



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

**“Estudio exploratorio de la comunidad bacteriana asociada  
a la rizósfera de *Haematoxylum campechianum* L.”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

DEMETRIO HERNÁNDEZ DÍAZ

DIRECTOR

DR. FULGENCIO ALATORRE COBOS

CODIRECTOR

DR. LUIS DAVID MALDONADO BONILLA

PUERTO ESCONDIDO, OAXACA, MÉXICO 2020

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar el presente trabajo de tesis a mis padres Demetrio y María, por haber depositado su confianza en mí, porque a pesar de que ya no había posibilidades para que yo pudiera estudiar la universidad, creyeron en mí, les agradezco inmensamente por su dedicación, esfuerzo y su gran sacrificio que hicieron para sacarme adelante en estos 25 años de vida junto a ustedes y mis hermanas; especialmente por esos largos y grandiosos años de universidad. También quiero darles las gracias a ambos por todos sus consejos, su tiempo, pero sobre todo por su gran amor y que a pesar de todas las adversidades siempre han estado apoyándonos para que al día de hoy mis hermanas y yo seamos personas de bien y mejor preparadas; siempre estaré en deuda con ambos, los quiero mucho y quiero que sepan que estoy muy orgulloso de ustedes.

Gracias por ayudarme a tener estos pies, gracias a ellos pude caminar y llegar muy lejos.

A mis hermanas Sandy, Ivon, Magaly, Nataly por todas sus risas, sus travesuras, sus ocurrencias, sus enojos pero sobre todo por su gran apoyo por creer en mí por todo su cariño y amor, y por siempre contagiarme de su gran alegría, las quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Mar campus Puerto Escondido Oaxaca por darme la oportunidad de formarme como Licenciado en Biología en sus aulas y laboratorios. Por los servicios brindados y su infraestructura puestos a nuestra disposición para el aprendizaje y preparación como profesionistas.

A todos mis profesores que con todo gusto me transmitieron sus conocimientos para fortalecer mi aprendizaje en la Licenciatura de Biología, muchas gracias

A la Dra. Rosalía Guerrero Arenas por su gran esfuerzo por formarnos como profesionistas, tal vez nunca lea mi tesis, pero la admiro porque es una profesora que sabe enseñar, gracias por su paciencia, por estar siempre pendiente del aprendizaje en sus materias impartidas y por todos sus consejos y apoyo en la escritura de mi protocolo de tesis.

Al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos mi director, por su gran apoyo y confianza que me dio al brindarme la oportunidad de hacer esta tesis. Por siempre estar pendiente de cómo voy y siempre otorgarme un poco de su tiempo para escucharme y aconsejarme. Por los conocimientos que ha compartido conmigo, por estar siempre pendiente del progreso del trabajo de laboratorio y escritura de tesis, pero sobre todo por su invaluable amistad, muchas gracias Doc.

Al Dr. Luis David Maldonado Bonilla por haber aceptado la codirección de mi tesis y por haberme apoyado en el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A todos mis revisores les agradezco el tiempo que le dedicaron a la corrección de mi trabajo, muchas gracias al Dr. Noé Ruíz García, Dr. Juan Manuel Villa Hernández y al Dr. Erik Pablo Carrillo.

Al Colegio de postgraduados campus Campeche por haberme dado la oportunidad de poder ingresar, conocer sus laboratorios y toda su infraestructura, por los servicios brindados en mi estancia profesional y durante todo el tiempo que estuve realizando mi Tesis.

A la Dra. Karina Verdel Aranda por haber sido la primera persona quien me mostro el fabuloso mundo de las bacterias, gracias por compartir sus conocimientos sobre microbiología, gracias a esa estancia me di cuenta de mi pasión por las bacterias.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Molecular y Genómica Funcional del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, gracias por el apoyo del Dr. Fulgencio, Dra. Itzel, Dr. Jose Luis, Lorena, Carolina, Jorge Villegas, Luis Fernando, Efraín, Alex, Jorge Heredia y Eleazar.

