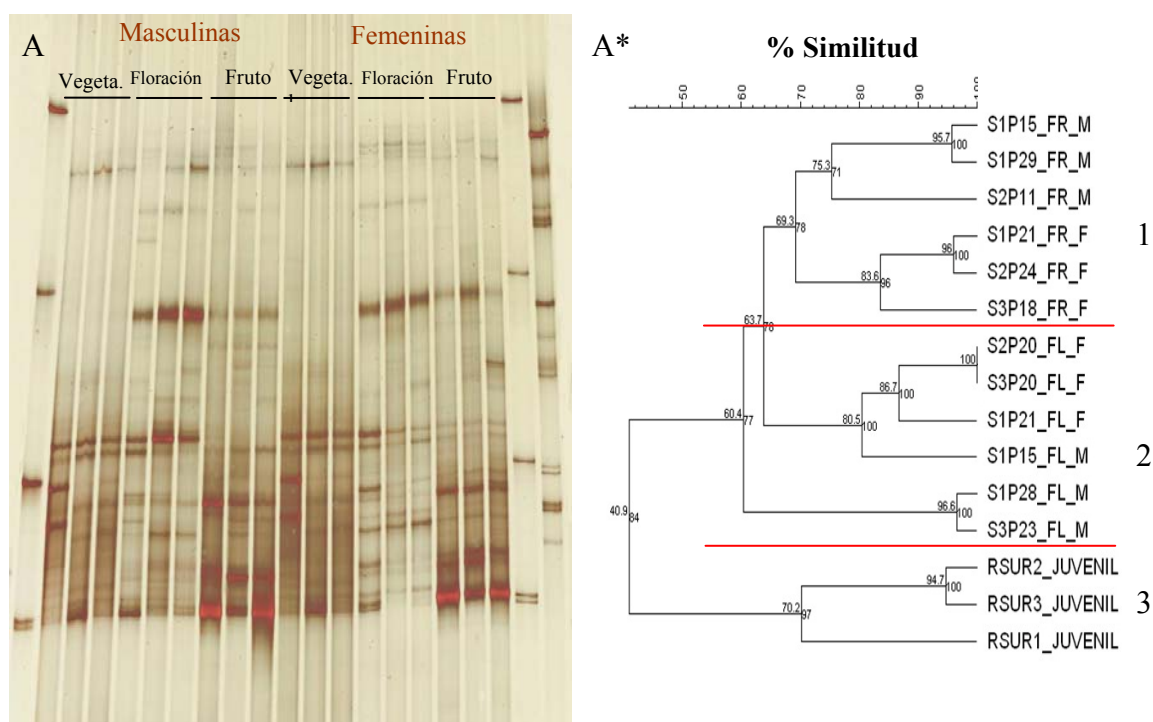
	<i>Cytophaga</i> sp.	99%	AY238333
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	99%	AY787820
	Uncultured bacterium	100%	DQ404715
	Uncultured bacterium	99%	EF608523

### 7.2.5. Análisis comparativo de los perfiles bacterianos entre las etapas fenológicas.



**Figura 17.** Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers Universales de muestras masculinas y femeninas en las tres etapas fenológicas. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). A\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA.

El dendograma muestra una clara diferenciación de la etapa vegetativa con respecto a las otras dos etapas. Entre las etapas de floración y fruto también se presentan diferencias ya que se dan agrupamientos de floración de ambos sexos y de fruto de ambos sexos. Sin embargo se observa que no hay una diferenciación completa entre las etapas, por lo que no se puede concluir con certeza la diferencia entre las etapas para los grupos Universales.



**Figura 18.** Perfiles bacterianos de productos de PCR amplificados con primers *a-Proteobacteria* de muestras masculinas y femeninas en las tres etapas fenológicas. M= Marcador de migración de SSCP. De arriba hacia abajo: *B. licheniformes*, *R. trifolii*, *F. johnsoniae*, *R. radiobacter* (banda doble). A\*). Análisis de similitud basados en la correlación de Dice y análisis de agrupamiento por UPGMA.

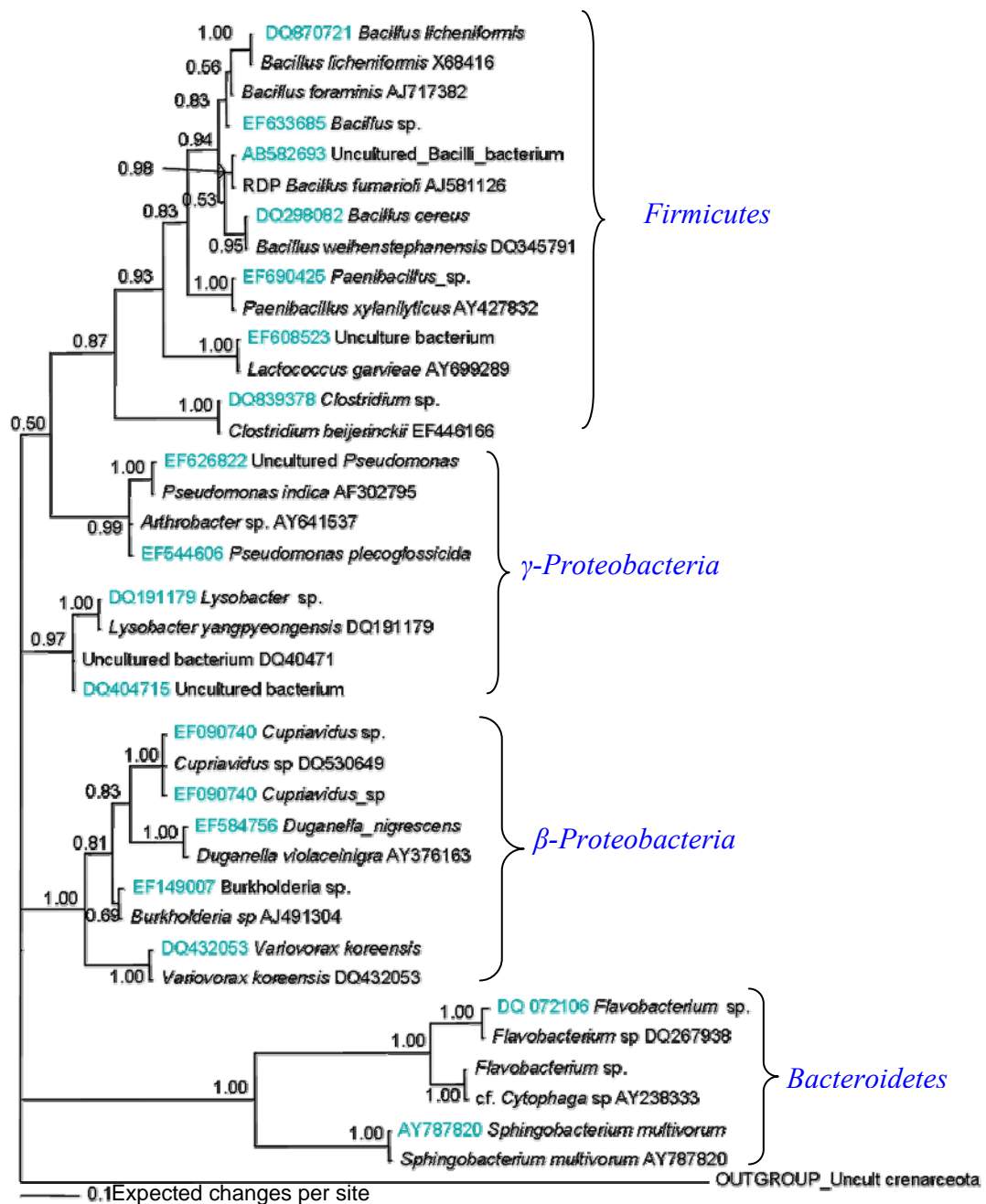
El dendograma para *a-Proteobacteria* muestra diferencia de la etapa vegetativa con respecto a las etapas de floración y fruto. Hay una separación en tres clados (1, 2 y 3), donde los agrupamientos de las plantas femeninas y masculinas son diferenciados de acuerdo a la etapa fenológica.



## 7.2.6. Árboles Filogenéticos

Las relaciones filogenéticas entre las bacterias fueron obtenidas mediante el análisis de la secuencia parcial del gen que codifica la subunidad 16S rDNA. Las secuencias obtenidas para los grupos de primers Universales y *a-Proteobacteria* fueron alineadas y analizadas mediante el algoritmos de CLUSTAL en el programa MEGA 4.0.

