



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGÍA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**PARTICIPACIÓN DE LAS BACTERIAS FERRIRREDUCTORAS
EN EL SUMINISTRO DE HIERRO A PLANTAS DE ALFALFA
(*Medicago sativa*) EN SUS PRIMEROS ESTADÍOS DE CRECIMIENTO**

Tesis

Que como requisito para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

en conservación y manejo de recursos naturales

Presenta:

Biol. CRISANTO VELAZQUEZ BECERRA

Director de tesis:

Dr. Eduardo Valencia Cantero

Morelia Mich., Mayo de 2007



Agradecimientos

-Agradezco a Canacyt por el apoyo económico recibido para la realización de este trabajo que forma parte del proyecto SEP-2003-C02-42899 financiado por el fondo sectorial SEP CONACYT para la Investigación Básica.

-Le agradezco a la facultad de biología y al instituto de investigaciones químico-biológicas por abrirme las puertas.

-Al doctor Eduardo Valencia por su gran ayuda y apoyo para poder obtener el grado y ser mi valedor en la ciencia.

-A la mesa sinodal que con su aporte juntos realizamos un mejor trabajo y me ayudaron en mi formación.

-Le agradezco a mis compañeros de laboratorio por sus consejos y ayuda para el mejoramiento del trabajo y mi persona.

-Mi familia, mis padres y hermanos por las atenciones y su incondicional apoyo.

Este trabajo se lo dedico a mi hijo y a un amigo que por fin encontró bienestar y claridad en su mente y alma.

CONTENIDO

i.	Resumen general.....	5
ii.	Summary.....	7
iii.	Introducción General.....	9
iv.	Planteamiento del Problema	14
v.	Objetivos.....	15
vi.	Resultados Capitulo.1.....	16
vi.i	Resumen.....	16
vi.ii	Abstract.....	18
vi.iii	Introducción.....	19
vi.iv	Materiales y métodos.....	21
vi.v	Resultados y discusión.....	25
vi.vi	Conclusiones.....	37
vi.vii	Literatura Citada.....	38
vi.viii	Resultados capitulo.2 Resumen.....	40
vi.ix	Abstract.....	41
vi.x	Introducción.....	42
vi.xi	Materiales y métodos.....	43
vi.xii	Resultados y discusión.....	46
vi.xiii	Conclusiones.....	55
vi.xiv	Literatura citada.....	56
vi.xv	Resultados Capitulo 3 Resumen.....	58

vi.xvi	Abstract.....	59
vi.xvii	Introducción.....	60
vi.xviii	Materiales y métodos.....	62
vi.xix	Resultados y discusión.....	64
vi.xx	Conclusiones.....	68
vi.xxi	Literatura Citada.....	69
vii	Discusión General.....	71
viii	Conclusión General.....	73
ix	Perspectivas.....	74
x	Bibliografía Complementaria.....	75
xi	Anexos.....	78

I. RESUMEN GENERAL

La alfalfa es uno de los cultivos más importantes en el mundo, muy difundido en los países de clima templado, tales como Francia, Italia y de climas más cálidos como Grecia y México (Carrillo et al, 2002). Sin embargo, la alfalfa requiere de condiciones muy particulares para su óptimo desarrollo, por ejemplo, la radiación solar, la temperatura y el pH son factores limitantes. Este último factor puede afectar que la disponibilidad de minerales en el suelo, uno de ellos es el hierro (Fe). La deficiencia de Fe genera clorosis férrica, ésta se manifiesta con un amarillamiento de las hojas. El Fe es uno de los nutrientes minerales que los microorganismos pueden proveer a la planta, es por esta razón, en este trabajo se evaluó el papel que juegan las rizobacterias ferrirreductoras en la obtención de Fe por plantas de alfalfa en sus primeros estadios de vida y crecidas en el medio mineral de Hoagland. Se emplearon dos fuentes de Fe para la planta (citrato e hidróxido férrico) en experimentos de evaluación de la susceptibilidad de la alfalfa a la escasez por Fe. También se emplearon cuatro cepas de rizobacterias ferrirreductoras para analizar la contribución de este tipo de bacterias al suministro de Fe a plantas de alfalfa, midiendo parámetros de respuesta como longitud y concentración de clorofila. Las plantas crecidas con citrato férrico como fuente de Fe alcanzaron tallas similares a las crecidas con hidróxido férrico. En cuanto a la concentración de Fe, plantas crecidas en medios con concentraciones de entre 25 μM y 75 μM no manifestaron deficiencias en su crecimiento, pero cantidades inferiores a esta fueron perjudiciales al desarrollo de las plantas. Un comportamiento similar se encontró en la variable clorofila, en los tratamientos con Fe en concentraciones por debajo de 25 μM se reduce la concentración de clorofila. Al inocular las plantas de alfalfa con las distintas cepas

ferrirreductoras se apreció claramente como la cepa *Arthobacter* sp. UMCV2 genera valores por encima del resto de los tratamientos en cuanto a la longitud de la parte aérea, y concentración de clorofila en las hojas, siempre y cuando el medio el medio se hubiera adicionado con Fe. Plantas de alfalfa carecidas en el medio mineral amortiguado a un pH 8, mostraron valores estadísticamente inferiores a los de las plantas crecidas en medio a pH 8 pero sin amortiguar, tanto en longitud, como en concentración de clorofila, mostrando que las plantas de alfalfa carecen de la capacidad para obtener Fe del medio cuando este se encuentra en condiciones de alta alcalinidad. Por ultimo, se inocularon plantas de alfalfa con mezclas de las cepas UMCV sin encontrarse evidencia de un efecto sinérgico o antagónico entre bacterias que repercutiera en el estado nutricional de las plantas, sin embargo el total de las mezclas bacterianas probadas fueron superiores al control sin inocular. En conclusión, en este trabajo se encontró que *Arthobacter* sp. UMCV2 tuvo un claro efecto en el desarrollo de la alfalfa asociado a la toma de Fe de la planta.