A mi amigo y compadre Francisco porque gracias a él me anime a irme de mi casa y estudiar la universidad, gracias por estar conmigo y por tu gran apoyo.

A Lorena mi acompañante en todas nuestras aventuras, gracias por tu amistad por el apoyo que nos dimos en la universidad, por aquellas noches de desvelo de exámenes y escribiendo la tesis, por todas esas fiestas juntos. ¡Lo logramos Lolis! Gracias por todo.

A Carolina (Carol G) gracias por brindarme tu amistad, por no dejarme morir en la elaboración de mis gráficos y estadísticos. Por apoyarme en las dudas que tenía en el laboratorio, por todos esos tragos coquetos de vino, gracias por las charlas, por hacer muy divertida nuestras tesis.

A mi amistad Jorge Villegas por hacer nuestra estancia en Campeche muy divertida, por todas esas beers que fueron nuestras. Por brindarme tú apoyo incondicional, gracias por todo amistad.

A todos mis compañeros y amigos de la Universidad, a Isma por ser mi mejor confidente y leal compañero, por todo tu apoyo incondicional, a Lore nuevamente por todas las aventuras juntos y el apoyo que me has brindado, Cristel gracias por todo tu apoyo en las tareas complicadas, por desvelarnos juntos, por ayudarme a ser más responsable. Gracias a los tres por todas esas noches de desvelo juntos, por las noches de café y galletas, les agradezco por todo el tiempo que hemos compartido juntos, les deseo mucho éxito.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b> .....	XI
1. <b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
2. <b>ANTECEDENTES</b> .....	4
2.1 Microorganismos benéficos en plantas.....	4
2.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la familia Fabaceae.....	5
2.3 Estudios previos en <i>Haematoxylum campechianum</i> L.....	6
3. <b>MARCO TEÓRICO</b> .....	7
3.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal de la rizósfera en la familia Fabaceae.....	7
3.2 Identificación molecular de bacterias: secuenciación del gen ribosomal 16S de bacterias.....	8
3.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
4 <b>OBJETIVOS</b> .....	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2. Objetivos específicos.....	12
5. <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	13
6. <b>HIPÓTESIS</b> .....	14
7. <b>ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	14
8. <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	15
8.1 Recolecta del material biológico.....	15
8.2 Elaboración de medios de cultivo.....	17
8.3 Aislamiento y purificación de bacterias rizosféricas.....	18
8.4 Aislamiento y purificación de bacterias endófitas de raíces.....	18
8.5 Aislamiento y purificación de bacterias endófitas de nódulos.....	19
8.6 Descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos.....	20
8.7 Almacenamiento y respaldo de los aislado bacterianos.....	20
8.8 Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los aislados bacterianos rizosféricos mediante ensayos de Co- cultivo con <i>A. thaliana</i> .....	20

	Página
8.9 Evaluación de la capacidad de promoción del crecimiento vegetal de los aislados bacterianos rizosféricos mediante ensayos de Co- cultivo con <i>H. campechianum</i> .....	23
9 Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación del gen marcador ARNr 16S de las bacterias aisladas.....	26
9.1 Análisis estadístico.....	27
10 <b>RESULTADOS</b> .....	29
10.1 Aislamiento de bacterias asociadas al sistema radical de <i>H. campechianum</i> .....	29
10.2 Purificación de morfotipos bacterianos por estría cruzada y descripción de la morfología colonial y celular de los aislados bacterianos.....	32
10.3 Escrutinio general de los aislados rizosféricos para determinar su capacidad de afectar el crecimiento vegetal en <i>A. thaliana</i> .....	37
10.4 Evaluación de 3 aislados rizosféricos para determinar su capacidad de afectar el crecimiento vegetal en <i>A. thaliana</i> .....	43
10.5 Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de los aislados bacterianos para promover el crecimiento vegetal de <i>H. campechianum</i> .....	47
10.6 Extracción de ADN genómico de bacterias.....	51
10.7 Amplificación y purificación del gen ribosomal 16S.....	53
10.8 Identificación molecular de los aislados bacterianos mediante secuenciación del gen 16S ribosomal.....	56
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	58
11 <b>CONCLUSIONES</b> .....	63
11.1 <b>PERSPECTIVAS</b> .....	64
12 <b>LITERATURA CITADA</b> .....	65
13 <b>ANEXOS</b> .....	75
14 Anexo I. Secuencias del gen ribosomal 16S de las cepas bacterianas aisladas.....	75
14.1 Anexo II. Análisis estadísticos: Tratamientos analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba de Tukey....	85
14.2	