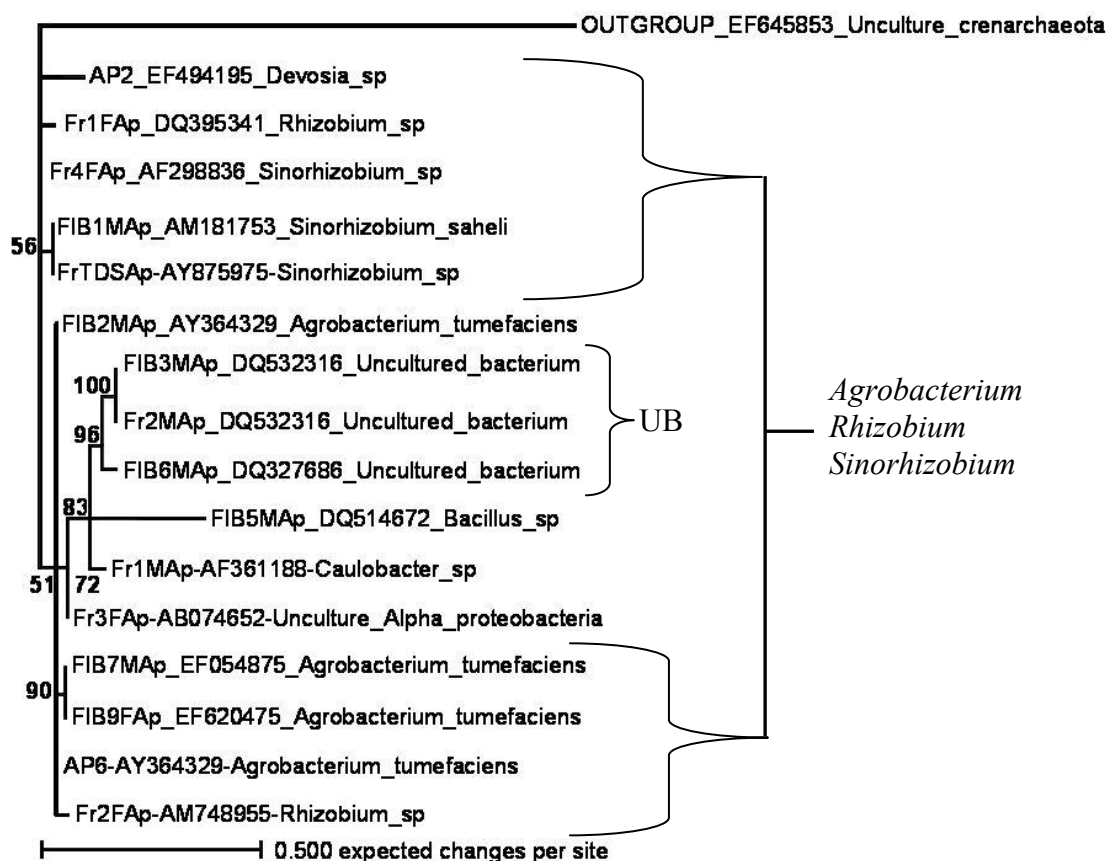
### - Grupo Universales



**Figura 19.** Árbol filogenético construido mediante el programa MrBayes 3.1.2 a partir de una región de 380pb que muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias de genes del 16S rDNA obtenidas con primers Universales. Los valores observados son los valores de credibilidad calculados, expresados en decimales. Un valor de 1.0 significa que es 100%, 0.98 = 98%.

Las hojas del árbol corresponden a las bandas escindidas y a la secuencia que presentó mayor homología con estas bandas. Las hojas que presentan color azul son las secuencias obtenidas en este trabajo, mientras que los nombres de las especies y No. de acceso pertenecen a secuencias obtenidas de la base de datos ribosomal perteneciente al “Centro de Ecología Microbiana” de la Universidad Estatal de Michigan. (<http://rdp.cme.msu.edu/>).

- **Grupo *Alpha-Proteobacteria***



**Figura 20.** Árbol filogenético construido mediante el programa MrBayes 3.1.2 a partir de una región de 400pb que muestra las relaciones filogenéticas entre las secuencias de genes del 16S rDNA obtenidas con primers  $\alpha$ -*Proteobacteria*.

Las hojas del árbol corresponden a las bandas escindidas del ensayo de SSCP de  $\alpha$ -*Proteobacterias*. Se observa la presencia de dos grupos; uno comprendido por *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y otro por las bacterias no cultivables (UB: Uncultured bacteria), *Bacillus* y *Caulobacter*.



## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1. Bacterias aisladas de la rizósfera de papaya por cultivos dependientes

Las bacterias asociadas a plantas pueden incrementar la capacidad de las mismas en el uso de los nutrientes del suelo aumentando el desarrollo de la raíz, así como la toma de nitratos, solubilizando fósforo o controlando patógenos (Park *et al.*, 2005). Cada especie de planta, genotipo o cultivar puede desempeñar un papel significativo en la estructura de las comunidades microbianas heterotróficas asociadas y en la determinación del resultado biológico de tales asociaciones de acuerdo al suministro de energía y fuentes de carbón originadas por los exudados de raíz (Smith & Goodman, 1999; Miethling *et al.*, 2000; Smalla 2001; Di Batista *et al.*, 2003). El conocimiento de la diversidad bacteriana es una herramienta útil para determinar el papel ecológico que las bacterias ejercen sobre la planta.

Bajo este contexto, en este trabajo se realizó un estudio sobre la diversidad bacteriana predominante que se encuentra asociada a la rizósfera de una variedad de papaya (*Carica papaya L.*) en Baja California Sur durante tres etapas fenológicas y entre sexos a partir de la etapa de floración, y para ello se utilizaron técnicas microbiológicas estándar y técnicas moleculares basadas en la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 16S rDNA.

La actividad microbiana en regiones áridas es altamente dependiente de características tales como temperatura, humedad y disponibilidad de carbono orgánico (Bhatnagar &

Bhatnagar 2005). Baja California Sur presenta un clima semi-árido y se caracteriza por poseer suelos pobres en materia orgánica (<1%) con niveles bajos en nitrógeno y calcio (Ávila *et al.*, 2005). El número de aislamientos bacterianos obtenidos por técnicas microbiológicas en este trabajo fue bajo (n=51), debido no sólo a las condiciones del suelo sino también a la dificultad de cultivar microorganismos en condiciones de laboratorio, puesto que ningún medio es adecuado para el crecimiento de todas las bacterias debido al desconocimiento que se tiene bajo el cual muchas de estas crecen en su hábitat natural y a sus requerimientos nutricionales (Alexander, 1987; Pace, 1996; Janssen *et al.*, 2002). Diversos autores mencionan que tan solo entre el 0.1 y el 1% dependiendo el hábitat, las bacterias pueden ser cultivables por técnicas standard (Amann *et al.*, 1995; Øvreås & Torsvik 1998; Suzuki *et al.*, 2005). Guzmán (2007) realizó aislamientos en rizósfera de frijol Yorimón en esta misma zona, obteniendo una baja incidencia de microorganismos coincidente con lo obtenido en este trabajo.

A través de los cultivos dependientes se ha observado que existe una prevalencia de bacterias Gram negativas (*Proteobacteria*) en la rizósfera (Sanguin *et al.*, 2006). Bacilos esporulados y cocos Gram positivos son inhibidos en la rizósfera de plantas cultivadas, mientras que las bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Agrobacter*, *Beijerinckia*, *Rhizobium* y *Azospirillum* son estimuladas (Pereira, 2000).

Este grupo de bacterias se caracteriza por ser primordialmente oportunistas y ubicuas, de rápido crecimiento y con flexibilidad para usar una variedad de diferentes fuentes de carbono (Boshard *et al.* 2006; Sanguin *et al.*, 2006). En este estudio los aislamientos de

bacterias cultivables por medios enriquecidos (Agar TSA, Nutritivo y Suelo) dieron como resultado mayor predominancia para las bacterias Gram negativas. Estos resultados son comparables a los reportados en la rizósfera de los frutales nuez (*Castanea sativa*), cereza (*Cornus mas L.*), serbal común (*Sorbus domestica L.*) y en rizósferas de pepino (*Cucumis sativus L*) y soya (*Glycine max*) (Mahaffee & Kloepper, 1997; Pereira *et al.*, 1999; Harichová *et al.*, 2006).

En cuanto al análisis de los morfotipos a lo largo de las etapas fenológicas, no se presentaron discrepancias a excepción de la etapa de fruto en la que aparecieron dos nuevos morfotipos (*Serratia sp.*, y *Rhodococcus sp.*), esto debido a que la rizósfera libera una amplia variedad de materiales orgánicos y la liberación de estos compuestos es diferente durante el desarrollo de la planta. Por lo tanto, es de esperarse que la utilización de este sustrato por parte de las bacterias pueda variar la composición de la población y su densidad durante sus etapas de desarrollo (Duineveld & Van Veen, 1999). Tanto el género bacteriano *Serratia* como la actinobacteria *Rhodococcus* se encuentran frecuentemente asociados a la rizósfera de plantas y han sido reportados como poseedores de propiedades antifúngicas (Renwick *et al.*, 1991; Kurze & Bahl, 2001). Berg *et al.*, (2005), encontraron a *Serratia* como antagonista del hongo patógeno *Verticillium* aislado de la rizósfera de fresa y canola. Asimismo Renwick *et al.* (1991), reportan a *Rhodococcus sp.*, como un antagonista del hongo *Gaeumannomyces graminis* patógeno de cereales.

Los aislamientos bacterianos fueron asignados a cuatro phylum dentro del dominio Bacteria (*Alpha*, *Beta* y *Gamma-Proteobacteria*, *actinobacterias*, *bacteroidetes* y

*firmicutes*), donde miembros pertenecientes a la división *Gamma-Proteobacteria* fueron los más dominantes, especialmente el género *Pseudomonas* reportado como uno de los mejores colonizadores de raíz (Lugtenberg *et al.*, 2001) seguido por el *Bacteroidetes Chryseobacterium* y la actinobacteria *Microbacterium*. El bajo número de aislamientos obtenidos de *Alpha* y *Beta-Proteobacteria* es un fenómeno común en cultivos en caja, probablemente debido a que los miembros de estos grupos son de lento crecimiento (Harichová *et al.*, 2006) o a que pueden tener requerimientos específicos para su fisiología y por lo tanto se pueden perder durante los cultivos (Ellis *et al.*, 2003).

Es interesante denotar que de los grupos aislados se logró identificar a nivel de especie la cepa 3, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, la cual ha sido reportada como tolerante a la salinidad (Rangarajan *et al.*, 2001; Rangarajan *et al.*, 2002) y el suelo donde se realizó el estudio presenta salinidad en bajo porcentaje (0.149 dS/m). Además Rangarajan y colaboradores (2001) encontraron que esta bacteria es capaz de utilizar mas sustratos y ser resistentes a mas antibióticos comparada con otras bacterias de rizósfera lo que la hace más competitiva y quizás un agente biocontrolador contra algunos patógenos comunes en agroecosistemas costeros. Además de esta especie, también se logró identificar una cepa (cepa 6), perteneciente al género *Enterobacter* de la cual algunas especies han sido reportadas como patógenas para las plantas (Harichová *et al.*, 2006).