II. SUMMARY

The alfalfa is one of the most important cultures in the world, since it is a culture very spread in the temperate climate countries, such as France, Italy and in warmer climate countries like Greece and Mexico. Nevertheless, the alfalfa requires of particular conditions for its optimal development, for example, the solar radiation, the temperature and pH are limited factors. pH can reduce the mineral availability in the soil, one of these minerals is the iron (Fe). The Fe deficiency generates ferric chlorosis, that is recognized as a yellowing in the youngest leaves. On the other hand, Fe is one of the mineral nutrients that the microorganisms can provide to the plant, is therefore, that in this work the role of dissimilatory Fe-reducing bacteria (FeRB) on the plant Fe uptake was evaluated using plants of lucerne in its first stages of growth in the Hoagland mineral media. Two Fe sources were employed (ferric citrate and ferric hydroxide) for Fe susceptibility experiments. In the same way, four FeRB strains were employed with the aim to determine the contribution of FeRB to lucerne Fe uptake. Shoots length and leaves chlorophyll concentration were used as response parameters. The plants grown with ferric citrate as Fe source reached similar statures that plants grown with ferric hydroxide as Fe source. Plants grown on culture media with Fe concentrations in the range for 25 μM y 75 μM did not show deficiencies in its growth, but inferior concentrations of Fe were detrimental to the plant development. A similar behavior was found in the response variable chlorophyll concentration, in the treatments with Fe concentrations above 25 μM the chlorophyll concentration diminished. In FeRB inoculation experiments was clearly appraised that the FeRB *Arthobacter agillis* UMCV2 generated values over the rest of the treatments as far as the length of the shoots as in the leaves chlorophyll concentration but only if

Fe was added to the culture media. Lucerne plants grown in mineral media buffered to pH 8, showed values statically lower than plants grown on pH 8 media but without buffer. a added with a buffer, as well on shoots length as on leaves chlorophyll concentration, these show that lucerne plants are unable to uptake Fe from the media on high alkalinity conditions. Finally, plants were inoculates with mixes of the FeRB strains, no evidence of a synergistic or antagonistic effect between bacterial strains that affect on the plant nutritional stage was found. In conclusion, in this work was found that *Arthrobacter* sp. UMCV2 had a clear effect on the development of lucerne associated to plant Fe uptake.

III. INTRODUCCION GENERAL

La alfalfa es uno de los cultivos más importantes en el mundo, ya que es un cultivo muy extendido en los países de clima templado, tales como Francia Italia y con climas más cálidos como Grecia y México (Carrillo et al, 2002).

La importancia del cultivo es muy grande, ya que es utilizado en la ganadería intensiva, es rico en proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como de su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. Sumando importancia al cultivo de alfalfa se a demostrado su utilidad en la fitorremediación (Kirk et al, 2005).

La alfalfa requiere de condiciones muy particulares para su óptimo desarrollo, por ejemplo, la radiación solar es un factor muy importante que influye positivamente en el cultivo de la alfalfa. La temperatura tiene su influencia en la semilla ya que germina a temperaturas de 2-3° C, siempre que las demás condiciones ambientales lo permitan. A medida que se incrementa la temperatura la germinación es más rápida hasta alcanzar un óptimo a los 28-30° C. Temperaturas superiores a 38° C resultan letales para las plántulas (Carrillo et al, 2002).

El pH es considerado un factor limitante en el cultivo de la alfalfa, ya que el pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio y manganeso que son tóxicos para la alfalfa (Peters, 1999).

El hierro (Fe) es uno de los minerales que se ven disminuidos en la solubilidad por razones del pH. Los cultivos con mayores exigencia de Fe son: alfalfa, algodón,

apio, arroz, avellano, avena, maní, cebada, ciruelo, cítricos, espinaca, frambueso, fresa, haba, lechuga, limonero, maíz, manzano, melocotonero, nogal, pepino, peral, pimiento, remolacha, rosal, soja, sorgo, tabaco, tomate y vid (IFA, 2006).

A pesar de que el Fe es muy abundante en la naturaleza por debajo del Si y Al, es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, los contenidos de Fe en el suelo son alrededor de 1 a 5% sin embargo, el contenido total en Fe no es útil como índice para conocer su disponibilidad para la planta ya que éste se encuentra en forma férrica, la cual es insoluble y por tanto indisponible para la planta (Mengel, 2001).

Por otra parte, uno de los factores que influyen en la disponibilidad de Fe es el contenido de arcilla y materia orgánica. En los suelos arcillosos, existe una tendencia a retener el Fe. Un contenido adecuado de materia orgánica, actúa de forma favorable en cuanto al aprovechamiento del Fe por parte del cultivo, debido a sus características acidificantes y reductoras, así como a la capacidad de determinadas sustancias húmicas para formar quelatos en condiciones adversas de pH (Mengel, 2001).

En caso de baja disponibilidad de Fe hay plantas capaces de desarrollar mecanismos de absorción más activos. Son las plantas eficientes, y los mecanismos pueden ser de dos tipos: Estrategia I, en dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas, que consiste en: excreción de protones y compuestos reductores, e incremento de la reducción de Fe(III) en la raíz mediante una férrico quelato reductasa turbo y Estrategia II, en gramíneas, que consiste en: síntesis y expulsión de fitosideróforos al medio, que son moléculas de alta especificidad por el hierro, pertenecientes a la

familia del ácido mugineíco. Estos disuelven y atrapan el Fe(III), que de esta manera es introducido a la raíz de la planta (Romheld, 1987).

En ausencia de Fe la planta sólo tiene pigmentos amarillos (xantofila y caroteno). El Fe en las plantas forma parte de la ferredoxina además transportador de electrones de naturaleza no porfirínica que actúa en la fotosíntesis y en la reducción de los nitratos. Otras Enzimas que contienen Fe, pero en las que no actúa como óxido reductor son la aconitasa y la xantin oxidasa (Guan, 2001), La fitoferritina, con unos 5000 átomos de Fe(III) es una proteína de reserva. Supone el 12-23% de Fe en materia seca. Este porcentaje puede alcanzar el 50% del Fe en hojas verde oscuro (Mengel, 2001).

Un dato a tener en cuenta, en relación con el metabolismo del Fe, es su baja movilidad en los tejidos vegetales. Esta movilidad, está influida negativamente por varios factores, como el elevado contenido en P, deficiencia de K, cantidad elevada de Mn y baja intensidad lumínica (Mengel, 2001). La presencia de carbonatos en el medio radicular reduce la movilidad de Fe en los tejidos vegetales. Esta es la razón de que, en ocasiones, la deficiencia de Fe no es tal, sino que es un problema de movilidad del mismo (Mengel, 2001).

En la planta, el Fe forma parte de la biosíntesis de la clorofila, ya que es constituyente de enzimas responsables de ese proceso (Guan, 2001).

La deficiencia de Fe ocasiona clorosis férrica., En la alfalfa por ejemplo, los niveles foliares normales de Fe son de 30-400 ppm materia seca, valores por debajo de esto puede producir clorosis férrica en la planta (FAO, 1987). Esta se puede dar por diferentes causas como por ejemplo en suelos neutros o básicos el Fe se oxida a formas férricas, de baja solubilidad y difícil absorción. Esto no ocurre en los suelos

ácidos. El alto contenido en bicarbonato, tanto en el suelo como el aportado con el agua de riego, puede provocar clorosis férrica. En algún caso se ha observado efectos similares a los del bicarbonato producidos por altos contenidos de nitrato (Mengel, 2001).