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo en la región aledaña al Colegio de Postgraduados, ubicado en Sihochac, municipio de Champotón, Campeche.....	15
<b>Tabla 2.</b> Composición de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias endófitas fijadoras de N <sub>2</sub> .....	17
<b>Tabla 3.</b> Componentes del medio Murashige y Skoog (MS) 1X.....	22
<b>Tabla 4.</b> Composición del medio McCown Woody Plant (WPM).....	25
<b>Tabla 5.</b> Morfología celular y colonial de cepas bacterianas aisladas de los 3 tipos de tejidos, raíces de árboles adultos, raíces juveniles y nódulos de <i>H. campechianum</i> .....	34
<b>Tabla 6.</b> Evaluación cualitativa del efecto del co-cultivo de las cepas bacterianas rizosféricas de <i>H. campechianum</i> sobre el sistema radical y brote de plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	40
<b>Tabla 7.</b> Cuantificación de ADN genómico extraído de las cepas aisladas de la rizósfera y la endósfera de <i>H. campechianum</i> .....	52
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de los productos de PCR purificados de la amplificación del gen ribosomal 16S para la secuenciación de las 26 cepas analizadas.....	55
<b>Tabla 9.</b> Identificación molecular de las 26 cepas bacterianas aisladas de la rizósfera y la endósfera de <i>H. campechianum</i> .....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> <i>H. campechianum</i> . Izquierda, árboles adultos en un tinal; derecha, detalles de la hoja. (Foto. FAC).....	6
<b>Figura 2.</b> Ribosoma bacteriano. Se muestra un esquema de su estructura y se indican las subunidades y macromoléculas que lo componen (Rodicio & Mendoza 2004).....	9
<b>Figura 3.</b> Operón ribosómico. A) Localización del gen 16S dentro del operón ribosomal <i>rnn</i> : se muestran los genes estructurales de los tres tipos de ARNr 16S, 23S y 5S (esquema tomado de Lafontaine & Tollervy 2011). B) Ilustración de las regiones conservadas, variables e hipervariables dentro del gen 16S ARNr.....	10
<b>Figura 4.</b> Material biológico colectado. A) Plántulas de <i>H. campechianum</i> B) y C) fragmentos de raíces laterales jóvenes de árboles adultos de <i>H. campechianum</i> .....	16
<b>Figura 5.</b> Nódulos de raíces laterales jóvenes de árboles adultos de <i>H. campechianum</i> .....	16
<b>Figura 6.</b> Germinación de semillas de <i>H. campechianum</i> en medio Murashige y Skoog (MS) 1X.....	24
<b>Figura 7.</b> Diluciones seriadas en medio LB para aislamiento de bacterias rizosféricas de raíces de plantas juveniles y árboles adultos de <i>H. campechianum</i> .....	30
<b>Figura 8.</b> Diluciones seriadas en medio BURK para aislamiento de bacterias endófitas de raíces y diluciones seriadas en medio ELMARC para aislamiento de bacterias endófitas de nódulos hallados en <i>H. campechianum</i> .....	31