Por otro lado se ha observado una supresión de bacterias patogénicas por parte de especies como *Pseudomonas fluorescens* mediante la producción de antibióticos (Harichová *et al.*, 2006). Al respecto, la cepa 11 presenta una homología del 99% con *Pseudomonas fluorescens*. Igualmente, especies del género *Enterobacter* al parecer



también actúan como antagonistas contra patógenos. Se ha sugerido que principalmente algunos representantes de *Pseudomonas* y *Enterobacter*, así como otros grupos de bacterias, como *Agrobacterium*, pertenecen a los grupos más abundantes de especies que colonizan raíces, debido quizás a la participación que tienen en este ambiente como supresoras de enfermedades (Felske *et al.*, 2000; Egamberdiyeva & Höflich, 2003; Garbeva *et al.*, 2004; Harichová *et al.*, 2006).

En total se identificaron 11 cepas a nivel de género (*Pseudomonas sp.*, *Chryseobacterium sp.*, *Microbacterium sp.*, *Enterobacter sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Bordetella sp.*, *Ralstonia sp.*, *Bacillaceae bacterium*, *Serratia sp.* y *Rhodococcus sp.*), una a nivel de especie (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) y una cepa presenta el 99% de similitud contra *Gordonia sp.*

La mayoría de estos géneros han sido reportados en aislamientos por métodos tradicionales en rizósferas de cebada, pepino, trigo, maíz, remolacha y en los frutales de nuez, cereza y serval (Lilley *et al.*, 1996; Höflich *et al.*, 2000; Yang & Crowley, 2000; Germida & Siciliano, 2001; Di Battista *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2006; Harichová *et al.*, 2006; Sanguin *et al.*, 2006). Sin embargo, se debe establecer que existe muy poca información sobre la estructura bacteriana en la rizósfera de plantas de fruto o inclusive es totalmente ausente (Harichová *et al.*, 2006).

Por otro lado algunos de estos géneros han sido descritos como rizobacterias promotoras de crecimiento en plantas, el efecto sobre las plantas está unido a su capacidad de colonizar, sobrevivir y producir metabolitos activos como consecuencia de

su desarrollo en asociación con las raíces. *Pseudomonas* sp., incrementa el crecimiento de la planta e inhibe numerosos patógenos (Rangarajan *et al.*, 2001; Di Battista *et al.*, 2003), *Serratia* sp., dificulta el desarrollo de hongos patógenos (Berg *et al.*, 2005), *Ochobactrum* sp., es tolerante a la salinidad y fijador nitrógeno (Tilak *et al.*, 2005), *Enterobacter* sp., es fijador de nitrógeno (Martinez *et al.*, 2003), *Stenotrophomonas* sp., es bio-controlador de nemátodos (Insunza *et al.*, 2002).

En cuanto a las actinobacterias, se ha demostrado que habitan la rizósfera de muchas especies de plantas, incluyendo cultivos de cereales tales como el trigo y leguminosas como la soya (Pereira *et al.*, 1999a; Coombs & Franco, 2003). Miller *et al.* (1989) reporto la predominancia de actinobacterias en la rizósfera de maíz por métodos de cultivo tradicional. Los trabajos de Crawford *et al.*, (1993) y Pereira *et al.* (1999a) muestran que estos microorganismos con baja capacidad competitiva, son aptos para sobrevivir a condiciones adversas con bajos requerimientos en nutrientes orgánicos. Por otro lado se destacan por la posibilidad de sintetizar un largo número de metabolitos secundarios como vitaminas, sustancias inhibidoras de actividad enzimática, antibióticos y otros compuestos biológicamente activos (Williams *et al.*, 1983; Heuer *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1999b) de tal manera que estos microorganismos son de importancia ecofisiológica para las plantas y para las demás poblaciones con quienes se integren (Pereira, 2000).

Las técnicas dependientes de cultivos, son técnicas informativas que nos sirven para indicar qué representantes activos de algunas divisiones bacterianas son cosmopolitas en el ambiente rizosférico y cuales son limitadas a ciertos hábitat (Hugenholtz *et al.*,

1998; Harichová *et al.*, 2006). En tanto que las técnicas de cultivo independiente tienden a complementar los métodos basados en aislamiento para realizar comparaciones de diversidad y estructura de comunidades microbianas.

## **8.2. Bacterias aisladas de la rizósfera de papaya por técnica independiente de cultivo**

Durante la última década, los métodos basados en la amplificación directa de PCR y el análisis del gen ribosomal permitieron un estudio más comprensivo de las comunidades microbianas en comparación con las técnicas basadas en cultivo. La amplificación de fragmentos del 16S rDNA ha sido comúnmente utilizada para estudiar la diversidad bacteriana en varios ecosistemas (Felske *et al.*, 1998; Tamaki *et al.*, 2005) y para monitorear cambios en las comunidades microbianas (Eicner *et al.*, 1999).

El gen 16S rDNA posee características que lo definen como un marcador filogenético (Gomes *et al.*, 2001), todas las bacterias poseen este gen, el cuál tiene una función esencial en síntesis de proteínas y por lo tanto sus relaciones evolutivas pueden ser deducidas. El 16S rDNA es derivado de un ancestro común y por lo tanto es un gen homólogo, altamente conservado y utilizado en inferencias filogenéticas (Macrae, 2000; Hur & Chun, 2004), y el análisis de su secuencia provee información valiosa para estudiar la composición y la dinámica de comunidades microbianas (Smalla *et al.*, 2001).

La región variable utilizada en este estudio es la comprendida entre V4-V5 y según Schmalenberger y colaboradores (2001), esta región presenta menos diversidad

intraespecies reduciendo el efecto de operones heterogéneos, por lo tanto el uso de esta región nos permitió obtener perfiles bacterianos más confiables que si se hubiese utilizado una región distinta.

En este estudio el ensayo de PCR anidado fue realizado para facilitar el análisis de fragmentos del gen 16S rDNA de grupos bacterianos específicos: *α-Proteobacteria* y *Pseudomonas* mediante los ensayos de SSCP. Una ventaja conferida por esta estrategia, fue el incremento de la sensibilidad, para poder visualizar especies que se encontraban en menor número (Gomes *et al.*, 2001; Boon *et al.*, 2002). Como se puede apreciar en los ensayos de SSCP de los grupos específicos, las especies pertenecientes a estos grupos (*Alpha* y *Pseudomonas*), no se aprecian bien representadas al realizar la amplificación del gen 16S con los primers Universales, lo que enmascara la presencia de estos grupos después de compararse contra los perfiles generados por los grupos específicos (Figuras 14A, B y C; 15A, B y C; 16A, B y C).

De estos dos grupos bacterianos específicos, los organismos pertenecientes a las *Pseudomonas* son de las bacterias más importantes que habitan la rizósfera de diversas plantas de cultivo (Morgan *et al.*, 2005), algunas de ellas han sido frecuentemente reportadas como agentes de control biológico (BACs) (Costa *et al.*, 2006). Johri y colaboradores (2003), reportan esta bacteria como potencial solubilizadora de fósforo. Sin embargo, mientras muchas *Pseudomonas* de rizósfera son promotoras de crecimiento, otras lo inhiben y causan enfermedad. Aún no es claro qué hace a algunas *Pseudomonas* benéficas y a otras patógenas especialmente mientras ellas colonizan el

mismo nicho y poseen mecanismos similares para colonizar las plantas (Morgan *et al.*, 2005).

En cuanto al grupo de las  *$\alpha$ -Proteobacterias*, al parecer siempre están presentes en altas concentraciones en la rizósfera como se pudo observar en los resultados (Figuras.14B, 15B y 16B). Esto se ha demostrado claramente en raíces de plantas de trigo con la presencia de *Azospirillum*, y en el trébol blanco con la presencia de *Rhizobium*. Los efectos benéficos de estas bacterias incluyen la promoción de crecimiento en plantas, síntesis de fitohormonas y la fijación de nitrógeno atmosférico. Felske *et al.*, (2000), mencionan que especies cercanas del tipo de *Rhizobium* se encuentran restringidas a partículas de suelo adherido a la raíz de las plantas y especialmente a la fracción del rizoplano y la endo-rizósfera. Es muy interesante también el hecho de que al parecer algunas especies de  *$\alpha$ -Proteobacterias* que se han reportado directamente del suelo pertenecen a especies no cultivables, coincidente con los resultados en los cuales algunas de las bandas de los perfiles de SSCP obtenidos para este grupo mostraron bacterias no cultivables también en la rizósfera (Tabla 6).

### **8.2.1. Análisis de grupos bacterianos dominantes mediante la técnica del SSCP**

Aunque la técnica de SSCP no es cuantitativa, un aumento relativo en la intensidad de la banda indica un aumento relativo en la cantidad correspondiente al gen 16S de rDNA, el cual es consistente con un aumento relativo en la densidad celular. La comparación de los perfiles de SSCP realizados sobre la rizósfera de papaya durante las etapas fenológicas reveló la presencia y ausencia de algunos organismos lo que indica cambios

en la comunidad. Por otro lado, algunas bandas estuvieron presentes en todos los estados fenológicos y sexos de las plantas, sugiriendo que la presencia de ciertas especies bacterianas dominantes es independiente de estos factores.