También se han detectado carencias por acción de otros elementos metálicos. Así, el Cu puede sustituir al Fe en los quelatos del suelo, originando su inmovilización. También se han constatado efectos similares, aunque menos importantes, con Zn y Co.

Cuando existe clorosis férrica, ésta se manifiesta primero en las hojas jóvenes. Estas, se ven amarillas menos las nervaduras que permanecen verdes. Más tarde, quedarán casi totalmente amarillas. También en las hojas viejas aparecen síntomas de amarillamiento. Después las hojas se arrugan y caen (Mengel, 2001).

El exceso de Fe no ocurre salvo raras excepciones, los casos de toxicidad por Fe no suelen producirse debido a la rapidez de conversión del Fe soluble en compuestos insolubles no disponibles para la planta. Los casos en que se produce la toxicidad son en arrozales sumergidos, donde el nivel de Fe ferroso es con frecuencia muy importante. Suelos con contenidos de Fe total superiores incluso al 5% no provocan efectos tóxicos en los cultivos que se desarrollen en ellos (Lovley, 1993)

Por otra parte, sabemos que el Fe es uno de los nutrientes minerales que los microorganismos pueden proveer a la planta (Imsande et al, 1998), ya que se considera un micronutriente. El Fe juega un papel fundamental en la activación de enzimas y su actuación como grupo prostético. Interviene en reacciones fundamentales de óxido-reducción, tanto en hemoproteínas (citocromos,

leghemoglobina, catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa) como en proteínas no-hémicas con enlace Fe-S como ferredoxina y enzimas reductasa, nitrogenasa y sulfato reductasa (Guan, 2001).

A diferencia de las plantas, los microorganismos producen sideróforos que son liberados por bacterias y hongos, son componentes de bajo peso molecular que toman los iones de Fe con alta afinidad. Los sideróforos suelen ser de 2 grupos, los hidroxamatos y los catecoles (Guan, 2001). Además de tener funciones como evitar que el Fe se precipite en el suelo, asimilable por la planta (Jurkevitch et al, 1988).

Estos componentes son producidos por distintas cepas bacterianas que se encuentran en el agua o en el suelo y que pueden ser rizosféricas, (O'Sullivan y O'Gara, 1992).

Diferentes autores han mostrado la importancia de las rizobacterias para las plantas, por ejemplo: Rroço et al (2003) menciona que los microorganismos juegan un papel importante para la obtención de Fe para la planta mediante la liberación de sideróforos. Otros trabajos como el de Valencia et al (2007), muestra el papel de bacterias rizosféricas en el suministro de Fe en la planta de frijol crecidas en suelo alcalino, observándose que las plantas inoculadas presentaban una mayor reducción en la rizosfera, contribuyendo a plantas de mayor tamaño y alto contenido de Fe.

Es por todo esto que creemos importante generar conocimiento útil para el desarrollo de una herramienta biotecnológica que permita el óptimo suministro de este micronutriente para la planta de alfalfa, mediante el uso de microorganismos que podemos encontrar en el medio ambiente del suelo y de esta manera contribuir a una solución eficaz al problema que presentan los cultivos en general de nuestro país.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este trabajo se evaluó el papel que juegan las rizobacterias ferrirreductoras UMCV en la obtención de Fe por plantas de alfalfa en sus primeras etapas de desarrollo y en un sistema *in vitro* que elimina el efecto del suelo como un factor en la disponibilidad de Fe. Lo anterior tiene la finalidad de determinar en un ambiente controlado, la capacidad de las bacterias ferrirreductoras para hacer accesible el Fe en plantas de alfalfa, con vistas a proporcionar una herramienta biotecnológica y ecológica para una mejor producción de este cultivo.

V. OBJETIVOS

General

- Conocer la participación de las bacterias ferrirreductoras en el suministro de Fe en las etapas de desarrollo de la alfalfa.

Particulares

- Evaluar la susceptibilidad de la alfalfa al estrés por falta de Fe en sus primeras etapas de desarrollo.
- Evaluar la participación de cuatro rizobacterias ferrirreductoras en el suministro de Fe en plántulas de alfalfa crecidas *in vitro*.
- Diseñar una mezcla bacteriana ferrirreductora que eficiente el suministro de Fe para la alfalfa.

VI. RESULTADOS

CAPITULO 1

Determinación de la susceptibilidad de la alfalfa a la escasez de Fe en etapas fisiológicas tempranas

VI.1. RESUMEN

El Fe es un nutrimento esencial virtualmente para todos los seres vivos, ya que se emplea en un sin fin de funciones biológicas, en la alfalfa la deficiencia de este nutrimento provoca clorosis férrica, que consiste en el amarillamiento de las hojas y una posterior pérdida de ellas. Por otro lado, sabemos que el Fe es uno de los minerales más abundantes en la naturaleza, cerca de 5% de la corteza terrestre, sin embargo, solo un pequeño porcentaje está disponible para las plantas. En este trabajo evaluamos la susceptibilidad de la alfalfa a diversas concentraciones de Fe, y para esto utilizamos citrato férrico (soluble) e hidróxido férrico (insoluble) a diversas concentraciones, tomando como parámetros de respuesta la longitud y la concentración de clorofila. El citrato férrico resultó ser una mejor fuente de Fe en comparación con el hidróxido férrico pero solo en algunas concentraciones. En concentraciones de 75 μM alcanzaron 7.8 cm de longitud contra los 5.1 cm del tratamiento de hidróxido férrico 75 μM . Si únicamente consideramos la variable concentración de Fe, 25 μM es la mejor para el crecimiento de la planta, ya que se

encontró por encima del resto de las concentraciones. En cuanto a la concentración de clorofila no se encontró diferencias significativas respecto a cual es la mejor fuente de Fe., pero si pudimos ver que concentraciones de Fe por debajo de 25 μM genera una baja de concentración de clorofila para la planta de alfalfa.

VI.2 ABSTRACT

The Fe is an essential nutriment virtually all the alive beings, since it is used in endless ones of biological functions, in the alfalfa the deficiency of this nutriment causes ferric chlorosis, that consists on the yellowing of the leaves and later a lost one of them. On the other hand, we know that the Fe is one of abundant minerals but in the nature, near 5% of the terrestrial crust, nevertheless, to a small percentage this available one for the plants. In this work the susceptibility of the alfalfa to Fe starvation was evaluated. Ferric citrate (soluble) and ferric hydroxide (insoluble) to diverse concentrations were employed, using as response parameters the shoots length and the leaves concentration of chlorophyll . The ferric citrate was better Fe source in comparison with the ferric hydroxide only on concentrations of 75 μM reached 7.8 cm of length against 5.1 cm of the treatment of ferric hydroxide 75 μM . If only the variable concentration of Fe is considered, 25 μM is the best concentration for the plant growth. Fe source did not produce detectable effect on chlorophyll concentration but Fe concentrations below 25 μM generate deficiencies of chlorophyll concentration for the lucerne plant.

