

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de bacterias
fijadoras de nitrógeno en trébol (*Trifolium* spp.)**

Lady Eliana Coral Salazar

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de bacterias fijadoras
de nitrógeno en trébol (*Trifolium* spp.)**

Lady Eliana Coral Salazar

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León-Reyes, PhD

Quito, 20 de diciembre de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Lady Eliana Coral Salazar

Código: 00213406

Cédula de identidad: 1728087154

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El nitrógeno es un elemento limitante para el desarrollo de los seres vivos, ya que es uno de los componentes principales de biomoléculas como las proteínas, ácidos nucleicos, y también de la clorofila. Se encuentra abundantemente en la naturaleza, como nitrógeno molecular (N_2) en la atmósfera. Sin embargo, esta forma de N_2 no puede ser asimilada directamente por las plantas, pero puede ser reducida en formas disponibles mediante la fijación biológica del nitrógeno. Dada su importancia en el sistema agroalimentario mundial, se producen más de 100 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados sintéticos al año, pero su uso no es sostenible. En cambio, la fijación biológica del nitrógeno puede generar hasta 100 millones de toneladas de $N/año$. Por lo tanto, en el presente estudio se pretende caracterizar cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de nódulos de raíces de trébol (*Trifolium* spp.) mediante bioensayos, y el uso de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Dentro de los resultados, se destaca que se lograron aislar cuatro cepas, las cuales re infectaron e indujeron nodulación en raíces de trébol, con un mayor porcentaje en tierra de origen no autoclavada. También, se caracterizaron bioquímicamente como Gram negativas, y oxidasa y catalasa positivas, y molecularmente como *Bacillus* sp. y *Arthrobacter* sp, gracias a la secuenciación del gen ARNr 16S. Dado esto, ambas bacterias se pueden considerar para producir biofertilizantes útiles para promover el rendimiento y desarrollo sostenible de cultivos agrícolas asociados al trébol.

Palabras clave: Nitrógeno, trébol, nódulos, bacterias noduladoras, fijación biológica del nitrógeno, pruebas bioquímicas, pruebas moleculares, gen ARNr 16S.

ABSTRACT

Nitrogen is a limiting element for the development of living organisms, since it is one of the main components of biomolecules such as proteins, nucleic acids, and chlorophyll. It is found abundantly in nature, as molecular nitrogen (N₂) in the atmosphere. However, this form of N₂ cannot be assimilated directly by plants but can be reduced into available forms by biological nitrogen fixation. Given its importance in the global agri-food system, more than 100 million tons of synthetic nitrogen fertilizers are produced annually, but their use is not sustainable. In contrast, biological nitrogen fixation can generate up to 100 million tons of N/year. Therefore, the present study aims to characterize strains of nitrogen-fixing bacteria isolated from clover (*Trifolium* spp.) root nodules by bioassays, biochemical tests, and molecular techniques. Among the results, it is highlighted that four strains were isolated, which reinfected and induced nodulation in clover roots, with a higher incidence in non-autoclaved soil. Also, they were characterized biochemically as Gram negative, oxidase positive and catalase positive, and molecularly as *Bacillus* sp. and *Arthrobacter* sp., by sequencing of the 16S rRNA gene. Given this, both bacteria can be considered to produce useful biofertilizers to promote yield and sustainable development of clover-associated agricultural crops.

Key words: Nitrogen, clover, nodules, nodulating bacteria, biological nitrogen fixation, biochemical tests, molecular tests, 16S rRNA gene.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	10
MÉTODOS	14
Aislamiento	14
Ensayos de inoculación en semilla	14
Arquitectura de la raíz.....	15
Pruebas bioquímicas	15
Pruebas moleculares	16
RESULTADOS.....	17
Aislamiento	17
Ensayos de inoculación en semilla	17
Arquitectura de la raíz.....	18
Pruebas bioquímicas	18
Pruebas moleculares	18
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES	23
TABLAS.....	24
FIGURAS.....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de datos de la arquitectura de las raíces de trébol en SmartRoot.....	24
Tabla 2. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas.	24
Tabla 3. Identificación de las cepas aisladas a partir de las secuencias del gen ARNr 16S. ..	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de parámetros en ensayos de inoculación en semilla en turba y perlita.	26
Figura 2. Evaluación de parámetros en ensayos de inoculación en semilla en tierra de origen.	27

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cepas bacterianas aisladas a partir de nódulos de raíces de trébol	33
Anexo 2: Productos PCR del gen ARNr 16S de las cepas aisladas a partir de nódulos de raíces de trébol	34
Anexo 3: Ensayos de inoculación en semilla de las cepas aisladas a partir de nódulos de raíces de trébol.....	35
Anexo 4: Imágenes de la arquitectura de la raíz de trébol obtenidas a partir de Smartroot....	36

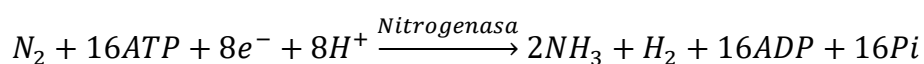
INTRODUCCIÓN

El sistema agroalimentario mundial depende de la fertilización nitrogenada sintética para aumentar el rendimiento de los cultivos, pero su uso no es sostenible ya que la fabricación requiere una cantidad abundante de energía (1-2% del suministro mundial), y junto con el transporte y su uso en el campo, es responsable de emisiones estimadas de 1.13GtCO₂, lo que representa el 10.6% de las emisiones agrícolas y el 2.1% de las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero (Menegat, Ledo, y Tirado, 2022; Wagner, 2011; Pankiewicz, Irving, Maia y Ané, 2019). Además, según un informe de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) la producción de fertilizantes nitrogenados en 2021 fue de 109 millones de toneladas de N y sigue regularmente en aumento (FAO, 2023). Lo cual indica un uso excesivo de los fertilizantes nitrogenados, quienes tienden a alterar el ciclo del N, contribuyendo a la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, provocando la eutrofización de los ríos, causando cambios masivos en la comunidad de la microbiota acuática continental y costera (Wagner, 2011; Pankiewicz et al., 2019). Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno puede generar hasta 100 millones de toneladas de N/año para ecosistemas terrestres, lo cual indica que se puede aplicar en cultivos agrícolas importantes para reducir la producción y uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Frache, Lindström y Elmerich, 2009), y por lo tanto, minimizar las emisiones de gases de efecto invernadero y promover el objetivo climático para mantener el calentamiento global dentro de los 1.5°C de los niveles preindustriales (Menegat et al., 2022).