Un total de 39 bandas escindidas de los geles de SSCP fueron reamplificadas de las diferentes etapas fenológicas. El análisis de las secuencias obtenidas de la reamplificación indicó la presencia de varias especies conocidas como típicos colonizadores de raíz (Tabla 6). Las secuencias se encuentran atribuidas a varios grupos filogenéticos (Figuras 19 y 20) y están en concordancia con otros estudios sobre comunidades bacterianas aisladas de rizósferas de cereales y leguminosas (Höflich *et al.*, 2000; Johri *et al.*, 2003). En este estudio se encontró que muchas de las secuencias están relacionadas  $\alpha$ -*Proteobacterias* de diferentes subclases ( $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ ), *Firmicutes* (*Bacillus sp-Clostridium sp*) y a miembros del grupo *Bacteroides*. Sin embargo, Johri y colaboradores (2003), mencionan que las proporciones relativas de varios de estos géneros pueden variar de acuerdo a la rizósfera de la planta con la que se esté trabajando.

### **8.3. Análisis de bandas escindidas, etapas fenológicas y diferenciación sexual.**

#### **8.3.1. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers Universales**

Algunos autores describen que la comunidad microbiana asociada a la rizósfera de plantas es dependiente del tipo de planta, tipo de suelo, etapa de desarrollo y otros

factores ambientales (Germida *et al.*, 1998; Marschner *et al.*, 2001; Garbeva *et al.*, 2004).

Los ensayos de SSCP realizados con los primers Universales nos dieron una idea acerca de la alta diversidad bacteriana presente en el sistema rizosférico de Papaya. No obstante hay que diferenciar el hecho de que los perfiles bacterianos observados en los ensayos incluyen no sólo a organismos vivos y fisiológicamente activos, sino también registra grupos de bacterias inactivas e inclusive muertas (Duineveld *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2005).

La mayor parte de los géneros bacterianos encontrados en la rizósfera de papaya con primers Universales mostraron variaciones durante las etapas fenológicas de la planta. Son muchos los factores tanto bióticos como abióticos que influyen en la exudación radical a lo largo del desarrollo y por lo tanto alteran la composición bacteriana rizosférica (Grayston *et al.*, 1996; Folman *et al.*, 2001; Marschner *et al.*, 2004). Muchos estudios, principalmente con plantas anuales crecidas bajo condiciones controladas han mostrado que especies diferentes de plantas difieren en la composición y cantidad de exudados (Marschner & Timonen, 2005a), debido a esto los microorganismos en general tienen un patrón de crecimiento dependiente del tipo de sustrato que tengan disponible (Bowen y Rovira, 1991; Di Batista *et al.*, 2003). Por lo tanto es de esperarse que la utilización de este sustrato por parte de la bacteria pueda variar la estructura de la población y su densidad durante el desarrollo de la planta. Esto es soportado por trabajos de Di Cello *et al.* (1997) y Seldin *et al.* (1998) quienes observaron que las poblaciones de *Burkholderia cepacia* y *Peanibacillus azotofixans* en la rizósfera de

maíz cambiaron y disminuyeron (*Burkholderia cepacia*) durante el crecimiento de la planta. Duineveld *et al.* (1999-2001) también observaron cambios en los perfiles metabólicos y de estructura en la comunidad bacteriana durante el desarrollo de plantas de Crisantemo.

Nuestros resultados muestran como durante la etapa vegetativa se observa un considerable número de bandas revelando una alta diversidad bacteriana (Figura 14A), esto debido quizás a que el ecosistema es más inestable y la exudación de las raíces de plantas jóvenes constituyen un nuevo y nutritivo elemento para el suelo (Di Cello 1997), proporcionando señales que permiten que ciertos microorganismos que forman simbiosis con la planta sean atraídos hacia su rizósfera (López de Victoria & Novell, 1993). La rápida colonización de las bacterias en esta etapa indican que hay una liberación de compuestos sencillos, los cuales son utilizados por los colonizadores primarios, bacterias oportunistas que degradan fácilmente el azúcar y los ácidos orgánicos como miembros del grupo *Proteobacteria* ( $\alpha$  y  $\gamma$ ). Esta etapa está caracterizada por bacterias con altas tasas de crecimiento favoreciendo las estrategias (r) (Yang & Crowley, 2000; Lucas García *et al.*, 2000; Duineveld *et al.*, 2001; Marschner & Rumberger, 2004).

Debido a la gran cantidad de bandas presentes en el perfil de SSCP y a la co-migración de estas, fue un problema recuperar secuencias individuales, muchas de las bandas que fueron seleccionadas y enviadas a secuenciar revelaron mezcla de secuencias con un alto contenido de incertidumbre nucleotídica lo que indicó que el DNA extraído de la banda presentaba mas de un fragmento. Debido a esto durante esta etapa solo se



lograron identificar cinco organismos, dos de los cuales pertenecieron al grupo *Bacteroidetes* (*Cytophaga* (3AJ) - *Flavobacterium* (4AJ)), estos individuos no fueron localizados en las etapas de floración y fruto, indicando que hubo cambio de estos organismos a otros, una tercera banda correspondiente a un organismo no cultivable del género *Bacillus* (1AJ) clasificado por la secuencia como no cultivable, permaneció en las siguientes etapas. Una banda perteneciente al género *Paenibacillus* sp y una última banda que correspondió a *Sphingobacterium multivorium*.

Durante la etapa de floración se observó una disminución en el número de bandas, como se mencionó anteriormente, esto puede estar relacionado a un cambio en los patrones de exudación. De acuerdo a Duineveld & Van Veen (1999), esto pudo ocurrir debido a que mucha de la energía en forma de fotosintatos fue usada para el florecimiento de la planta, por lo tanto el sistema de raíz recibió y excreto menos material orgánico, lo que generó una mayor competencia por parte de los microorganismos.

La floración y especialmente el desarrollo del fruto pueden afectar dramáticamente el desarrollo de la planta entera. Uno de los factores también implicados en estos procesos es el hormonal (Pressman *et al.*, 1997). Chen (1987), observó que en mango (*Mangifera indica* L.) el nivel de citocininas se incrementa en el momento de la floración lo mismo que el ácido abscísico, mientras que las auxinas y giberelinas tienden a disminuir su nivel; sugiriéndose una relación de los reguladores en la reducción del crecimiento de las raíces y en promover la floración. Hurd *et al.* (1979) igualmente reportó la reducción del crecimiento de raíz durante la floración en tomate.

Por otro lado la competencia entre bacterias y otros organismos (nemátodos) después de la colonización también pudo motivar el descenso de la población. Asimismo la diversidad bacteriana puede disminuir si una o más poblaciones bacterianas se extienden a una relativa elevada densidad. De hecho, este proceso puede ser alcanzado naturalmente cuando las condiciones ambientales prevalecientes favorecen a determinado tipo de microorganismo (Trevors *et al.*, 1998).

En esta etapa de floración se encontraron géneros pertenecientes a la subdivisión  $\beta$ - (*Burkholderiales*), y  $\gamma$ -*Proteobacteria* y *Firmicutes* (*Bacillales*), organismos del género *Bacillus* encontrados durante esta etapa, son frecuentes en la rizósfera, donde pueden producir factores de crecimiento vegetal y además sintetizar agentes antifúngicos (Wipat & Harwood 1999) (Figura 15A). Cabe resaltar en esta etapa la presencia de *Burkholderia* sp, reportada en diversos trabajos como género de interés biotecnológico para el control biológico de fitopatógenos (Parke, & Gurian, 2001) y como promotora de crecimiento vegetal (Bevivino *et al.*, 1998). Esta bacteria se ha encontrado como habitante común de rizósfera de maíz (Di Cello *et al.*, 1997; Gomes *et al* 2001).

Al igual que en el proceso de floración, durante la etapa de fruto se pudo observar nuevamente un decremento en el número de organismos (bandas), ya que el fruto como estado final de crecimiento de un órgano reproductor, exige también una fuerte demanda de fotosintatos (Wolstenholme, 1990). Sin embargo, la floración generalmente tiene una prioridad menor que el fruto en atraerlos (Bollard, 1970). De hecho, el desarrollo inicial de la floración puede ser retrasado por una competición severa del crecimiento vegetativo. Una vez que los frutos se comienzan a desarrollar, la dirección del transporte de fotosintatos cambia en favor del crecimiento del fruto (Ho, 1988); en

consecuencia es posible que un porcentaje menor llegue a la raíz, por ende la rizósfera adulta comienza a ser más uniforme y estable, resultando en una presión selectiva la cual puede promover preferiblemente algunos genotipos dentro de cada población microbiana (Di Cello *et al.*, 1997; Weiskopf *et al.*, 2005). Se cree que las bacterias en esta etapa están presumiblemente adaptadas a condiciones oligotróficas difíciles, aumentando el desarrollo de estrategias K. (Yang & Crowley, 2000; Lucas García *et al.*, 2000; Duineveld *et al.*, 2001; Marschner & Rumberger, 2004).

En el ensayo de SSCP (Figura 16A), se observa que algunos de los organismos encontrados en la etapa de floración se mantienen (*Bacillus* sp, *Cupriavidus* sp. y *Pseudomonas* sp) mientras otros desaparecen. Durante esta etapa llama la atención la predominancia de los géneros *Clostridium* sp y *Bacillus* sp (Firmicutes), esto debido quizás a la capacidad de estas especies para esporular cuando las condiciones ambientales son poco favorables, lo que nos permite suponer que la población de estos organismos permaneció constante a lo largo de las etapas de desarrollo.

Estos resultados sugieren fuertemente que existen variaciones de los patrones de exudación de acuerdo a la etapa fenológica de la planta (Figuras 14A, 15A y 16A) y por lo tanto, modifica los patrones de crecimiento de las poblaciones bacterianas rizosféricas (Marschner & Crowley, 1996).