VI.3 INTRODUCCION

El Fe es un nutrimento esencial virtualmente para todos los seres vivos (Schmidt, 2003) ya que se emplea en un sin fin de funciones biológicas., En plantas la falta de este nutrimento provoca clorosis férrica (Mengel, 2001), ya que el Fe participa en la síntesis de la clorofila. A pesar de que el Fe es muy abundante en la naturaleza por debajo del Si y Al, es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, los contenidos de Fe en el suelo son alrededor de 1 a 5%, sin embargo, el contenido total en Fe no es útil como índice para conocer su disponibilidad para la planta ya que éste se encuentra en forma férrica, la cual es insoluble y por tanto indisponible (Mengel, 2001). Por esta razón en este trabajo se determinó la susceptibilidad de la alfalfa al estrés por falta de Fe en sus primeras etapas de crecimiento evaluando con 2 fuentes de Fe, una soluble y otra insoluble, con la finalidad de conocer la concentración adecuada de Fe en el medio y así eficiente su desarrollo.

Tabla *i* Concentración de Fe en algunos medios de cultivo para plantas

FUENTE	µM de Fe	referencia
Hoagland	20	Roshon et al, 1996
Murashige-Skoog	100	Murashige y Skoog (1962)
Schenk y Hildebrandt	55	Schenk y Hildebrandt 1972

Una observación de las diferentes concentraciones de Fe en los medios de cultivo para plantas más usados (Tabla *i*) nos indican la concentración de Fe adecuada en el medio, quedando en evidencia que la concentración mínima para la planta es arriba

de 20 μM de Fe. Smith et al (1984) reportan para alfalfa a pH 7, una concentración mínima de citrato férrico de 33 μM para evitar retrasos en el crecimiento vegetal.

En este trabajo valoramos 2 fuentes de Fe, una insoluble (hidróxido ferrico) y una soluble (citrato ferrico) a distintas concentraciones que van de 0 a 75 μM .

VI.4 MATERIALES Y METODOS

Semillas y condiciones de cultivo

Se seleccionaron semillas de alfalfa variedad Española (*Medicago sativa* var Española), ya que son semillas de talla pequeña, fáciles de germinar y son consideradas sensibles al estrés por Fe. Las semillas fueron facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias Forestales de la U.M.S.N.H.

Las semillas se esterilizaron superficialmente, 5 min en alcohol al 70% y 7 min en hipoclorito al 20%, enjuagándose al final 5 veces con agua destilada estéril. ya estériles las semillas se sembraron en la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) que tiene la característica de poseer los macronutrientes y micronutrientes que la planta requiere, la composición de la solución nutritiva de Hoagland esta indicada en la Tabla ii.

El Fe presente en esta formulación no fue incluido ya que se adiciono en forma de hidróxido férrico, siendo una forma de Fe insoluble ó citrato férrico como fuente de Fe soluble. La solución se agregó fitagar/L a una concentración de 0.02 % p/V material solidificante inerte para la planta, el pH del medio se ajustó a 7 con NaOH.

Se emplearon frascos de vidrio de 18 cm de alto/6 cm de ancho y se les agregó 140 ml de la solución nutritiva de Hoagland sin Fe.

Los frascos con el medio nutritivo a una autoclave a 15 libras de presión/15 min/120°C.

Las concentraciones de Fe empleadas en el diseño experimental fueron las siguientes:

Citrato férrico: 0 μM , 10 μM , 15 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM

Hidróxido férrico: 0 μM , 10 μM , 15 μM , 25 μM , 50 μM , 75 μM

Las plantas de crecieron en condiciones de luz de 24hrs a temperatura constante de 28 °C durante 25 días.

Tabla ii. Composición del Medio de Hoagland

Compuesto	Cantidad
KNO_3	1,02 grs/l
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,492 grs/l
$\text{NH}_4\text{H}_2(\text{PO}_4)$	0,23 grs/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,49 grs/l
H_3BO_3	2,86 mgrs/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,81 mgrs/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08 mgrs/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,22 mgrs/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,09 mgrs/l

Determinación del efecto del pH del medio en el crecimiento de las plantas a diferentes concentraciones de Fe (III).

Se utilizaron 4 tratamientos a distintas concentraciones de Fe (III): tratamiento de citrato férrico más 50 mM de Tris, tratamiento de citrato férrico sin Tris, tratamiento de

hidróxido férrico más 50 mM de Tris y un último tratamiento de hidróxido férrico sin Tris. Las concentraciones tanto de citrato como de hidróxido férrico fueron de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8 μ M con Tris y sin Tris.

Se realizaron replicas de 4 en los frascos ya mencionados, 5 plantas por frasco, en condiciones de esterilidad, el pH del medio se ajustó a 8.

A los 5, 10, 15, 20 y 25 días se midió la longitud de la parte aérea, que va desde la base hasta la hoja más distal, y a los 25 días se midió el peso y longitud de la parte aérea y concentración de clorofila.

Se realizaron 4 replicas par cada tratamiento.

A los 5, 10, 15, 20 y 25 días se midió la longitud de la parte aérea, que va desde la base hasta la hoja más distal, y a los 25 días se midió el peso y longitud de la parte aérea y concentración de clorofila.

La cuantificación de clorofila se realizó de acuerdo a una modificación de la técnica de Jeffrey y Humphrey (1975), en donde la parte aérea se coloca en tubos eppendorf de 1.5 ml, se le adiciona 1 ml de acetona y se muele vigorosamente, se deja reposar 24 hrs a -4°C y posteriormente se toma una muestra de 0.1 ml que se coloca en una celdilla de cuarzo con 0.9 ml de acetona y se mide la absorbencia a 652 nm utilizando al fórmula siguiente:

Clorofila Total en la celdilla (mg/L) = $A_{652} \cdot 36$ (Jeffrey y Humphrey, 1975).

La clorofila en $\mu\text{g/g}$ de tejido aéreo se calculó tomando en cuenta la cantidad de tejido aéreo empleado para extraer la clorofila en un ml de acetona.

Se utilizó el paquete estadístico “STATISTICA” por el cual se analizaran los datos mediante un análisis de varianza y Prueba de Duncan con una Significancia de 0.05

VI.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de 25 días de edad, la alfalfa crecida con citrato férrico resultó ser una fuente de Fe más asimilable para la planta que el hidróxido férrico solo en algunos casos, reflejándose en proporcionar una mayor talla de la parte aérea de la planta, en concentraciones de 25 y 75 μM , con medias de 7.66 y 7.88 cm. respectivamente para el tratamiento de citrato férrico en comparación con las medidas del hidróxido férrico a las mismas concentraciones que fueron de 7.3 y 5.1 cm respectivamente (Tabla 1). Sin embargo la diferencia entre el valor máximo (7.88 cm) obtenido con citrato férrico y el valor máximo obtenido con hidróxido férrico (7.3 cm) no fue significativa.