<b>Figura 9.</b> Cepas de la rizósfera y endósfera de <i>H. campechianum</i> , aisladas y purificadas por estría cruzada. El número representa el número asignado al aislado correspondiente. Las cepas 1-19 se estriaron en medio LB, las cepas 21-22 en medio BURK y las cepas 24-26 en medio ELMARC.....	35
<b>Figura 10.</b> Tinciones Gram Positivas y Negativas representativas de las cepas bacterianas, observadas bajo el microscopio a 100X. <b>A)</b> Diplobacilos (G+), <b>B)</b> Estreptobacilos (G+), <b>C)</b> Bacilos (G+), <b>D)</b> Diplobacilos (G-), <b>E)</b> y <b>F)</b> Bacilos (G+) <b>G)</b> Cocos (G+), <b>H)</b> Cocos (G-), <b>I)</b> Estreptococos (G-).....	36
<b>Figura 11.</b> Clasificación de los fenotipos de <i>A. thaliana</i> inducidos por el co-cultivo con cepas bacterianas rizosféricas de <i>H. campechianum</i> . A) Inhibición de la raíz primaria, más raíces laterales y más pelos radiculares, B) No inhibición de la raíz primaria, más raíces laterales y más pelos radiculares, C). No inhibición de la raíz primaria, menos raíces laterales y más pelos radiculares.....	40
<b>Figura 12.</b> Evaluación de las 20 cepas bacterianas rizosféricas (HCR) de <i>H. campechianum</i> y su efecto en el crecimiento vegetal de <i>A. thaliana</i> . El número indicado en el punto inferior izquierdo de la placa corresponde al número del aislado. C = Plantas control inoculadas con medio LB solamente.....	41
<b>Figura 13.</b> Peso seco del brote de plantas de <i>A. thaliana</i> co-cultivadas con bacterias rizosféricas de <i>H. campechianum</i> . C = Control, plantas inoculadas solo con medio LB. Letras iguales en las barras indican valores no significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha$ 0.05).....	42
<b>Figura 14.</b> Peso seco de la raíz de plantas de <i>A. thaliana</i> co-cultivadas con bacterias rizosféricas de <i>H. campechianum</i> . C = Control, plantas inoculadas solo con medio LB. Letras iguales en las barras indican valores no significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha$ 0.05).....	40

<b>Figura 15.</b> Efecto del co-cultivo con cepas bacterianas rizosféricas (HCR11, HCR12 y HCR14) de <i>H. campechianum</i> sobre el crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> . C1, C2, C3 = plantas control.....	44
<b>Figura 16.</b> Efecto de cepas bacterianas evaluadas en co-cultivo sobre la arquitectura y morfología de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> . La barra = 0.620 mm (raíz primaria) 3.3mm (raíces laterales). Las flechas señalan la zona meristemática de la raíz primaria.....	45
<b>Figura 17.</b> Peso seco de A) brotes y B) raíces de plántulas de <i>A. thaliana</i> inoculadas con cepas bacterianas rizosféricas de <i>H. campechianum</i> . C = Control, plantas inoculadas solo con medio LB. El número indica el número de la cepa usada en el co-cultivo. Letras iguales en las barras indican valores no significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha$ 0.05.....	46
<b>Figura 18.</b> Efecto del co-cultivo con cepas bacterianas rizosféricas de <i>H. campechianum</i> sobre el crecimiento de plántulas de la misma especie. A) Efecto en brote, de lado izquierdo se muestran las plántulas control. Del lado derecho se muestran las plántulas inoculadas con la cepa HCR11, HCR12, HCR14. B) Efectos sobre el número de hojas verdaderas de plántulas de <i>H. campechianum</i> y C) Longitud de brote. C= Control, plantas inoculadas solo con medio LB.D) Efecto sobre el sistema radical de plántulas. Letras iguales en las barras indican valores no significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha$ 0.05.....	49
<b>Figura 19.</b> Efecto del co-cultivo con cepas bacterianas rizosféricas de <i>H. campechianum</i> sobre el peso seco de plántulas de la misma especie. Peso seco de A) brotes y B) raíces de plántulas. C = Control, plantas inoculadas solo con medio LB. El número indica el número de la cepa usada en el co-cultivo. Letras iguales en las barras indican valores no significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $\alpha$ 0.05.....	50

<b>Figura 20.</b> Electroforesis de la integridad del ADNg de las 26 cepas bacterianas aisladas de la rizósfera y la endósfera de <i>H. campechianum</i> , cada pozo contiene 1.5 µl de ADN templado.....	52
<b>Figura 21.</b> Gradiente de temperaturas usadas para la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular.....	53
<b>Figura 22.</b> PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S en las 26 cepas analizadas. A) Cepas C1-C15 y B) Cepas C16-C26. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb .....	54