En cuanto al sexo, de acuerdo al dendograma en la etapa de floración (Figura 15A) se observan diferencias entre las plantas masculinas y femeninas, se aprecia la presencia de dos clados bien definidos. Para la etapa de fruto las plantas masculinas presentan mayor

diferencia entre ellos. Las plantas S3P23 y S4P20 (Recuadro), se ubican de manera intermedia entre grupos (masculinos y femeninos) debido a que estas se encontraban cultivadas entre plantas femeninas por lo que probablemente la diferencia de sus perfiles se deba a un entrecruzamiento de las raíces. Por su parte los perfiles de las plantas femeninas presentan mayor estabilidad.

Es importante mencionar que no se conocen antecedentes que señalen esta diferenciación en rizósfera por lo que no podemos llegar a una conclusión de por que ocurre un cambio con respecto a la sexualidad. Algunos estudios como Jindal & Singh (1975), analizaron el contenido de compuestos fenólicos en papaya y describen que estos varían de acuerdo al sexo, en su análisis observaron que hubo mayor cantidad de estos compuestos en plantas masculinas que en femeninas, al parecer el sexo es un determinante en lo que produce la planta. Es potencialmente viable que las plantas femeninas y masculinas tengan diferente cantidad en el tipo de exudados y por ello pudiese variar la comunidad bacteriana.

### **8.3.2. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers $\alpha$ -Proteobacteria**

Los geles obtenidos con los primer  $\alpha$ -*Proteobacteria* durante las tres etapas muestran un incremento de bandas dominantes de la etapa vegetativa a la de floración y una semi estabilidad de la etapa de floración a la de fruto.

Los patrones de bandeo en los geles  $\alpha$ -*Proteobacteria* (Figuras 14B, 15B y 16B) mostraron que la presencia de *Agrobacterium tumefaciens* se mantuvo estable durante

las tres etapas fenológicas. Aunque se debe hacer notar que hay un cambio en la migración electroforética de la especie, debido a la presencia de distintos operones. Esto pudo evidenciarse después de realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas de las bandas escindidas (indicadas como 2BJ y 3BJ; 5BF1 y 9BF1), correspondientes a esta especie. Sin embargo, es claro que el operón con la menor tasa de migración, disminuye su abundancia al llegar a la etapa de fruto, pero solamente en los organismos masculinos, mientras que en hembras, aunque también aparentemente existe una disminución de intensidad, aún se presenta. Varios estudios (Egamberdiyeva & Höflich, 2003; Garbeva *et al.*, 2004; Harichová *et al.*, 2006), han demostrado que especies de *Agrobacterium* promueven el crecimiento en plantas mediante señales químicas y el control de patógenos. Más aun se sabe que *Agrobacterium tumefaciens* ejerce un fuerte efecto sobre el desarrollo de la raíz. Sanguin *et al.* (2006), utilizando datos de microarreglos reportan que especies de *Agrobacterium* se presentan en grandes proporciones en la rizósfera de maíz debido a que son reductores de nitratos. Aunado a lo anterior, las  $\alpha$ -*Proteobacterias* se encuentran primordialmente en suelos plantados a diferencia de en suelos brutos debido a esta característica de ser capaces de reducir compuestos de nitrógeno (Philippot *et al.*, 2002).

A pesar de estos efectos benéficos de *Agrobacterium* sp. hacia las plantas, se sabe que existen algunas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que son patógenas para la misma debido a la presencia de un tipo de plásmido que le confiere la virulencia generando tumores (Ream, 1989).

Otros cambios visibles de la etapa juvenil a la de floración y fruto es la presencia de bacterias benéficas formadoras de nódulos fijadores de nitrógeno pertenecientes al grupo de las Rhizobias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. De acuerdo con Diouf *et al.* (2007) los *Sinorhizobium* son organismos de crecimiento medio, lo que hipotéticamente podría explicar su aparición hasta la etapa de floración y fruto.

Es importante resaltar que dentro del ensayo de SSCP de las  $\alpha$ -*Proteobacterias* se identificó un organismo perteneciente al grupo Firmicutes (*Bacillus sp*). Esto puede deberse al hecho que como se mencionó con anterioridad, se presentó a lo largo de las tres etapas fenológicas, además de ser considerada como uno de los más abundantes organismos en rizósfera. Por otro lado también hizo su aparición una bacteria identificada como no cultivable. Para la etapa de fruto se mantienen las anteriores bacterias y se revela otra bacteria también caracterizada como no cultivable. Estas dos bacterias no cultivables no pudieron ser asignadas a un grupo específico según el análisis filogenético (Figura 20), a pesar de que una de ellas presenta una migración electroforética similar a un *Agrobacterium tumefaciens*. (Figura 15B Banda 6BF1). A pesar de no haber sido posible la asignación a un género en específico, algunas bacterias dominantes no cultivables pueden llegar a jugar un papel metabólicamente activo en la comunidad nativa del suelo (Felske *et al.*, 1998).

Aunque no aparece como banda dominante se observa la presencia del género *Caulobacter* en las etapas de floración y fruto. Esta bacteria se caracteriza por ser ubicua y tener habilidad para sobrevivir en ambientes con pocos nutrientes (Fenton, 1994; Strömpl *et al.*, 2003).

Todas las cepas identificadas tanto con los primers  $\alpha$ -*Proteobacteria* como en los Universales (*Burkholderia* sp), pertenecen al grupo de las *Proteobacteria* e ellas podrían ser habitantes nativos asociados naturalmente a su hospedero, capaces de nodular y fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con las plantas (Moulin et al., 2001), aumentando así la capacidad de la planta a desarrollarse en suelos pobres en compuestos nitrogenados. Los resultados obtenidos confirman lo propuesto por D'Arcy Lameta & Jay (1997) y Kowalchuk *et al.* (2002), afirmando que las plantas ejercen fuerte selección sobre los microorganismos del suelo, con el fin de seleccionar grupos que pudieran optimizar su sobrevivencia.

El dendograma en la etapa de floración (Figura 15B) muestra diferencias entre los perfiles de las plantas masculinas y femeninas, mientras que en fruto (Figura 16B) aparentemente no hay una diferencia significativa. No obstante como se discutió anteriormente con los primers Universales no existe mucha información al respecto.

### **8.3.3. Obtención de perfiles bacterianos mediante primers para *Pseudomonas***

Las *Pseudomonas* son un género representativo predominante de las  $\gamma$ -*Proteobacteria* capaces de colonizar una amplia variedad de plantas de cultivo (Miethling *et al.*, 2003), debido a que este grupo posee ventajas selectivas como rápido crecimiento, versatilidad nutricional y producción de antibióticos, características que las hacen mas dominantes en la estructura de la comunidad microbiana (Rangarajan *et al.*, 2001; Di Battista *et al.*, 2003).

De acuerdo a lo observado en los perfiles de SSCP durante la etapa vegetativa se identificaron dos especies de bacterias (*P. pseudoalcaligenes* (1CJ) y *Pseudomonas* sp. (2CJ)) de las cuales *P. pseudoalcaligenes* no se presentó durante las etapas de floración y fruto. Se podría pensar que de la etapa vegetativa a la de floración hubo un cambio de ésta *Pseudomonas* a *P. plecoglossicida* (1CF1) la cual presentó estabilidad hasta la etapa de fruto, esta estabilidad se debe quizás a una adaptación de la bacteria a los factores tanto bióticos como abióticos que mediante su interacción modifican la densidad de las distintas poblaciones bacterianas (Lugtenberg *et al.*, 2001).

Los valores de similitud obtenidos mediante el GelCompar II para las plantas masculinas y femeninas fueron de 87.5%, sugiriendo que para este grupo no se revelan diferencias entre sexos.

#### **8.4. Filogenia**

Como puede observarse en el árbol filogenético para el grupo obtenido por primers Universales (Figura 19), las secuencias derivadas pudieron ser asignadas a cuatro distintos grupos taxonómicos (*Firmicutes*,  $\beta$ - $\gamma$  *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*). Gracias al análisis filogenético se pudo asignar putativamente a ciertos grupos aquellas secuencias reportadas como no cultivables (FIB3Fcom, cercana al género *Lysobacter*; FIB6com clasificada como una *Pseudomonas* no cultivable se logró corroborar su pertenencia al grupo; Fr3Fcom, agrupada junto con un *Lactococcus* y la FIB3com,



agrupada junto con un *Bacillus fumarioli*). De esta manera, el grupo que presentó mayor diversidad fue *Firmicutes*.

Para el grupo de las  $\alpha$ -*Proteobacteria*, las bacterias que fueron identificadas como no cultivables, no pudieron ser asignadas a un grupo ya descrito (UB: Uncultured bacteria). El filograma presenta ramas muy cortas relacionando a los distintos organismos identificados en los géneros *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. Esto se debe a que todos estos organismos pertenecen a la misma familia (Rhizobiaceae). Solamente los grupos de bacterias no cultivables así como los organismos identificados como *Caulobacter sp* y *Bacillus sp* forman ramificaciones más extensas. En cuanto a *Devosia sp* esta se aleja ligeramente del resto pues también pertenece al mismo orden (Rizobiales), que *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, por lo que es de esperarse que estos géneros jueguen un papel importante como comunidad nativa de la planta.

Uno de los organismos fue asignado a un *Bacillus sp* el cual no pertenece al grupo de las  $\alpha$ -*Proteobacteria*, lo que indica que los primers “específicos” para  $\alpha$ -*Proteobacteria*, pudieron amplificar un fragmento de este organismo. Esto puede ser posible debido a como ya en ocasiones anteriores se ha mencionado, es de los organismos más abundantes en la rizósfera.