Fenómenos similares ya se han visto en otros trabajos en donde la escasez de Fe genera problemas de crecimiento para la planta (Mahmoudi et al, 2005, Chatterjee, 2006) y por su parte el citrato incrementa la absorción de Fe en la raíz (Brown et al, 1971).

Algo que resultó notorio es la escasa talla producida en experimentos con concentraciones de 10 y 15 μM ya sea de Hidróxido férrico o de citrato férrico, siendo aun menores a la de las plantas sin hidróxido férrico o de citrato férrico.

Tabla 1. Longitud del tejido aéreo de plántulas de alfalfa a los 25 días de edad

Tratamiento	μM	Longitud media	
Fe(OH)3	10	2.7	a
Fe(OH)3	15	2.8	a
Cit-FeIII	15	3.0	a
Cit-FeIII	10	3.2	a
Fe(OH)3	75	5.2	b
Fe(OH)3	50	6.3	b c
Fe(OH)3	0	6.3	b c
Cit-FeIII	0	6.3	b c
Cit-FeIII	50	7.3	c d
Fe(OH)3	25	7.4	c d
Cit-FeIII	25	7.7	c d
Cit-FeIII	75	7.9	d

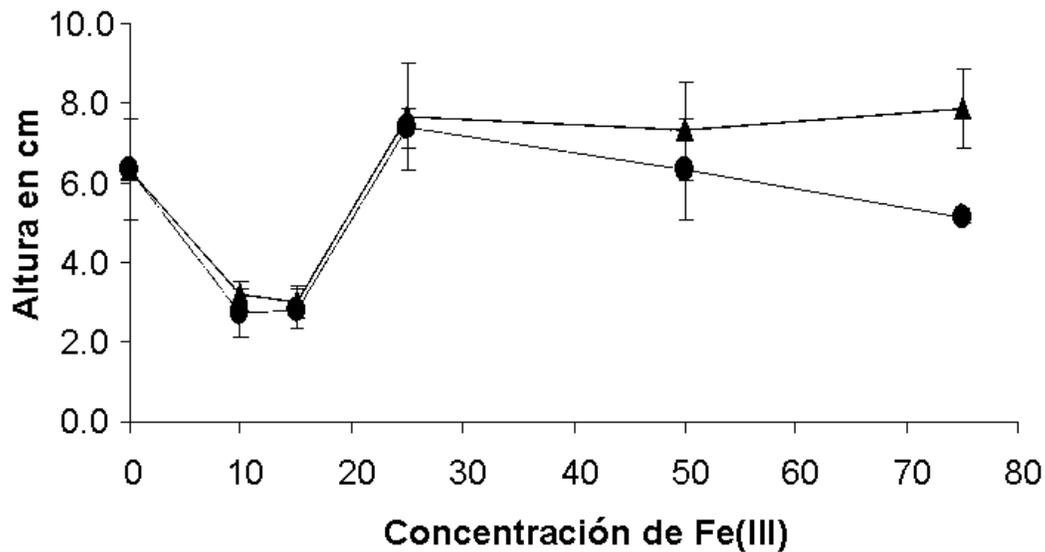
Fe(OH)3: Hidróxido Férrico, Cit-FeIII Citrato Férrico

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $p < 0.05$)

Lo anterior se explica porque los requerimientos de Fe deben ser por arriba de 20 μM (Roshon et al, 1996), lo cual se encuentra ligeramente por encima de lo requerido pero suficiente para generar déficit en el crecimiento, ya que a partir de 25 μM de citrato férrico la planta aumenta considerablemente su desarrollo.

En la gráfica 1 los datos nos muestran el comportamiento de la planta. Por otro lado, en concentraciones inferiores a 25 μM no se encontraron diferencias significativas, siendo 25 μM de citrato férrico la concentración mínima para que la planta no presente deficiencia de Fe, ya que al parecer concentraciones por encima de esta no hay diferencias, lo mismo se observa si tomamos en cuenta la variable concentración

de Fe (Gráfica 2), observándose una ligera tendencia a la disminución en el tratamiento de hidróxido férrico. Erin L. y Mary L. en el 2002 mencionan la existencia de un potencial de toxicidad asociado con altos niveles de Fe. Sin embargo, concentraciones por debajo de 25 μM resultaron ser de poca productividad para la planta de alfalfa, siendo valores estadísticamente menores al resto.



Gráfica 1. Longitud de la parte aérea de las plantas de alfalfa a 25 días de edad. Tratamientos citrato férrico ▲ hidróxido férrico ●

En cuanto a las mediciones de clorofila, se observó que las concentración de clorofila de las plantas de alfalfa de los tratamientos de citrato e hidróxido férrico resultaron ser estadísticamente distintos en varias concentraciones, teniendo que 50 μM de hidróxido férrico y 75 μM citrato férrico presentan los valores más altos de cada tratamiento, siendo de 86.5 $\mu\text{g/g}$ para hidróxido férrico 50 μM y 81.8 $\mu\text{g/g}$ (tabla 2) para citrato férrico 75 μM . En contraste con los tratamientos con concentraciones por debajo de 15 μM , siendo los valores más bajos, incluyendo concentraciones de 0 μM . Un efecto similar se observa al considerar únicamente la variable concentración de

Fe (Gráfica 3), en la cual cantidades de Fe inferiores de 25 μM generan deficiencias en el desarrollo, siendo 75 μM de Fe la mejor concentración en cuanto a la concentración de clorofila.

Tabla 2. Concentración de Clorofila en el tejido aéreo de plántulas de alfalfa a los 25 días de edad ($\mu\text{g/g}$),