## RESUMEN

El suelo posee una gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales establecen relaciones interespecíficas con las plantas. Algunas de estas bacterias, capaces de inducir el crecimiento de las plantas, son conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés); este efecto positivo sobre las plantas puede ocurrir a través de mecanismos que toman lugar en endósfera como la rizósfera de las plantas, por ejemplo, la fijación de N<sub>2</sub>, la producción de sideróforos o a través del antagonismo. En la actualidad existen diversos estudios en el aislamiento de este tipo de bacterias en plantas leguminosas. Sin embargo, para *Haematoxylum campechianum*, una leguminosa nativa de la Península de Yucatán, los estudios de su biología son escasos y no existe estudio alguno sobre el aislamiento de microorganismos asociados a esta especie. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar bacterias asociadas a *H. campechianum*, como potenciales agentes promotores del crecimiento vegetal. Se obtuvieron un total de 26 cepas bacterianas. Se identificaron los géneros *Pseudomonas*, *Domibacillus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* y *Bacillus*, este último fue el más común. De los 26 aislados purificados, 20 correspondieron a aislados rizosféricos. Estos aislados fueron usados en un escrutinio general para determinar su capacidad para afectar el desarrollo vegetal de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El mayor efecto del co-cultivo de aislados sobre *Arabidopsis* fue sobre el sistema radical, observando pocos cambios en el tamaño del brote. Los estudios a detalle con *P. entomophila* (HCR11), *Bacillus pseudomycooides* (HCR12) y *P. plecoglossicida* (HCR14), mostraron un efecto positivo en la ganancia de peso seco, causada por cambios en el número de raíces laterales y pelos radicales. En *H. campechianum* estas tres cepas bacterianas evaluadas mostraron una similitud en cuanto al efecto sobre el sistema radical y brote al observado previamente en *Arabidopsis*. El presente estudio demostró la existencia de cepas bacterianas nativas asociadas a la raíz de *H. campechianum* y su posible rol como PGPR.

**Palabras clave:** *Haematoxylum campechianum*, rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, rizósfera.

## ABSTRACT

The soil has a great diversity of microorganisms, many of which establish interspecific relationships with plants. Some of these bacteria, capable of inducing plant growth, are known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). This positive effect on plants can occur through mechanisms that take place in the endosphere such as the rhizosphere of plants, for example, N<sup>2</sup> fixation, the production of siderophores, or through antagonism. Currently there are various studies on the isolation of this type of bacteria in leguminous plants. However, for *Haematoxylum campechianum*, a legume native to the Peninsula of Yucatan, studies of its biology are scarce and there is no study on the isolation of microorganisms associated with this species. Therefore, the objective of the present work was to identify and characterize bacteria associated with *H. campechianum*, as potential plant growth promoting agents. A total of 26 bacterial strains were obtained. The genera *Pseudomonas*, *Domibacillus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* and *Bacillus* were identified, the latter being the most common. Of the 26 purified isolates, 20 corresponded to rhizospheric isolates. These isolates were used in a general survey to determine their capacity to affect the plant development of the model plant *Arabidopsis thaliana*. The greatest effect of isolates in co-culture with *Arabidopsis* was on the root system, observing little change in shoot size. Detailed studies with *P. entomophila* (HCR11), *Bacillus pseudomycooides* (HCR12) and *P. plecoglossicida* (HCR14), showed a positive effect on dry weight gain, caused by changes in the number of lateral roots and radical hairs. In *H. campechianum* these three evaluated bacterial strains showed a similarity in terms of the effect on the root system and outbreak to that previously observed in *Arabidopsis*. The present study demonstrated the existence of native bacterial strains associated with the *H. campechianum* root and its possible role as PGPR.

**Key words:** *Haematoxylum campechianum*, plant growth-promoting rhizobacteria, rhizosphere.