## IX. CONCLUSIONES

- Mediante los análisis moleculares se pudo determinar que la estructura de la comunidad bacteriana presentó cambios a lo largo de las tres etapas fenológicas. Contrariamente, los análisis por métodos microbiológicos no permitieron detectar estas diferencias
- En cuanto a la diferenciación sexual, gracias a los ensayos moleculares se pudo observar una estructuración delimitada por el sexo en las etapas de floración y fruto. Del mismo modo, en dos de los grupos analizados (Universales y  $\alpha$ -*Proteobacteria*), se observó el mismo comportamiento.
- Por su parte el grupo de las *Pseudomonas* permaneció constante durante las tres etapas y entre los sexos de la planta.
- Las bacterias identificadas en este trabajo, tanto por técnicas microbiológicas como moleculares han sido reportadas como típicas colonizadoras de raíz.

## X. LITERATURA CITADA

1. Alexander M. 1987. Introduction to soil microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York. 467p.
2. Alves, H. S., R. da Silva, D. Macagnan, B. Halfeld-Vieira, M. C. Bacarat & A. Munteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*. 29:288-295.
3. Amann, R. I, W. Ludwig & K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Review*. 59: 143-169.
4. Aneesaranl, M. S. & S. Sathiamoorthy. 1997. Organic manures increase Papaya yield. *HCGRI, TNAU Coimbatore, India*. SAIC Newsletter. 7(2).
5. Arias, M. E., J.A. González, F. J. González, & A. S. Ball. 2005. Soil health - a new challenge for microbiologist and chemists. *International Microbiology*. 8:13-21.
6. Ávila, N. Y., B. Murillo, A. Palacios, E. Troyo, J. L. García, J. A. Larrinaga & M. Mellado. 2005. Caracterización y obtención de funciones para producción de biomasa en cinco cultivares de frijol Yorimón: I. Método destructivo. *Técnica Pecuaria en México*. 43(3):449-458.
7. Bais H. P., T.L. Weir, L.G. Perry, S. Gilroy & J.M. Vibanco. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organism. *Annual Review Plant Biology*. 57:233-266.
8. Bhatnagar, A. & M. Bhatnagar. 2005. Microbial diversity in desert ecosystems. *Current Science*. 89(1):91-100.
9. Barea, J-M., M. J. Pozo, R. Azcón & C. Azcón-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56 (417):1761-1778.
10. Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles & P. M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196:80-83.
11. Battista, C., E. Benizri., G. Corbel., S. Piutti & A. Guckert. 2003. Distribution of *Pseudomonas* sp. populations in relation to maize root location and growth stage. *Agronomie et Environnement*. 23: 441-446.
12. Baudoin E., E. Benizri & A. Guckert. 2002. Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology*. 19:135-145.

13. Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock & K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria Isolated from Different *Verticillium* Host Plants. *Applied Environmental Microbiology* 68(7):3328-3338.
14. Berg, G., K. Opelt, C. Zachow, J. Lottmann, M. Götz, R. Costa & K. Smalla. 2005. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology*. 56 (2):250-261.
15. Bevivino, A., S. Sarrocco, C. Dalmastrì, S. Tabacchioni, C. Cantale, L. Chiarini. 1998. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. *FEMS Microbiol Ecology*. 27 :225–237.
16. Bollard, E. G. 1970. The physiology and nutrition of developing fruits. pp. 387-425. *In*: A.C. Hulme (ed.). *The Biochemistry of fruits and their products*. Academic Press. London.
17. Boon, N., W. De Windt, W. Verstraete & E. M. Top. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. *FEMS Microbial Ecology*. 39:101-112.
18. Bosshard, P. P., R. Zbinden, S. Abels, B. Böddinghaus, M. Altwegg,† & E. C. Böttger. 2006. 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting Gram-Negative Bacteria in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4): 1359-1366.
19. Bowen G. D. & A. D. Rovira. 1991. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. *In*: *Plant roots*. (Waisel, Y., Eshel A. & Kafkafi V. (eds.)). Marcel Dekker, New cork. 641-649p.
20. Brimecombe, M.J., De Leij, F.A. and Lynch, J.M. (2001). The effects of root exudates on rhizosphere microbial populations. *En: The rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Pinta, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (Eds). Marcel Dekker Inc., New York. 95-140 p.
21. Cahoon M., M. Fernandez. 2006. Shrimp and Papaya in Hawai. *The Science of Food Systems*. 1-22 p.
22. Çakmakçi, R., F. Dönmez, A. Aydın & F. Şahin. 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil Biology & Biochemistry*. 38:1482-1487.

23. Castro L., L. A. Morales & M. Aranguren. 2000. Fundamentos teóricos – prácticas sobre el cultivo y cosecha de la papaya *Carica papaya* L. Matanzas. Editorial universitaria. 19p.
24. Chen, W. S. 1987. Endogenous growth substances in relation to shoot growth and flower bud development of mango. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 112(2):360-363.
25. Chiarini, L. A. Bevivino, C. Dalmastri, C. Nacamulli & S. Tabacchioni. 1998. Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology*. 8:11-18.
26. Chin-A-Woeng T. F. C., G. V. Bloemberg & B. J. J. Lugtenberg. 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist* 157(3): 503–523.
27. Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clément & E. Ait Barka. 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.
28. Coombs, J. T. & C. M. Franco. 2003. Isolation and identification of Actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9):5603-5608.
29. Costa, R., N. C. M. Gomes, R. S. Peixoto, N. Rumjanek, G. Berg, L. C. S. Mendonça-Hagler, & K. Smalla. 2006. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 2434–2447.
30. Crawford, D. L., J. M. Lynch, J. M. Whipps & M. A. Ousley. 1993. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal Root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(11):3899-3905
31. Czarnetzki, A. B. & C. C. Tebbe. 2004. Diversity of bacteria associated with Collembola – a cultivation – independent survey based on PCR-amplified 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*. 49:217-227.
32. Curl E. A. & Truelove B. 1986. The rhizosphere. Springer-Verlag, Germany. 288p.
33. D'Arcy Lameta, A. & M. Jay. 1997. Study of soybean and gentil root exudates. *Plant Soil*. 101: 267-272.
34. Dakora, F. D. & Phillips D. A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*. 245:35-47.

35. Di Batista, C., E. Benizri, G. Corbel, S. Piutti & A. Guckert. 2003. Distribution of *Pseudomonas* sp. Populations in relation to maize root location and growth stage. *Agronomie*. 23:441-446.
36. Di Cello, F., A. Bevivino, L. Chiarini, R. Fani, D. Paffetti, S. Tabacchioni & C. Dalmastrì. 1997. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(11):4485-4493.
37. Diouf, D., R. Samba-Mbaye, D. Lesueur, A. T. Ba, B. Dreyfus, P. de Lajudie & M. Neyra. 2007. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology*. 4.
38. Dohrmann A. B., C. C. Tebbe. 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). En: Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J.,
39. Duineveld, B. M. & J. A. Van Veen. 1999. The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: relating colony – forming units to different reference units. *Biology and Fertility Soils*. 28: 285-291.
40. Duineveld, B. M., G. A. Kowalchuk, A. Keijzer, J. D. van Elsas, J. A. van Veen. 2001. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(1):172-178.
41. Egamberdiyeva, D. & G. Höflich. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biology and Biochemistry*. 35:973-978.
42. Eichner, C.A., R.W. Erb, K.N. Timmis & I. Wagner-Döbler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(1): 102-109.
43. El-Shatnawi, M. K. J. & I. M. Makhadmeh. 2001. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. *Agronomy & Crop Science*. 187:1-9.
44. Ellis, R. J., P. Morgan, A. J. Weightman & J. C. Fry. 2003. Cultivation-dependent and –Independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(6):3223-3230.
45. Eo J. & T. Nakamoto. 2006. Evaluation of root effects on soil organisms under different fertilization regimes by comparing rhizosphere and interrow soil in a wheat field. *Plan Roots* 1:3-9.

46. Escalante, A., G. Gosset, A. Martínez & F. Bolívar. 2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*. 38:583-592.
47. Felske, A., A. Wolterink, R. Van Lis & A. D. L. Akkermans. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drenste A grassland soils (The Netherlands). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (3): 871-879
48. Fenton, C. D. 1994. The Isolation and Characterisation of Caulobacter Species from Manawatu Water Systems. Dept of Microbiology and Genetics, Massey University, Palmerston North, NEW ZEALAND.
49. Filion, M., Hamelin R.C., Bernier, L., & St-Arnaud M. 2004. Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(6):3541-3551.
50. Folman, L. B., J. Postma & J. A. Van Veen. 2001. Ecophysiological characterization of rhizosphere bacterial communities at different root locations and plant developmental stages of Cucumber grown on rockwool. *Microbial ecology*. 42:586-597.
51. Fracchia L., A. B. Dohrmann, M. G. Martinotti & C. C. Tebbe. 2006. Bacterial diversity in a finished compost and vermicompost: Differences revealed by cultivation-independent analyses of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:942-952.
52. Gama, E. 2006. Consolidando el sistema – producto papaya en México: Situación actual, acciones, retos y perspectivas comerciales. Tercer Encuentro Nacional de Papayeros. Veracruz.
53. Gamalero, E., G. Lingua, G. Berta & P. Lemanceau. 2003. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria *Agronomie*. 23:407-418.
54. Garbeva, P., J.A. van Veen & J.D. van Elsas. 2004. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review Phytopathology*. 42:243-270.
55. García, E. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. 4 edición. Instituto de Geografía, UNAM. México. 246p.
56. García M. A. & J. C. Escobar. 2002. Cultivo de Papaya. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). Técnica No. 5. 55p.
57. García M. A., H. Lieh & D. Chang. 2005. El cultivo de la papaya. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). El Salvador. 1-6p.