La demanda del nitrógeno es alta debido a que es un elemento limitante crítico para el crecimiento óptimo de las plantas en la producción agrícola, puesto que es uno de los principales componentes de la clorofila, pigmento necesario para realizar la fotosíntesis, así como de los aminoácidos, componentes básicos de las proteínas, y otras biomoléculas importantes como el ATP y ácidos nucleicos (Wagner, 2011; Mahmud, Makaju, Ibrahim y

Missaoui, 2020). Aunque es uno de los elementos más abundantes, la principal reserva de nitrógeno en la biósfera es el nitrógeno molecular (N_2) que se encuentra en la atmósfera (Franche et al., 2009). Sin embargo, dicho N_2 no puede ser asimilado directamente por las plantas ya que no poseen las enzimas necesarias para convertirlo en formas biológicamente útiles, pero puede fijarse en formas reducidas disponibles para las plantas, las cuales se adquieren mediante: la adición de fertilizantes nitrogenados en forma de compuestos inorgánicos como los nitratos y amonio, la liberación de estos compuestos durante la descomposición de la materia orgánica, la conversión del N_2 en los compuestos por procesos naturales, como los rayos, y la fijación biológica de N_2 (Mahmud et al., 2020; Franche et al., 2009).

La fijación biológica del N_2 es un proceso complejo que requiere de un gran aporte de energía para llevarse a cabo ya que dicha molécula está compuesta por dos átomos de nitrógeno que se encuentran unidos por un triple enlace covalente, haciendo que esta molécula sea inerte y no reactiva. Por lo tanto, en la interacción planta-bacteria, los microorganismos necesitan 16 moles de ATP para reducir cada mol de N_2 mediante el uso de la enzima nitrogenasa, sintetizada a partir de genes *nif*, que cataliza la ruptura de este enlace y adiciona tres átomos de hidrógeno a cada átomo de nitrógeno, generando amoníaco (NH_3), como se muestra en la siguiente ecuación:



Los microorganismos fijadores de nitrógeno obtienen el ATP de la rizosfera de sus plantas huésped y el NH_3 formado puede ser convertido en amonio y nitrato, los cuales pueden ser asimilados fácilmente por las plantas para producir las biomoléculas antes mencionadas (Pankievicz et al., 2019; Franche et al., 2009; Bhattacharjee, Singh y Mukhopadhyay, 2008).

Muchas especies de plantas leguminosas pueden entrar en una relación simbiótica con bacterias fijadoras de N₂ noduladoras, como los rizobios. Por ejemplo, el trébol (*Trifolium* spp.), es una especie que pertenece a la familia Fabaceae, está adaptado como un cultivo forrajero en todo el mundo y se puede combinar con otras gramíneas en varios cultivos agrícolas, resultando en una mezcla beneficiosa, ya que el N₂ fijado simbióticamente genera un rendimiento anual de 300kg de N/ha y el otro cultivo puede utilizar hasta el 80% del N₂ fijado (Oberson et al., 2013). El proceso simbiótico con bacterias fijadoras de N₂ implica un intercambio de señales químicas entre ambos organismos, lo cual da lugar a la expresión de genes bacterianos y vegetales específicos. Es decir, en respuesta a la secreción de flavonoides de la leguminosa, se sintetizan lipo-quitina-oligosacáridos bacterianos (factores Nod) que, en simultáneo, desencadenan la expresión de genes vegetales y la formación de nódulos radiculares, las bacterias invaden los nódulos radiculares y se diferencian en bacteroides que fijan el nitrógeno. Es importante recalcar que la gama de beneficios para la planta varía de acuerdo con la eficacia de las cepas bacterianas y del genotipo de la planta leguminosa (Wielbo, Marek-Kozaczuk, Mazur, Kubik-Komar, Skorupska, 2010). Por otro lado, en plantas no leguminosas, la población bacteriana fijadora de nitrógeno endófito, se puede utilizar como una fuente eficaz de nitrógeno que puede sustituir fertilizantes nitrogenados en varios cultivos como el arroz y otros cereales ya que son provistos directamente de elementos nutricionales por el huésped, lo cual optimiza la actividad de la nitrogenasa, beneficiando el crecimiento y desarrollo de la planta mediante la fijación biológica del N₂ y sustancias promotoras del crecimiento (Bhattacharjee et al., 2008).

Hasta ahora se conocen tres modos de entrada de los microorganismos fijadores de N₂ en las raíces: a través de heridas, especialmente donde sobresalen raíces laterales o adventicias, mediante pelos radiculares, y entre células epidérmicas no dañadas. Subsecuentemente, la propagación de endófitos puede ser a través de espacios intercelulares o traspasando paredes celulares, y cuando las bacterias son confinadas por las paredes celulares del huésped, forman

redes de infección. Los pelos radiculares que se desarrollan como extensiones de las células epidérmicas de la raíz, cerca del ápice radicular están ampliamente colonizados por microorganismos del suelo, incluyendo bacterias noduladoras que fijan nitrógeno, por ejemplo, los rizobios segregan factores Nod que pueden estimular la reorientación del crecimiento de la pared celular de los pelos radiculares, dando lugar a pelos radiculares rizados, dentro de estos, los factores Nod promueven la formación de redes de infección, y es a través de estas estructuras tubulares por donde los rizobios entran en la mayoría de las leguminosas para formar nódulos (Cocking, 2003; Pankievicz et al., 2019).

En los últimos años se ha demostrado que la fijación biológica de nitrógeno es una propiedad que la lleva a cabo un grupo especializado de procariontes, también llamados diazótrofos que pueden ser de vida libre o existir en asociaciones simbióticas en la rizosfera de vegetales, con ejemplos que incluyen a los filos: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes y Cyanobacterias (Mahmud et al., 2020). Para una simbiosis exitosa, estos microorganismos requieren un huésped y condiciones ambientales que permitan la fijación de nitrógeno, por ejemplo, la adición de recursos como agua, P, CO₂ o luz a un ecosistema donde el crecimiento y la acumulación de biomasa están limitados por ese recurso puede inducir una demanda de nitrógeno, porque en ausencia de fertilización nitrogenada, el nitrógeno raramente está disponible en gran exceso por encima del suministro de otros recursos (Pankievicz et al., 2019; Vitousek, Menge, Reed y Cleveland, 2013).

Dado lo anterior, las bacterias fijadoras de nitrógeno se pueden aislar a partir de nódulos radiculares, y se pueden identificar por medio de herramientas biotecnológicas. Por lo tanto, en el presente estudio se pretende aislar cepas de bacterias fijadoras de nitrógeno de nódulos de raíces de trébol (*Trifolium* spp.) mediante el uso de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares comunes, tales como la extracción de ADN, amplificación mediante PCR y secuenciación para identificar las cepas obtenidas.

MÉTODOS

Aislamiento

Para el aislamiento de las bacterias a partir de los nódulos de las raíces del trébol, se siguió el protocolo sugerido por Prévost y Antoun (2006). Donde, la muestra de suelo con raíces de trébol se recolectó en un terreno baldío de Cumbayá (Quito, Ecuador). Por otra parte, las placas obtenidas para el aislamiento de las bacterias se incubaron en oscuridad a 25°C por 2 d en medio YEM con Rojo Congo, el cual se compone de: extracto de levadura (1.00 g/L), manitol (10.00 g/L), fosfato dipotásico (0.50 g/L), sulfato de magnesio (0.20 g/L), cloruro de sodio (0.10 g/L), Rojo Congo (0.025 g/L) y agar (20 g/L), y un pH ajustado a 7.00. Posterior a esto, se subcultivaron colonias aisladas mediante la técnica del estriado hasta obtener aislados puros.