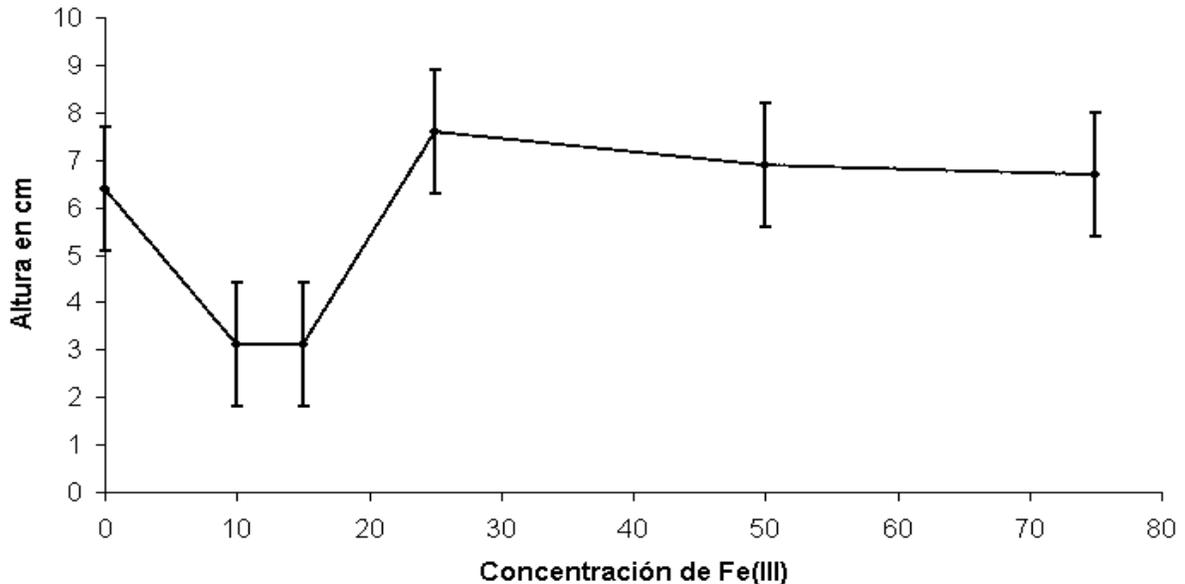
Tratamiento	Concentración Fe	Concentración de clorofila $\mu\text{g/g}$
Cit-FeIII	15 μM	34.12 a
Fe(OH) ₃	0 μM	41.11 a b
Cit-FeIII	0 μM	41.11 a b
Cit-FeIII	10 μM	43.78 a b
Fe(OH) ₃	10 μM	46.45 a b c
Fe(OH) ₃	15 μM	53.25 a b c d
Cit-FeIII	50 μM	67.15 a b c d
Cit-FeIII	25 μM	70.59 b c d
Fe(OH) ₃	25 μM	73.06 b c d
Fe(OH) ₃	75 μM	78.35 c d
Cit-FeIII	75 μM	81.88 d
Fe(OH) ₃	50 μM	86.53 d

Fe(OH)₃: Hidróxido Férrico, Cit-FeIII Citrato Férrico

[†] Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $p < 0.05$)

La biomasa de los tratamientos con hidróxido férrico y citrato férrico se comportaron de manera similar a los presentados en la tabla 2, siendo las concentraciones 0, 10 y 15 μM la más bajas tanto para citrato como para hidróxido férrico y el tratamiento de citrato férrico 75 μM la planta de mayor biomasa, arrojando valores de 59 mg en

contraste con 33 mg de los tratamientos 0 μM . estos resultados nos hablan de la importancia de la presencia del Fe para la planta y de las concentraciones mínimas de Fe que deben presentarse en el ambiente para un mejor desarrollo.



Grafica 2. Longitud del tejido aéreo de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Variable concentración de Fe. Las barras representan intervalos de confianza para la media por LSD $\alpha < 0.05$

Al observar el comportamiento en concentraciones de 10 y 15 μM tanto de citrato como de hidróxido férrico en cuanto a la longitud y la biomasa de la planta, se ve que estas se encuentran por debajo de valores de cero, lo cual creemos que se debe el diseño del experimento, ya que es posible que el número de muestras no hallan sido las suficientes para evitar estos detalles que en ocasiones ocurren. Esta situación no se observa en la concentración de clorofila, como puede apreciarse en la gráfica 3, que muestra la variación de la concentración de clorofila entre plantas crecidas a distintas concentraciones de Fe (III) sin importar la fuente de este.

Tabla 3. Biomasa del tejido aéreo a los 25 días de edad

Tratamiento	Concentración	gramos		
Fe(OH) ₃	15	0.19	a	
Cit-FeIII	15	0.21	a b	
Cit-FeIII	10	0.22	b c	
Fe(OH) ₃	10	0.23	c	
Fe(OH) ₃	0	0.33	d	
Cit-FeIII	0	0.33	d	
Fe(OH) ₃	50	0.41	e	
Fe(OH) ₃	25	0.46	f	
Cit-FeIII	25	0.48	g	
Fe(OH) ₃	75	0.52	h	
Cit-FeIII	50	0.53	h	
Cit-FeIII	75	0.59	i	

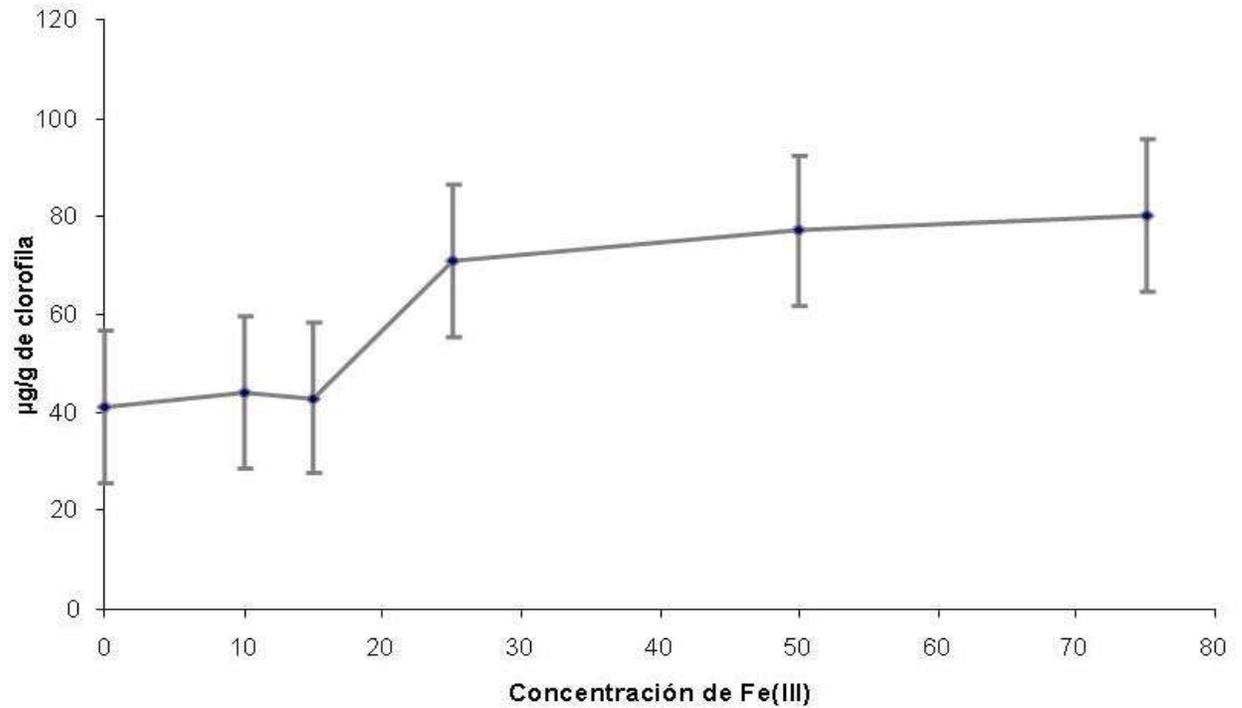
Fe(OH)₃: Hidróxido Férrico, Cit-FeIII: Citrato Férrico

† Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan p < 0.05)

Determinación del amortiguamiento del pH en el crecimiento de las plantas a diferentes concentraciones de Fe (III).