58. Germida, J.J., S. D. Siciliano, J. R. Freitas, A. M. Seib. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). *FEMS Microbiol Ecology*. 26:43–50.
59. Germida, J. J. & S. D. Siciliano. 2001. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of modern, recent and ancient wheat cultivars. *Biology and Fertility of Soils*. 33:410-415.
60. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41:109-117.
61. Gobat, J.M., Aragno, M., and Matthey, W. 2004. *The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Lausanne, Suisse: Science Publishers, Inc., USA.
62. Gomes N. C. M. H. Heuer, J. Schönfeld, R. Costa, L. Mendonça-Hagler & K. Smalla. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant and Soil*. 232:167-180.
63. Gray, T. R.G., 1990. Methods for studying the microbial ecology of soil. En: *Methods in Microbiology*. R. Grigorova & J. R. Norris. (Eds.), Academic Press Limited. Londres. Vol. 22:336-337.
64. Gray E. J., & D. L. Smith. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*. 37:395-412.
65. Grayston, S. J., D. Vaughan & D. Jones. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology*. 5: 29–56.
66. Grayston S.J., Wang S., Campbell C.D. y Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 30(3):369-378.
67. Green, S. J., E. Invar, F. C. Michel, Y. Hadar & D. Minz. Sucesión of bacterial communities during early plant development: transition from seed to root and effect of compost amendment. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(6):3975-3983
68. Guzman, G. 1998. Guía para el cultivo de papaya *Carica papaya* L. Serie cultivos no tradicionales. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica. 70 p.



69. Guzman-Guzman, M. L. 2007. Análisis de poblaciones bacterianas asociadas a rizósfera de frijol Yorimon (*Vigna unguiculata*) Tesis de Licenciatura. Instituto Tenológico de La Paz. México. 71pp.
70. Harichová, J., E. Karellová, K. Chovanová, T. Stojnev, M. Proksová, J. Brindza, D. Tóth, D. Pangallo & P. Ferianc. 2006. Comparison of culturable Gram-negative bacterial community structures in the rhizosphere of three fruit plants. *Biologia*, Bratislava. 61(6):6663-670.
71. Harris, W. F., D. Santantonio & D. McGinty. 1980. The dynamic belowground Ecosystem. En: *Forest: Fresh Perspectives from Ecosystem Analysis*. (R.H. Waring ed.) Oregon State University Press, Corvallis. 119-129p.
72. Heuer, H., M. Krsek, P. Baker, K. Smalla & E. M. Wellington. 1997. Analysis of Actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8):3233-3241.
73. Ho, L. C. 1988. Metabolism and compartmentation imported sugars in organs in strength of sink relation to sink. *Annual Review Plant Physiology*. 39:355-378
74. Höflich, G., M. Tauschke, G. Kühn & J. Rogasik. 2000. Influence of agricultural crops and fertilization on microbial activity and microorganisms in the rhizosphere. *Agronomy & Crop Science*. 184:49-54.
75. Hugenholtz, P., B. M. Goebel, † & Pace N. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 180(18): 4765-4774.
76. Hur, I. & J. Chun. 2004. A Method for comparing multiple bacterial community structures from 16S rDNA clone library sequences. *The Journal of Microbiology*. 42(1):9-13.
77. Hurd, R. G., Gay, A. P., & Mountifield, A. C. 1979. The effect of partial flower removal on the relation between root, shoot and fruit growth in the indeterminate tomato. *Annals of Applied Biology*. 93:77-89.
78. Insunza, V., S. Alström & B. Ericsson. 2002. Root bacteria from nematicidal plants and their biocontrol potential against trichodorid nematodes in potato. *Plant and Soil*. 241:271-278.
79. Jan, J. & S. Le Borgne. 2001. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. *Biotecnología*. 5(3):103-109.
80. Janssen, P.H., P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor & M. Sait. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel

- members of the divisions acidobacteria, actinobacteria, proteobacteria, and verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(5): 2391-2396.
81. Jindal, K. K. & R. N. Singh. 1975. Phenolic content in male and female *Carica papaya*: A possible physiological marker for sex identification of vegetative seedlings. *Physiology Plant*. 33:104-107.
  82. Johri B. N., A. Sharma & J. S. Viridi. 2003. Rhizobacterial Diversity in India and Its Influence on Soil and Plant Health. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 84:49-89.
  83. Kapulnik, Y & Okon Y. 2002. Plant roots: the hidden half, En: Waisel Y., Eshel A., Kafkafi U. (Eds.), Marcel Dekker, New York. 1120p.
  84. Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review Phytopathology*. 38: 423-441.
  85. Kirk, J., L. Beaudette., M. Hart., P. Moutoglis., J. Klironomos., H. Lee., J. Trevors. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58: 169 –188.
  86. Kowalchuk, G.A., D. S. Buma, W. de Boer, P. Klinkhamer & J. Van Veen. 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek*. 81:509-520.
  87. Kurze, S. & H. Bahl. 2001. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *The American Phytopathological Society*. 85(5):529-534.
  88. Lee, D. H., Y. G. Zo, & S. J. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(9):3112-3120.
  89. Lilley, A. K., J. C. Fry, M.J. Bailey & M. J. Day. 1996. Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). *FEMS Microbial Ecology*. 33:41-49.
  90. López de Victoria, G. & C. R. Novell. 1993. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2951-2953.
  91. Lucas García, J. A., A. Probanza, B. Ramos, M. L. Barrientos & F. J. Gutiérrez Mañero. 2000. Changes in the bacterial communities structure of the rhizosphere of four wild *Lipinus* species from flowering to fruiting. *Orsis*. 15: 7-25.

92. Lugtenberg, B. J. J. & L. C. Dekkers. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*. 1 (1):9-13.
93. Lugtenberg, B. J. J., L. Dekkers, & G. V. Bloemberg. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review Phytopathology* 39:461-490.
94. Lynch J. M. 1990. *The Rhizosphere*. Wiley- Interscience Publications. England. 458p.
95. Lynch, J.M., A. Benedetti, H. Insam, M.P. Nuti, K. Smalla, V. Torsvik & Nannipieri. 2004. Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganism. *Biology and Fertility Soils*. 40(6):363-385.
96. Macrae, A. 2000. The use of 16s rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31(2):77-82.
97. Mahaffee, W. F. & J. W. Kloepper. 1997. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza associated with field-grown Cucumber (*Cucumis sativus L.*). *Microbial Ecology*. 34: 210-223.
98. Malo S. E., C. W. Campbell. 1994. *The Papaya*. Institute of Food and Agriculture Science Extension Services. University of Florida. HS-11.
99. Marek-Kozaczuk, M. & A. Skorupska. 2001. Production of B-group vitamins by plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* strain 267 and the importance of vitamins in the colonization and nodulation of red clover. *Biology and Fertility of Soils*. 33(2):146-151.
100. Martinez, L., J. Caballero-Mellado, J. Orozco & E. Martinez-Romero. 2003. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa spp.*). *Plant and Soil*. 257:35-47.
101. Marschner, P. & D. E. Crowley. 1996. Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum L.*). *Soil Biology & Biochemistry*. 28(7):869-876.
102. Marschner, P., C.-H. Yang, R. Lieberei, & D. E. Crowley. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology & Biochemistry*. 33:1437-1445.
103. Marschner, P., D. Crowley & Yang C. H. 2004. Development of specific rhizosphere bacterial communities in relation to plant species, nutrition and soil type. *Plant and Soil*. 261: 199-208.

104. Marschner, P. & A. Rumberger. 2004. Rapid changes in the rhizosphere bacterial community structure during re-colonization of sterilized soil. *Biology and Fertility of Soils*. 40:1-6.
105. Marschner, P. & S. Timonen. 2005a. Interactions between plant species and mycorrhizal colonization on the bacterial community composition in the rhizosphere. *Applied Soil Ecology*. 28:23-36.
106. Marschner, P., P. F. Grierson, Z. Rengel. 2005b. Microbial community composition and functioning in the rhizosphere of three *Banksia* species in native woodland in Western Australia. *Applied Soil Ecology*. 28:191-201.
107. Mayak, S., T. Tirosch & B. R. Glick. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:565-572.
108. McSpadden B. B. & D. M. Weller. 2001. Changes in population of rhizosphere bacteria associated with take-all disease of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10):4414-4425.
109. Miethling R., G. Wieland, H. Backhaus & C. Tebbe. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microbial Ecology*. 41:43-56.
110. Miethling, R., K. Ahrends & C. C. Tebbe. 2003. Structural differences in the rhizosphere communities of legumes are not equally reflected in community-level physiological profiles. *Soil Biology & Biochemistry*. 35:1405-1410.
111. Miller, H. J., G. Henken & J. A. Van Veen. 1989. Variation and composition of bacteria populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. *Canadian Journal of Microbiology*. 35(6):656-660.
112. Mojica-Marín V., C. F. Sandoval & H. A. Luna. 2006. *Bacillus thuringiensis* como agente de control biológico de *Rhizoctonia solani* en Chile (*Capsicum Nahum* L.). En: Memorias de la Tercera Convención Mundial del Chile 2006.
113. Morales A. F., D. L. Medina, B. Dolores & Y. Camacho. 2004. Genetic diversity, phylogeny and geographic distribution of the genus *Vasconcella* in Southern Ecuador. *Lyonia*. 7(2):16-27.
114. Morgan J. A.W., G.D. Bending & P.J. White. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*. 56(417):1729-1739.
115. Moulin L., A. Munive, B. Dreyfus & C. Boivin-Masson. 2001. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature London*. 411: 948- 950.