Ensayos de inoculación en semilla

En primer lugar, se preparó medio YEM líquido y se colocaron 50 mL en matraces de 100 mL, los cuales se autoclavarón. Después, se inocularon 4 colonias individuales de cada cepa aislada en cada matraz y se incubaron en agitación a 25°C por 1 d. Posteriormente, se verificó la concentración de las bacterias en la solución con ayuda de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 600 nm (Singh et al., 2013). Seguido, se reguló la concentración de cada cepa hasta obtener 1×10^7 células/mL con Hoagland sin nitrógeno (solución líquida sin nitrógeno). Dicha solución se compone de: cloruro de calcio monohidratado (1 mL/L), sulfato de magnesio heptahidratado (2 mL/L), fosfato monopotásico (1 mL/L), fosfato dipotásico (1 mL/L), hierro EDTA (1 mL/L), y minors (1 mL/L), ajustado a un pH igual a 5.6. A continuación, se colocaron varias semillas de trébol en cada matraz con las cepas aisladas y en un matraz que solamente contenía Hoagland sin N para que actúe como un control, y se incubaron en agitación a 25°C por al menos 30 minutos. Dichas semillas se cultivaron en 4 semilleros con pocillos de 31 mL, dos de los cuales contenían sustrato compuesto de 80% turba y 20% de perlita (T+P), mientras que los otros dos contenían tierra del lugar a partir del cual se obtuvo la primera muestra del

suelo que poseía raíces de trébol para realizar el aislamiento (tierra de origen). En una de las primeras dos bandejas se colocó T+P autoclavada por 1 h a 1 atm y en la otra se colocó T+P sin autoclavar, mientras que en una de las últimas bandejas se colocó tierra de origen autoclavada por 1 h a 1 atm y en la otra tierra de origen sin autoclavar. Se cultivaron 25 semillas por cada cepa aislada y control en cada semillero, los cuales fueron colocados en cámara húmeda bajo invernadero y con 16 h de luz. Los semilleros con ambos sustratos, es decir, T+P y tierra de origen arrancaron al mismo tiempo y las plantas fueron cosechadas después de 40 días. Cada planta se sacó del pocillo con cuidado de no arrancar las raíces y se lavaron con abundante agua. Seguido, se midió la longitud de las raíces con una regla y se contaron los nódulos con ayuda de un estereomicroscopio. De los datos recogidos, se hizo la prueba estadística de medias Mann-Whitney (Confianza: 95%) en el programa Prism de GraphPad.

Arquitectura de la raíz

Se realizó un estudio preliminar de la arquitectura de las raíces del trébol cosechado con ayuda del software SmartRoot 4.1, para lo cual se tomaron varias fotos de raíces que correspondían con cada cepa y control en un fondo negro. Luego, se procesaron las imágenes obtenidas siguiendo el protocolo sugerido por Draye y Guillaume (2014), y se recolectaron los datos.

Pruebas bioquímicas

De cada cepa aislada, se realizó la prueba de la catalasa, donde, en una placa portaobjetos se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (30%), luego, se recogió una colonia aislada con un palillo estéril, se hizo contacto con la gota de peróxido de hidrógeno y se observó la presencia o ausencia de burbujas (Reiner, 2010). En segundo lugar, se hizo la prueba de la oxidasa, para lo cual, se tomó con un palillo estéril una colonia aislada y se colocó sobre un disco de oxidasa (Bioanalyse®), se esperó 2 min y se observó si hubo cambio de coloración a azul o amarillo. Por último, se hizo una tinción Gram, aquí, se colocó una gota de solución salina estéril en una placa portaobjetos, después, con un palillo estéril se esparció una colonia aislada sobre la

solución salina y se esperó hasta que la placa quedó completamente seca. Seguido, se colocó cristal violeta sobre la placa fijada durante 60 s, lugol durante 45 s, metanol durante 15 s y safranina durante 45 s (Tripathi y Sapra, 2021). Finalmente, se secaron las placas con las distintas cepas aisladas y se observaron en el microscopio (Euromex) con un aumento de 100X.

Pruebas moleculares

Para la extracción de ADN de las cepas bacterianas aisladas, se utilizó el kit DNeasy® Power Soil® Pro Kit (250) de QIAGEN. Posteriormente, se realizó una amplificación mediante la técnica PCR del gen ARNr 16S, donde se utilizó el Primer 27 Forward AGAGTTTGATCCTG GCTCAG (Lane, 1991) y un Primer 1492 Reverse CTACGGCTACCTTGTTACGA (Turner et al, 1999), las mezclas de reacción (25 µL) contenían: agua PCR, 1X de buffer, 10mg/µL de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 10pM de cada primer, 1U de Taq polimerasa y 50 ng/µL de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Multigene) siguiendo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 35 ciclos consistentes en desnaturalización a 94°C por 45 s, hibridación a 59°C por 50 s y extensión a 72°C por 1 min, y un paso final de extensión a 72°C durante 5 min. Los productos de la PCR se almacenaron a 4°C. A continuación, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con 60 mL de TAE (1X), se prepararon alícuotas con 3 µL de cada producto, 3 µL de Sybr safe (Invitrogen) y 2 µL de buffer de carga (Invitrogen), se utilizó como referencia un Ladder de ADN de 100 pb (Invitrogen), y se corrió el gel a 100V durante 30 min. Finalmente, se observaron los resultados bajo luz UV y se tomó una foto del gel. Los productos PCR se liofilizaron y se enviaron a secuenciar en Macrogen (Korea) con el método Sanger. Se obtuvo la secuencia consenso del gen ARNr 16S con ayuda de los softwares de ensamblaje de secuencias de ADN Pregap4 y Gap4 del paquete Staden. Por último, las secuencias curadas se analizaron mediante BLAST (NCBI), donde se hizo una comparación de las secuencias obtenidas con las bases de datos y se logró identificar el género al cual pertenecían las cepas aisladas.

RESULTADOS

Aislamiento

Se obtuvieron 4 aislados puros, los cuales se identificaron como: R1, R2, R3 y R4 (ver Anexo 1). Dichas cepas candidatas como posibles desarrolladoras de nódulos y fijadoras de N₂ se distinguieron de otros contaminantes bacterianos ya que se hicieron cultivos en placas con el medio selectivo y diferencial YEM con Rojo Congo de la superficie de los nódulos. Estas placas se compararon con las placas hechas a partir de los nódulos triturados, si las colonias se parecían, se desechaban, y si no eran similares, se conservaban para generar cultivos puros. Asimismo, al incorporar el Rojo Congo en el medio, las cepas candidatas incubadas en oscuridad, mostraron poca absorción de este compuesto, generando colonias opacas y rosadas (Prévost y Antoun, 2006).