Los datos generados en éste experimento nos revelan la importancia del Fe para la planta, ya que al observar la tabla 4 tenemos que los tratamientos con la fuente de Fe más TRIS son los valores más bajos en cuanto a la longitud de la parte aérea, la razón de esto es que el TRIS es un amortiguador del pH del medio y la planta aún usando una estrategia I, no fue capaz de bajar el pH (que fue de 8) mediante la extrusión de protones por la raíz y la excreción de ácidos orgánicos (Connolly et al,

2002), esto da como resultado plantas sin posibilidades de reducir y tomar hierro. Aunado a esto, deficiencias de Zn, P y Mn también se presentan en condiciones de pH 8, lo cual aumenta el nivel de hostilidad en el medio para la planta.



Grafica 3. Concentración de clorofila de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Variable concentración de Fe. Las barras representan intervalos de confianza para la media por $LSD \alpha < 0.05$

Tabla 4. Longitud de plantas de alfalfa a los 25 días de crecimiento

Tratamiento		Longitud (cm)								
Cit-FeIII TX	0.5	0.3	a							
Cit-FeIII TX	1.0	0.4	a							
Fe(OH) ₃ TX	0.5	0.4	a	b						
Cit-FeIII TX	1.5	0.5	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	1.0	0.6	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	15.0	0.6	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	10.0	0.7	a	b	c					
Cit-FeIII TX	15.0	0.8	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	8.0	0.8	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	20.0	0.9	a	b	c					
Cit-FeIII TX	20.0	0.9	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	6.0	1.0	a	b	c					
Cit-FeIII TX	10	1.0	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	1.5	1.1	a	b	c					
Fe(OH) ₃ TX	4.0	1.1	a	b	c					
Cit-FeIII TX	6.0	1.3	a	b	c	d	e			
Cit-FeIII TX	8.0	1.3	a	b	c	d				
Cit-FeIII TX	4.0	1.4	a	b	c	d	e	f		
Fe(OH) ₃ TX	2.0	1.6		b	c	d	e	f		
Cit-FeIII TX	2.0	1.6			c	d	e	f		
Fe(OH) ₃ TX	0.0	2.2				d	e	f	g	
Cit-FeIII TX	0.0	2.2				d	e	f	g	
Cit-FeIII	0.5	2.4					e	f	g	h
Fe(OH) ₃ ³	1.0	2.4						f	g	h
Fe(OH) ₃	8.0	2.9							g	h
Fe(OH) ₃	1.5	3.0							g	h
Fe(OH) ₃	0.5	3.1							g	h
Fe(OH) ₃	2.0	3.2							g	h
Fe(OH) ₃	15.0	3.2							g	h
Fe(OH) ₃	4.0	3.2							g	h
Cit-FeIII	8.0	3.3							g	h
Fe(OH) ₃	6.0	3.3							g	h
Cit-FeIII	1.5	3.3							g	h
Cit-FeIII	4.0	3.3							h	i
Fe(OH) ₃	20.0	3.4							h	i
Cit-FeIII	6.0	3.4							h	i
Cit-FeIII	20.0	3.4							h	i
Cit-FeIII	2.0	3.5							h	i
Cit-FeIII	15.0	3.6								i
Fe(OH) ₃	10.0	3.6								i
Cit-FeIII	1.0	3.6								i
Cit-FeIII	10.0	3.9								i
Fe(OH) ₃	0.0	4.6								g
Cit-FeIII	0.0	4.6								g

[†]Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05.

En la tabla 5 se reporta la biomasa de las plantas sometidas a este mismo tratamiento. Al comparar las 2 tablas (4 y 5), podemos ver claramente el mismo comportamiento, ya que los tratamientos con TRIS se encuentran estadísticamente por debajo de los tratamientos que no lo tienen, lo cual nos habla de que el Fe contribuye enormemente al desarrollo de la planta (Mengel, 2001), ver imagen1.

La cantidad de clorofila en el tejido proporciona datos poco uniformes (tabla 6), ya que encontramos tratamientos con TRIS y sin TRIS en grupos con diferencia significativa y sin diferencia, este fenómeno creemos que es similar al experimento anterior, en el cual la distribución de la clorofila se encuentra en distintos volúmenes de tejido vegetal (paradoja de la clorosis), (Mengel, 2001), ya que la cantidad de clorofila no es en este caso directamente proporcional a la biomasa. El bajo contenido de clorofila es debido a la poca disponibilidad de Fe en el medio, ya que las concentraciones iban de 0 a 20 μM y a un pH de 8 la solubilidad por parte del medio y la capacidad de la planta para obtenerlo era limitada.

Tabla 6. Concentración de clorofila ($\mu\text{g/g}$), a 25 días de edad de las plantas

Tratamiento	Conc. $\mu\text{M Fe}$	ug/g clorofila						
Cit-FeIII TX	10	0.09	a					
Cit-FeIII TX	15	0.21	a					
Cit-FeIII TX	20	0.25	a					
Fe(OH) ₃ TX	1	0.27	a					
Cit-FeIII TX	1	0.33	a					
Fe(OH) ₃ TX	1.5	0.34	a					
Fe(OH) ₃ TX	10	0.36	a					
Fe(OH) ₃ TX	15	0.37	a					
Fe(OH) ₃ TX	0.5	0.48	a					
Cit-FeIII TX	1.5	0.74	a					
Fe(OH) ₃	10	1.04	a					
Fe(OH) ₃ TX	4	1.05	a					
Cit-FeIII TX	8	1.10	a					
Cit-FeIII	0.5	1.14	a					
Fe(OH) ₃	20	1.23	a					
Fe(OH) ₃ TX	6	1.28	a					
Cit-FeIII	1.5	1.29	a					
Cit-FeIII	1	1.45	a	b				
Fe(OH) ₃	15	1.49	a	b				
Fe(OH) ₃ TX	2	1.57	a	b		d		
Cit-FeIII	20	1.76	a	b	c	d		
Cit-FeIII	15	1.76	a	b	c	d		
Cit-FeIII TX	0.5	1.80	a	b	c	d		
Cit-FeIII TX	6	2.14	a	b	c	d		
Fe(OH) ₃ TX	8	2.18	a	b	c	d		
Fe(OH) ₃	6	2.71	a	b	c	d	e	
Fe(OH) ₃	4	2.76	a	b	c	d	e	f
Fe(OH) ₃	8	2.77	a	b	c	d	e	f
Cit-FeIII TX	4	2.78	a	b	c	d	e	f
Cit-FeIII TX	2	2.82	a	b	c	d	e	f
Fe(OH) ₃	2	2.97	a	b	c	d	e	f
Fe(OH) ₃ TX	20	3.00	a	b	c	d	e	f
Cit-FeIII	10	3.26	a	b	c	d	e	f
Fe(OH) ₃	1	4.85		b	c	d	e	f g
Fe(OH) ₃	0	5.08			c		e	f g
Cit-FeIII	0	5.08			c	d	e	f g
Fe(OH) ₃ TX	0	5.21			c		e	f g
Cit-FeIII TX	0	5.21			c		e	f g
Fe(OH) ₃	0.5	5.74					e	f g
Cit-FeIII	4	6.20					f	g
Fe(OH) ₃	1.5	7.31						g h
Cit-FeIII	2	9.58						h
Cit-FeIII	8	9.66						h
Cit-FeIII	6	12.76						i