116. Muyzer, G. 1999. Genetic fingerprinting of microbial communities – present status and future perspectives. *Methods of Microbial Community Analysis. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology.* Canada.
117. Nannipieri, P., J. Ascher, T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara & G. Renella. 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science.* 54:655-670.
118. Neumann G & V Römheld. 2002. Plant roots: the hidden half, En: Waisel Y., EshelA., Kafkafi U. (Eds.), Marcel Dekker, New York. 1120p.
119. Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie.* 23:375-396.
120. OECD. 2005. Consensus document on the biology of Papaya (*Carica papaya L.*). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. Paris. No. 33.
121. Ortega-Morales, B. O. , J. A. Narváez-Zapata, A. Schmalenberger, A. Sosa-López & C. C. Tebbe. Biofilms fouling ancient limestone Mayan monuments in Uxmal, Mexico: a cultivation-independent analysis. *Biofilms.* 1:1-12.
122. Øvreås L. & V. Torsvik. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbial Ecology.* 36:303-315.
123. Øvreås L. 2000. Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters.* 3:236-251.
124. Pace, N. 1996. New perspective on the natural microbial world: Molecular microbial ecology. *Features.* 62(9):463-470.
125. Página del Gobierno de Baja California Sur, 2004. <http://www.gbcs.gob.mx/> [consultada 16-05-2005].
126. Park, M. S., S. R. Jung, M. S. Lee, K. O. Kim, J. O. Do, K. H. Lee, S. B. Kim & K. S. Bae. 2005. Isolation and characterization of bacteria associated with two sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *The Journal of Microbiology.* 43(3):219-227.

127. Parke, J. & D. Gurian-Sherman. 2001. Diversity of the *burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. *Annual Review Phytopathology*. 39:225-58.
128. Pereira, J. C., M.C. Nieves, & A. Drozdowicz. 1999a. Dinâmica das populações bacterianas em solos de Cerrados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 34: 801-811.
129. Pereira, J. C., M.C. Nieves, & A. Drozdowicz. 1999b. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília. 34: 99-108.
130. Pereira, J. C. 2000. Interações entre as Populações de Actinomicetos e outros Organismos na Rizosfera. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, dez. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118). 15p.
131. Ping L. & W. Boland. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science*. 9(6):263-266.
132. Philippot, L., S. Piutti, F. Martin-Laurent, S. Hallet & J. C. Germon. 2002. Molecular Analysis of the Nitrate-Reducing Community from Unplanted and Maize-Planted Soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(12):6121-6128.
133. Poghosyan A. V., V. K. Lebsky, M. Arce-Montoya & L. Landa. 2004. Possible Phytoplasma Disease in Papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: Diagnosis by Scanning Electron Microscopy. *Journal of Phytopathology*. 152:376-380.
134. Pressman, E., A. Bar-Tal., R. Shaked & K. Rosenfeld. 1997. The Development of Tomato Root System in Relation to the Carbohydrate Status of the Whole Plant. *Annals of Botany*. 80: 533-538.
135. Quimía, R. 2002. Desarrollo de una tecnología integral para el cultivo de la papaya. *Tecnología Internacional Aplicada*. México. 88p.
136. Ramette A., M. Frapolli, G. Défago & Y. Moëne-Loccoz. 2003. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16 (6): 525-535.
137. Ramos, B., J. A. García, A. Probanza, M. L. Barrientos & F. J. Gutiérrez Mañero. 2003. Alterations in the rizobacterial community associated with european alder growth when inoculated with PGPR strain *Bacillus licheniformis*. *Environmental and Experimental Botany*. 49 (1):61-68.

138. Rangarajan, S., P. Loganathan, L. M. Saleena & S. Fair. 2001. Diversity of *Pseudomonas* isolated from three different plant rhizospheres. *Journal of Applied Microbiology*. 91:742-749.
139. Rangarajan, S., L. M. Saleena & S. Nair. 2002. Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from rice rizosphere populations grown along a salinity gradient. *Microbial Ecology*. 43:280-289.
140. Ream, W. 1989. *Agrobacterium tumefaciens* and interkingdom genetic exchange. *Annual Review Phytopathology*. 27:583-618
141. Renwick, A., R. Campbell & S. Coe. 1991. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40 (4), 524–532.
142. Ridder-Duine, A., G. Kowalchuk., J.A. Paulien., K. Gunnewiek., W. Smant., J. van Veen., W. Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 349-357
143. Roman, C. 1996. Limitaciones y ventajas de los suelos de los llanos orientales para el establecimiento de frutales. *Revista: De la sociedad colombiana de la ciencia del suelo*. 26-1: 54-67 p.
144. Ruíz-Palomino, M., J. A. Lucas-García, B. Ramos, F. J. Gutierrez-Mañero & A. Probanza. 2005. Seasonal diversity changes in alder (*Alnus glutinosa*) culturable rhizobacterial communities throughout a phenological cycle. *Applied Soil Ecology*. 29:215-224.
145. SAGARPA, 2007. Reporte de producción de papaya. En: [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx)
146. Salazar, C. R. 1998. Aspectos que se deben considerar en la fertilización del papayo. En: *Memorias del tercer curso nacional de frutales de clima cálido*. Centro Nacional de Investigación Palmira. Colombia. 111-118 p.
147. Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
148. Sanguin, H., B. Remenant, A. Dechesne, J. Thioulouse, T. M. Vogel, X. Nesme, Y. Moënne-Loccoz & G. L. Grundmann. 2006. Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6):4302-4312.
149. Schmalenberger, A., F. Schwieger & C. Tebbe. 2001. Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit

- rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(8):3557-3563.
150. Schmalenberger, A. y C. Tebbe. 2003. Bacterial diversity in maize rhizospheres: conclusions on the use of genetic profiles based on PCR-amplified partial small subunit rRNA genes in ecological studies. *Molecular Ecology*. 12: 251-262.
  151. Schwieger, F., & C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 64 (12): 4870-4876.
  152. Seldin, L., A. S. Rosado, D. W. da Cruz, A. Nobrega, J. D. van Elsas. & E. Paiva. 1998. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere, and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10):3860-3868.
  153. Sharma S. M., K. Aneja, J. Mayer, J. C. Munich & M. Schloter. 2005. Characterization of bacterial community structure in rhizosphere soil of grain legumes. *Microbial Ecology*. 49:407-415.
  154. Singh G. & K. G. Mukerji. 2006. *Soil Biology: Microbial activity in the rhizosphere*. En: K. G. Mukerji, C. Manoharachary & J. Singh (Eds.), Springer Verlag, Berlin. 349p.
  155. Smalla, K., G. Wieland, A. Buchner, A. Zock, J. Parzy, S. Kaiser, N. Roskot, H. Heuer, & G. Berg. 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(10): 4742-4751.
  156. Smith, K. & R. M. Goodman. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review Phytopathology*. 37:473-491.
  157. Sorensen J., L. E. Jensen & O. Nybroe. 2001. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single cell studies. *Plant and Soil*. 232:97-108.
  158. Steenhoudt, O., J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24(4):487-50.
  159. Strömp, C., G. L. Hold, H. Lünsdorf, J. Graham, S. Gallacher, W. Abraham, E. Moore & K. N. Timmis. 2003. *Oceanicaulis alexandrii* gen. nov.,



- sp. nov., a novel stalked bacterium isolated from a culture of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* . 53: 1901–1906.
160. Sunnucks, P., A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French y A.C. Taylor. 2000. SSCP is not so difficult: application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*. 9: 1699 – 1710.
161. Suzuki C., T. Kunito, T. Aono, C. -T. Liu & H. Oyaizu. 2005. Microbial indices of soil fertility. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1062-1074.
162. Talon, M. 1993. Giberelinas. En: *Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcon-Bieto & M. Talon (Eds). McGraw-Hill. 301-318p.
163. Tamaki, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura & Y. Kamagata. 2005. Comparative Analysis of Bacterial Diversity in Freshwater Sediment of a Shallow Eutrophic Lake by Molecular and Improved Cultivation-Based Techniques. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(4): 2162-2169.
164. Tebbe, C., A. Schmalenberger, S. Peters y F. Scheieger. 2001. Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for microbial community analysis. *Environmental Molecular Microbiology : Protocols and Applications*. Horizont Scientific Press. UK. 161- 175 p.
165. Tilak, K. V. B. R., N. Ranganayaki, K.K. Pal, R. De, A. K. Saxena, C. Shekhar Nautiyal, S. Mittal, A. k. Tripathi & B. N. Johri. 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*. 89(1):136-150.
166. Tiquia, S.M., J. Lloyd, D.A. Herms, H.A.J. Hoitink & Jr. F Michel. 2002. Effects of mulching and fertilization on soil nutrients, microbial activity and rhizosphere bacterial community structure determined by analysis of TRFLPs of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied Soil Ecology*. 21:31-48.
167. Torsvik, V., J. Goksoyr, & F. L. Daae. 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 56:782–787.
168. Van Loon L. C., P.A. H. Bakker & M. J. Pieterse. 1998. Systemic Resistance Induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 36: 453-483.
169. Vance, C. 2002. Plant roots: the hidden half, En: Waisel Y., EshelA., Kafkafi U. (Eds.), Marcel Dekker, New York. 1120p.

170. Weiskopf, L., N. Fromin, N. Tomasi, M. Arango & E. Martinoia. 2005. Secretion activity of white lupin's cluster roots influences bacterial abundance, function and community structure. *Plant and Soil*. 268:181-194.
171. Wieland G., R. Neumann & H. Backhaus. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(12):5849-5854.
172. Williams, S. T., S. Lanning & E. M. H. Wellington. 1983. Ecology of Actinomycetes. En: Goodfellow, M., M. Mordarski., S. T. Williams (eds) *The Biology of the Actinomycetes*. Academic Press Inc. (London). 544p.
173. Wipat, A., C. R. Harwood. 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbial Ecology*. 28: 1–9.
174. Wolstenholme, B. N. 1990. Resource allocation and vegetative-reproductive competition: opportunities for manipulation in evergreen fruit trees. *Acta Horticulturae*. 275: 451-459.
175. Yang, C. H. & D. E. Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(1):345-351.
176. Zhou, J., B. H. Xia, A. Huang, V. Palumbo, & J. M. Tiedje. 2004. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3):1723-1734.