Ensayos de inoculación en semilla

A partir de los ensayos realizados en turba y perlita, se encontró un mayor porcentaje de plantas con nódulos en el sustrato no autoclavado (Figura 1a). En cuanto al número de nódulos, en sustrato no autoclavado, solo la cepa R3 y R4 tuvieron una diferencia significativa con respecto al control, mientras que en el sustrato autoclavado, la cepa R2, R3 y R4 tuvieron una diferencia significativa con respecto al control (Figura 1b). Con relación a la longitud de la raíz, no hubo diferencias significativas entre cada cepa y el control (Figura 1c). En cambio, en los ensayos con tierra de origen se observó que la tierra autoclavada y no autoclavada no presentaron diferencia significativa entre la cantidad de plantas con nódulos (Figura 2a). Sin embargo, se observó que existe una diferencia significativa en el número de nódulos generados tras la inoculación de las cepas con respecto al control, donde la tierra no autoclavada presentó un mayor número de nódulos (Figura 2b). E igual que en el anterior sustrato, no hubo diferencia significativa para la longitud de la raíz en tierra autoclavada y no autoclavada (Figura 2c).

Arquitectura de la raíz

Con el programa SmartRoot, el cual es un software semiautomatizado de análisis de imágenes que agiliza la cuantificación del crecimiento y arquitectura de sistemas radiculares complejos (Draye y Guillaume, 2014), se verificó, como se indica en la Tabla 1, la longitud de la raíz, donde se presentan datos similares entre los resultados que se obtuvieron manualmente y los dados por el software, lo cual indica que puede servir para estandarizar el protocolo de uso del software para futuros trabajos. Asimismo, se obtuvieron datos como el área radicular, y el número de raíces principales y secundarias, los cuales no variaron mucho entre cada cepa.

Pruebas bioquímicas

Una vez visto que las cepas aisladas promovían la nodulación en plantas de trébol, se hizo una caracterización bioquímica. Mediante las pruebas que se realizaron, como se muestra en la Tabla 2, se encontró que todas eran Gram negativas, oxidasa positivas y catalasa positivas, y que tenían forma bacilar.

Pruebas moleculares

Asimismo, se hizo una caracterización molecular, donde, a partir de la amplificación del gen ARNr 16S de las cepas aisladas en este estudio, se obtuvo como resultado una banda única con un tamaño de aproximadamente 1500 pb para cada cepa (ver Anexo 2). Después de la secuenciación, una vez curadas las secuencias, se hizo un análisis de comparación, mediante BLAST, de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas aisladas con la base de datos del NCBI (Tabla 3), y se encontró que las cepas R1, R2 y R3 pertenecen al género *Bacillus* sp., mientras que, la cepa R4 pertenece al género *Arthrobacter* sp.

DISCUSIÓN

En este estudio se utilizaron diferentes métodos de laboratorio para identificar bacterias que promueven el desarrollo de nódulos y fijan nitrógeno, las cuales se aislaron a partir de nódulos de la raíz de trébol. En la figura 1 se observa la obtención de 4 aislados bacterianos, los cuales se escogieron debido a la diferencia encontrada con colonias bacterianas de cultivos hechos a partir de la superficie del nódulo y la coloración debida al Rojo Congo (Prévost y Antoun, 2006). Dichas bacterias endofíticas se sometieron a pruebas de nodulación y se comprobó que podían ser capaces de reinfectar la raíz de la planta de trébol, puesto que en todos los sustratos hubo un porcentaje alto de plantas, inoculadas con las cepas bacterianas, que poseían nódulos, como se muestra en la figura 2a y 3a. Estos resultados se refuerzan puesto que se ha reportado la presencia de endófitos no rizobianos en nódulos radiculares de leguminosas como el fréjol y garbanzo, los cuales, dentro del nódulo, establecen una interacción sinérgica con los rizobios que promueven el crecimiento de la planta (Zhao et al., 2011; Bansal, 2009; Hameed et al., 2004; Taurian, Ibanez, Angelini, Tonelli y Fabra, 2012). Además, la literatura indica que la interacción cooperativa entre los rizobios y otras bacterias fijadoras de nitrógeno que colonizan las raíces de las plantas desempeñan un papel en la mejora de la nodulación y fijación de N_2 en leguminosas (Barea, Pozo, Azcon y Azcón-Aguilar, 2005). Por ejemplo, cuando los rizobios se inoculan con *Bacillus* spp. en guandú, mejora el crecimiento e incrementa la nodulación de las raíces (Geetha, Falguni, Anjana y Archana, 2008).

Existen diversos factores bióticos y abióticos a considerar que determinan la estructura y actividad biológica de la población bacteriana del suelo, tales como el tipo y la composición física del suelo, el contenido de materia orgánica, prácticas de manejo y laboreo, así como las actividades de las plantas. Dichos factores contribuyen en la complejidad nutricional de la rizosfera e influyen en la actividad de la población microbiana (Wielbo et al., 2010). Dentro de la población bacteriana, se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que

son un grupo de bacterias del suelo que promueven el desarrollo óptimo de plantas mediante interacciones positivas con las raíces, endofíticamente o formando parte de la rizosfera (Tariq, Hameed, Yasmeen, Zahid y Zafar, 2013). Dichas bacterias endofíticas se encuentran en el interior del tejido vegetal y pueden aislarse de tales tejidos esterilizando su superficie (Garbeva, Overbeek y Vuurde, 2001). Por otra parte, los nódulos radiculares de las leguminosas pueden albergar un gran número de bacterias promotoras del crecimiento vegetal junto con los rizobios (Mishra et al., 2009). Dicha presencia de bacterias distintas a los rizobios en los nódulos radiculares se describió a principios de 1900 en una planta de trébol (Hameed, Yasmin, Malik, Zafar y Hafeez, 2004).

Asimismo, se evidenció una diferencia significativa entre el número de nódulos entre las plantas inoculadas con las cepas bacterianas aisladas y los controles como se muestra en la figura 2b y 3b, siendo la tierra de origen no autoclavada donde las plantas de trébol contenían una mayor proporción de nódulos en sus raíces. Esto también se ha evidenciado en trabajos similares donde el parámetro de porcentaje de nódulos radiculares mostró que la aplicación de un biofertilizante a base de *Bacillus cereus* incrementó el porcentaje de nódulos radiculares en soya, esto se debe presumiblemente a que la formulación del biofertilizante aplicado en el suelo es capaz de ayudar en el proceso de formación de nódulos radiculares de las plantas. Aunque, también se cree que esto se debe a la hormona IAA (ácido indol-3-acético) producida por varias especies del género *Bacillus*, como *B. cereus*, que apoya el crecimiento de nódulos radiculares (Hapsoh, Dini, Wawan y Wulandari, 2022), y porque dicha hormona fomenta la producción de más raíces laterales, pelos radiculares y ramificaciones de pelos radiculares (Kholida y Zulaika, 2016).

Sin embargo, en el presente trabajo no se encontraron diferencias entre la longitud de la raíz, área radicular y número de raíces entre plantas inoculadas con las bacterias aisladas y el control como se muestra en la tabla 1, lo cual contrasta con la literatura que indica que las bacterias no rizobianas aumentan la nodulación en leguminosas al incrementar la longitud y masa de las

raíces, lo que conduce a más sitios activos para la nodulación, mejora la absorción de nutrientes y, por tanto, el crecimiento de los brotes de los cultivos, esto debido, nuevamente, a que la IAA también interviene en varias fases de las asociaciones simbióticas, puede funcionar como molécula señal en las asociaciones planta-bacteria, en la comunicación bacteria-bacteria y en la producción de enzimas hidrolíticas como celulasas y pectinasas, facilitando la penetración de las cepas rizobianas y otros endófitos fijadores de N₂ en los pelos radiculares o en los espacios intercelulares de las células radiculares, hecho que se traduce en un mayor número de nódulos (Etesami, 2022). Lo encontrado en el presente estudio se puede deber a que la cantidad de muestras de plantas para procesar mediante el software SmartRoot no fue suficiente (n=4), y a que el procedimiento para tomar fotos de raíces se debe estandarizar junto con el uso del programa para la identificación de características importantes de la arquitectura de las raíces.

Por otro lado, la amplificación del gen ARNr 16S de todas las cepas aisladas en este estudio resultó en una única banda con un tamaño de 1500pb, la cual corresponde con el tamaño esperado según informes anteriores (Lorite, Muñoz, Olivares, Soto y Sanjuán, 2010; Boakye, Lawson, Danso y Kwame, 2016). Además, el análisis de la secuencia del gen ARNr 16S de las cepas bacterianas aisladas reveló que los nódulos de trébol estaban colonizados por bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Arthrobacter*, lo cual se ha evidenciado previamente, ya que se lograron aislar dos cepas endofíticas con capacidad de fijación de nitrógeno a partir de los nódulos de *Sophora alopecuroides*, y por medio de análisis moleculares se identificaron como *Bacillus cereus* (Zhao et al., 2011; Etesami, 2022). Dichas bacterias son conocidas por ser endofíticas y promotoras del crecimiento vegetal que tienen la capacidad de colonizar los nódulos de las raíces de plantas leguminosas, mejorar la nodulación cuando se coinoculan con rizobios y fijación de N₂. Esto se ha demostrado mediante la amplificación del gen *nifH* y *nifU* a partir de *Bacillus* y *Arthrobacter*, respectivamente, indicando que poseen la enzima nitrogenasa necesaria para poder fijar nitrógeno atmosférico en amoníaco, comprobando que

tienen un potencial alto de fijación de N_2 , y que la coexistencia con rizobios dentro de nódulos de raíces es un acontecimiento ecológico importante porque tales bacterias pueden tener más oportunidades de intercambiar su información genómica central y simbiote (Chhetri, 2022; Zhao et al., 2011).

En general, las bacterias endofíticas, como *Bacillus* sp. y *Arthrobacter* sp, poseen varias propiedades que determinan el potencial como promotores del crecimiento vegetal. Dentro de estas características se tiene la fijación de N_2 que beneficia a las plantas para que puedan producir macromoléculas importantes para la estructura y metabolismo de células vegetales, incluso, en suelos estresados, en comparación con bacterias rizobianas simbióticas de las leguminosas. También, tienen la capacidad de producir IAA que es importante para la nodulación, como se mencionó previamente, y pueden formar biofilms, siendo esta una característica clave ya que le permiten a la planta soportar diversas condiciones de estrés biótico y abiótico (Tariq et al., 2013; Chhetri et al., 2022; Zhao et al., 2011)

De igual forma, estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal tienen el potencial de tener influencia sobre el fitness y comportamiento de las plantas hospederas ya que mejoran la absorción de Fe mediante la producción de sideróforos que solubilizan el hierro que se encuentra en su entorno, también pueden convertir el P en formas disponibles para las plantas en las zonas radiculares, mejoran las relaciones hídricas de las plantas por la producción de exopolisacáridos e inhiben hongos considerados como fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria burnsii* y *Rhizoctonia solani* mediante mecanismos de acción como la resistencia sistémica inducida, la detoxificación y la degradación de factores de virulencia, la producción de enzimas líticas, la antibiosis, entre otros (Etesami, 2022; Zhao et al., 2011; Chhetri et al., 2022; Jiang et al., 2022). Finalmente, se considera que estos rasgos son importantes para aumentar el rendimiento de los cultivos y el establecimiento de sistemas agrícolas sostenibles mediante el uso de biofertilizantes a base de bacterias fijadoras de N_2 .

CONCLUSIONES

En general, se lograron aislar 4 cepas endófitas a partir de los nódulos de las raíces del trébol, las cuales pudieron reinfectar las raíces de plantas de trébol nuevas después de los ensayos de inoculación realizados en semilla. Se evidenció una gran cantidad de plantas que poseían nódulos radiculares en los semilleros con tierra de origen y turba con perlita, lo cual indica que las cepas aisladas tienen la capacidad de promover la formación de nódulos y que posiblemente presentan la función de fijación de nitrógeno. Sin embargo, se observó que las cepas indujeron una mayor nodulación en la tierra de origen no autoclavada, posiblemente por las interacciones superiores que presenta el microbioma de la rizosfera de las plantas.

Asimismo, mediante pruebas bioquímicas, las cepas aisladas se caracterizaron como Gram negativas, oxidasa positivas y catalasa positivas.

También, se identificaron molecularmente por medio de la amplificación del gen ARNr 16S, donde las bandas obtenidas a partir de los productos PCR tuvieron un tamaño de 1500 pb, lo cual corresponde con la literatura. Finalmente, gracias a una comparación con la base de datos del NCBI, se determinó que las cepas R1, R2 y R3 pertenecen al género *Bacillus*, mientras que la cepa R4 forma parte del género *Arthrobacter*.

TABLAS

Tabla 1. Cuantificación de datos de la arquitectura de las raíces de trébol en SmartRoot.

Cepa	Longitud Manual (cm)	Longitud Software (cm)	Área Radicular (cm ²)	Nº raíces Principales	Nº raíces Secundarias
R1	8.72±1.44	8.82±3.79	22.29±20.73	2.25±1.89	15.00±4.90
R2	8.61±2.11	13.01±2.63	20.13±14.22	1.00±0.00	22.75±4.99
R3	8.42±1.68	13.06±6.00	14.50±10.29	1.00±0.00	25.25±8.26
R4	8.92±1.36	9.93±2.70	16.97±8.83	2.25±1.50	25.00±16.43
C	8.66±1.66	8.83±1.37	26.82±21.51	2.00±0.82	22.00±5.48

Descripción: A partir del software SmartRoot se hizo un análisis basado en el muestreo de imágenes de las raíces de plantas que fueron inoculadas con cada cepa aislada y se recopiló información sobre: la longitud de la raíz, donde se compararon los datos obtenidos manualmente y del software, el área radicular y el número de raíces principales y secundarias.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas.

Cepa	Forma	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa
R1	Bacilo	-	+	+
R2	Bacilo	-	+	+
R3	Bacilo	-	+	+
R4	Bacilo	-	+	+

Descripción: La caracterización bioquímica de las cepas aisladas indica que tienen forma de bacilo, son Gram negativas, y oxidasa y catalasa positivas.

Tabla 3. Identificación de las cepas aisladas a partir de las secuencias del gen ARNr 16S.

Cepa	Nombre	Query cover	E-value	% identidad
R1	<i>Bacillus</i> sp.	78%	0.0	92.52%
R2	<i>Bacillus</i> sp.	99%	0.0	93.82%
R3	<i>Bacillus</i> sp.	99%	0.0	100%
R4	<i>Arthrobacter</i> sp.	100%	0.0	99.86%

Descripción: Las cepas R1, R2 y R3 corresponden al género *Bacillus* sp., con un Query cover entre 78% y 99%, un E-value de 0.0 y un porcentaje de identidad entre 92.52% y 100%. En

cambio, la cepa R4 pertenece al género *Arthrobacter* sp. con un Query cover de 100%, un E-value de 0.0 y un porcentaje de identidad de 99.86%.

FIGURAS

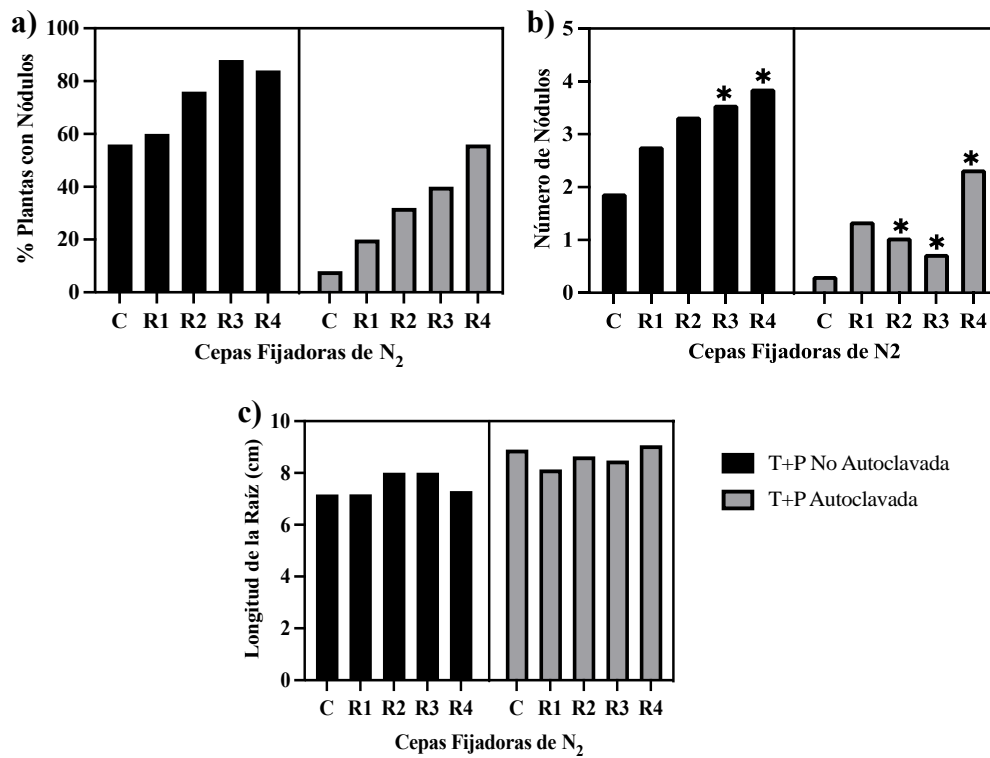


Figura 1. Evaluación de parámetros en ensayos de inoculación en semilla en turba y perlita.

Descripción: De las plantas cosechadas, se midieron 3 parámetros, y los datos obtenidos se representan como: a) Cantidad de plantas que presentaron nódulos, b) Número de nódulos por planta y c) Longitud de la raíz de las plantas.

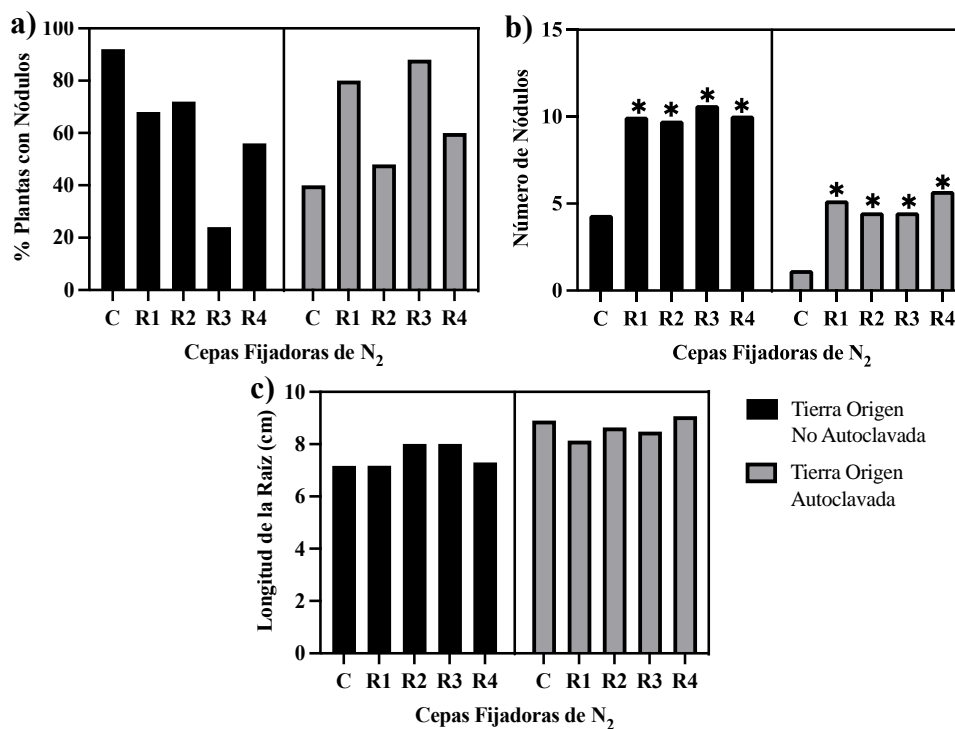


Figura 2. Evaluación de parámetros en ensayos de inoculación en semilla en tierra de origen.

Descripción: Cosechadas las plantas, se midieron 3 parámetros, y los datos conseguidos se presentaron como: a) Cantidad de plantas que presentaron nódulos, b) Número de nódulos por planta y c) Longitud de la raíz de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bansal, R. (2009). Synergistic effect of *Rhizobium*, PSB and PGPR on nodulation and grain yield of mungbean. *Journal of Food Legumes*, 22:37–39.
- Barea, J., Pozo, M., Azcón, R., y Azcón-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417): 1761-1778.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eri197>
- Bhattacharjee, R., Singh, A. y Mukhopadhyay, S. (2008). Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology Biotechnology*, 80, 199–209. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1567-2>
- Boakye, E., Lawson, I., Danso, S., y Kwame, S. (2016). Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis*. 69: 89–99.
<https://doi.org/10.1007/s13199-016-0383-1>
- Chhetri, G., Kim, I., Kang, M., So, Y., Kim, J., y Seo, T. (2022). An Isolated *Arthrobacter* sp. Enhances Rice (*Oryza sativa* L.) Plant Growth. *Microorganisms*, 10(6), 1187.
<http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10061187>
- Cocking, E. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 252, 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1024106605806>
- Draye, X., y Guillaume, L. (2014). *A Novel Image Analysis Toolbox Enabling Quantitative Analysis of Root System Architecture*. Obtenido el 13 de noviembre de 2023 de <https://smartroot.github.io>
- Etesami, H. (2022). Root nodules of legumes: A suitable ecological niche for isolating non-rhizobial bacteria with biotechnological potential in agriculture. *Current Research in Biotechnology*, 4:78-86. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.01.003>

FAO. (2023). *Inorganic fertilizers 2000-2021*. FAOSTAT Analytical Brief Series, 68.

Obtenido el 13 de noviembre de 2023 de

<https://www.fao.org/3/cc6823en/cc6823en.pdf>

Franche, C., Lindström, K. y Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321, 35–59.

<https://doi.org/10.1007/s11104-008-9833-8>

Garbeva, P., Overbeek, L. y Vuurde, J. (2001). Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 41:369–383.

<https://doi.org/10.1007/s002480000096>

Geetha, R., Falguni, S., Anjana, J. y Archana, G. (2008). Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresource Technology*, 99:4544–4550. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.057>

Hameed, S., Yasmin, S., Malik, K., Zafar, Y. y Hafeez, F. (2004). *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strains isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*, 39:179–185. <https://doi.org/10.1007/s00374-003-0697-z>

Hapsoh, I., Dini, R., Wawan y Wulandari, M. (2022). Application of *Bacillus cereus* Biofertilizer Formulation of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Growth and Yield Support Sustainable Agriculture on Peatlands. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. The 5th International Conference on Agriculture, Environment, and Food Security, 977. doi:10.1088/1755-1315/977/1/012022

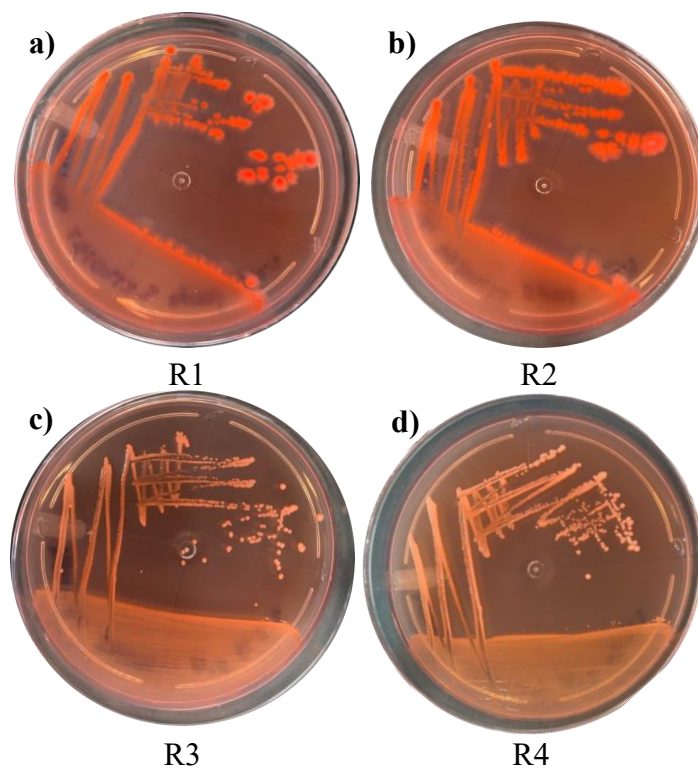
Jiang, Y., Song, Y., Jiang, C., Li, X., Liu, T., Wang, J., Chen, C. y Gao, J. (2022). Identification and Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* JI39, a Novel Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria* Strain From *Panax ginseng*. *Frontiers in Plant Science*. 13:873621. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.873621>

- Kholida, F. y Zulaika, E. (2016). Azotobacter potential as IAA hormone producer. *Journal Sains dan Seni ITS*, 4 (2): 2337-3520.
<https://dx.doi.org/10.12962/j23373520.v4i2.14047>
- Lane, D. (1991). 16S/23S rRNA sequencing en EnStackebrandt, E., y Goodfellow, M. (Eds), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115-175). John Wiley and Sons.
- Lorite, M., Muñoz, S., Olivares, J., Soto, M., y Sanjuán, J. (2010). Characterization of Strains unlike *Mesorhizobium loti* That Nodulate *Lotus* spp. in Saline Soils of Granada, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12).
<https://doi.org/10.1128/AEM.02555-09>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., y Missaoui, A. (2020). Current Progress in Nitrogen Fixing Plants and Microbiome Research. *Plants*, 9(1), 97.
<https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Menegat, S., Ledo, A. y Tirado, R. (2022). Greenhouse gas emissions from global production and use of nitrogen synthetic fertilizers in agriculture. *Scientific Reports*, 12, 14490.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-18773-w>
- Mishra, P., Mishra, S., Selvakumar, G., Bisht, J., Kundu, S. y Gupta, H. (2009). Coinoculation of *Bacillus thuringiensis*-KR1 with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.). *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 25:753–761.
<https://doi.org/10.1007/s11274-009-9963-z>
- Oberson, A., Frossard, E., Bühlmann, C., Mayer, J., Mader, P. y Luscher, A. (2013). Nitrogen fixation and transfer in grass-clover leys under organic and conventional cropping systems. *Plant and Soil*, 371, 237–255. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1666-4>
- Pankievicz, V., Irving, T., Maia, L. y Ané, J. (2019). Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing

- bacteria and non-leguminous crops. *BMC Biology*, 17, 99.
<https://doi.org/10.1186/s12915-019-0710-0>
- Prévost, D., y Antoun, H. (2006). Root Nodule Bacteria and Symbiotic Nitrogen Fixation. En Carter y Gregorich (Ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, CRC.
- Reiner, K. (2010). Catalase Test Protocol. American Society for Microbiology. Obtenido el 25 de noviembre de 2023 de <https://asm.org/protocols/catalase-test-protocol>
- Singh, A., Singh, G., Gautam, D., y Bedi, M. (2013). Optimization of Dairy Sludge for Growth of Rhizobium Cells. *BioMed Research International*, 845264.
<https://doi.org/10.1155/2013/845264>
- Taurian, T., Ibanez, F., Angelini, J., Tonelli, M. y Fabra, A. (2012). Endophytic bacteria and their role in legumes growth promotion en Maheshwari, D. (Eds) *Bacteria in Agrobiolology: Plant Probiotics*. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-27515-9_8
- Tariq, M., Hameed, S., Yasmeen, T., Zahid, M., y Zafar, M. (2013). Molecular characterization and identification of plant growth promoting endophytic bacteria isolated from the root nodules of pea (*Pisum sativum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(2), 719–725. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1488-9>
- Tripathi, N., y Sapra, A. (2021). *Gram Staining*. National Library of Medicine. Obtenido el 25 de noviembre de 2023 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>
- Turner, S., Pryer, K., Miao, V., y Palmer, J. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46: 327–338.

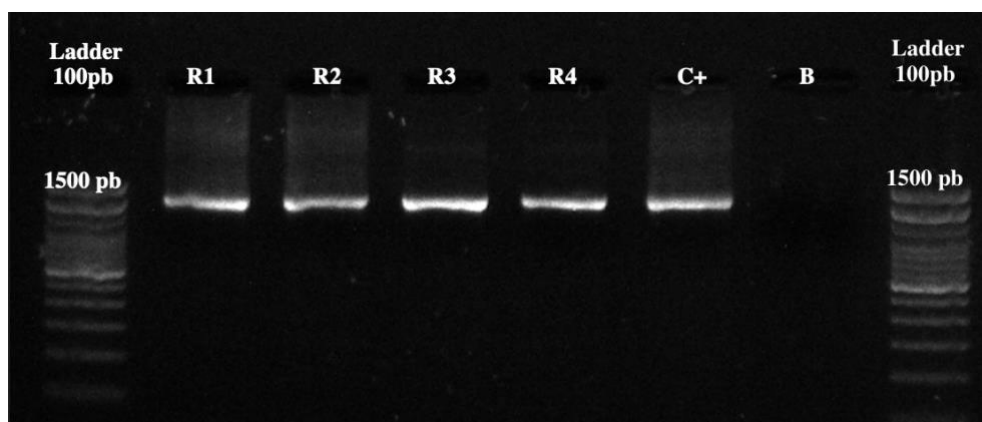
- Vitousek, P., Menge, D., Reed, S. y Cleveland, C. (2013). Biological nitrogen fixation: rates, patterns, and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368, 20130119. <http://doi.org/10.1098/rstb.2013.0119>
- Wagner, S. (2011). *Biological Nitrogen Fixation*. Nature Education Knowledge 3(10):15.
Obtenido el 13 de noviembre de 2023 de
<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/biological-nitrogen-fixation-23570419/>
- Wielbo, J, Marek-Kozaczuk, M., Mazur, A., Kubik-Komar, A. y Skorupska, A. (2010). Genetic and Metabolic Divergence within a *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii Population Recovered from Clover Nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00667-10>
- Zhao, L., Xu, Y., Sun, R., Deng, Z., Yang, W. y Wei, G. (2011). Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus Cereus* strain mq23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian journal of microbiology*, 42(2), 567–575. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000022>

ANEXOS

ANEXO 1: CEPAS BACTERIANAS AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS DE
RAÍCES DE TRÉBOL

Descripción: A partir de los nódulos de las raíces de trébol se aislaron 4 cepas bacterianas en medio YEM con Rojo Congo: a) Cepa R1, b) Cepa R2, c) Cepa R3 y d) Cepa R4, que presentaban la coloración y morfología adecuada para ser consideradas como nodulantes y posibles fijadoras de nitrógeno.

**ANEXO 2: PRODUCTOS PCR DEL GEN ARNr 16S DE LAS CEPAS AISLADAS A
PARTIR DE NÓDULOS DE RAÍCES DE TRÉBOL**



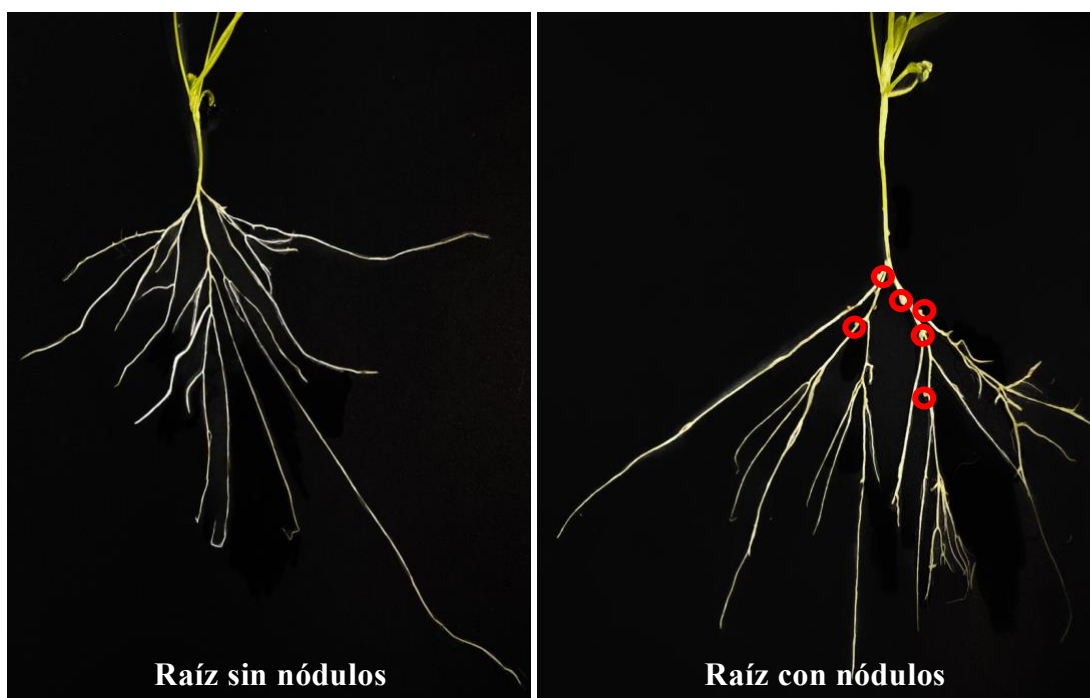
Descripción: Análisis de los productos de la amplificación del gen ARNr 16S de las cepas aisladas mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, donde, de izquierda a derecha se observa: el Ladder de 100 pb (Invitrogen), las cepas R1, R2, R3, R4, el control positivo (*Pseudomonas* spp.) y el blanco (mezcla de reactivos sin ADN molde).

**ANEXO 3: ENSAYOS DE INOCULACIÓN EN SEMILLA DE LAS CEPAS
AISLADAS A PARTIR DE NÓDULOS DE RAÍCES DE TRÉBOL**



Descripción: En la presente imagen se tiene un ejemplo de los ensayos de inoculación en semilla que se llevaron a cabo en semilleros con sustratos que se componían de turba y perlita, y tierra de origen. Este ejemplo corresponde con el semillero que contenía turba y perlita, del lado izquierdo el sustrato se encuentra autoclavado y del lado derecho el sustrato se encuentra no autoclavado.

ANEXO 4: IMÁGENES DE LA ARQUITECTURA DE LA RAÍZ DE TRÉBOL OBTENIDAS A PARTIR DE SMARTROOT



Descripción: Ambas imágenes fueron tomadas a partir del software SmartRoot después de haber sido procesadas en el programa, del lado izquierdo se puede ver una raíz de trébol sin nódulos y en el lado derecho una raíz de trébol con nódulos. De esta forma, se pudieron cuantificar los datos correspondientes con la arquitectura de la raíz de trébol, como: la longitud de raíz, el área radicular, y las raíces principales y secundarias.