^TValores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05.

Cit-FeIII: Citrato Férrico; Fe(OH)₃: hidróxido Férrico; TX: TRIS;

Al comparar las tablas de este experimento se puede ver que tanto el pH como la concentración de Fe (III) en el medio son factores limitantes para el desarrollo de la planta, ya que el pH óptimo para la planta de alfalfa es de 7.2 y de la misma manera, concentraciones por debajo de 10 μM se vuelven perjudiciales para la planta, en resumen podemos decir que los factores que amedrentaron el desarrollo de la planta fueron en primera la deficiente cantidad de Fe en el medio, ya que como hemos visto anteriormente, concentraciones de Fe por debajo de 20 μM son insuficientes en medios de cultivo (Roshon et al, 1996), en segundo, sumado al primer factor, el pH, ya que hemos mencionado con anterioridad que el ideal es de 7.2 y en este experimento se ajustó a 8, provocando que se precipite el poco Fe disponible (Mengel, 2001).

VI.6 CONCLUSIONES

-El citrato férrico resultó ser una mejor fuente de Fe solo a 75 μM , en cuanto a la longitud del tallo que hidróxido férrico 75 μM .

-Considerando la variable concentración de Fe, concentraciones por debajo de 25 μM son insuficientes para un óptimo desarrollo de la planta.

-A un pH de 8, ninguna concentración de Fe probada permitió un crecimiento adecuado de la planta.

-La anulación de la capacidad de la alfalfa para acidificar el medio producido por la adición de TRIS, agravó la falta de desarrollo de la planta.

VI.7 LITERATURA CITADA

1. asufrar.com.ar/index.html
2. Brown J.C. y Chaney L.R. 1971, Effect of Fe on the Transport of Citrate into the Xylem of Soybeans and Tomatoes, Plant Physiol.
3. Carrillo G, Muñoz J.J, Ruiz D.L. Müller R. 2002, Alfalfa growth promotion by bacteria grown under Fe limiting conditions, Adv in env res,6 391-399
4. Chatterjee C. Gopal R. y Dube B.K. 2006, Impact of Fe stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.) Scientia Horticulturae , Volume 108, Issue 1, Pages 1-6
5. Connolly E.L. y Guerinot M.L, 2002, Iron Stress in Plants. Genome biology. 1024.1-1024.4
6. de Felipe A. M, 2004, Interacciones Microorganismo-Suelo-Planta en la Preservacion del Medio Ambiente y la Salud. An. R. Acad. Nac. Farm., 70: 743-776
7. Guan L, Kanoh K y Kamino K. 2001, Effect of the Exogenous siderophores on Fe uptake activity of marine bacteria under Fe- limited conditions. Appl. Envir. 4:1710-1717
8. Hernandez C. 2006. Influencia de las rizobacterias ferrirreductoras en la disponibilidad de Fe en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. v. Flor de Mayo Bajío), UMSNH
9. Hoagland, D. R. y Arnon D. I., 1950, The water-culture method for growing plant without soil. California. College of Agric. Univ. Circular 347.
10. <http://www.cervantesvirtual.com>
11. Jeffrey y Humphrey, 1975, Biochem. Biophys. Phlanz. 167:191-194.

12. Kirk L.J, Klironomos J. N , Lee H, Trevors J. T. 2005, The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil, *Environmental Pollution*.
13. Mahmoudi H, Ksouri R, Gharsalli M, Lachaal M, 2005, Differences in responses to Fe deficiency between two legumes: lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*). *J Plant Physiol*. Nov;162(11):1237-45.
14. Mengel K. 2001, *Principles of plant Nutrition*. Kluwer Acad. Publi. 5ta ed.
15. Murashige T. y Skoog F. M, 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-479.
16. O'Sullivan, D.J. O'Gara, F, 1992, Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev*. 56 662-676
17. Roshon R.D, Stephenson GR, Horton RF, 1996, Comparison of five media for the axenic culture of *Myriophyllum sibiricum* Komaraov. *Hydrobiologia*. 340:17-22.
18. Schenk R. U. y Hildebrandt A. C., 1972, Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures, *Can. J. Bot*. 50:199-204.
19. Valencia C.E, Hernandez C.E, Velazquez B.C, Lopez M.J, Alfaro C.R. y Lopez B.J. 2007, Role of dissimilatory fermentative Fe-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant soil*. 291: 263-273
20. Velásquez B.C, 2003, Contribución de las bacterias ferrirreductoras al suministro de Fe en plantas de maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), UMSNH.
21. Wolfgang Schmidt, 2003, Fe solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants, *Trends in Plant Science*. Vol.8 No.4 April 188-193

CAPITULO 2

Determinación del efecto de la inoculación de alfalfa con cepas ferrirreductoras *in vitro*.

VI.8 RESUMEN

Los suelos de cultivo de gran parte del territorio nacional, presentan condiciones de alta alcalinidad, lo cual es un problema ya que año tras año se invierten millones de pesos para solucionar este problema, ya que diversos nutrientes pierden su solubilidad a altos niveles de pH, uno de estos minerales es el Fe, el cual es esencial para el desarrollo de las plantas. En este trabajo se evaluó el uso de una herramienta biológica que solvente este problema de baja disponibilidad de Fe. Cuatro rizobacterias ferrirreductoras (cepas UMCV) fueron empleadas como inóculo para plantas de alfalfa. Los parámetros analizados fueron la longitud de la planta y la concentración de clorofila en hojas. Las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 en presencia de Fe mostraron un mayor desarrollo que las plantas no inoculadas con esta cepa, o sin Fe, siendo 25 μM de hidróxido férrico la concentración ideal para generar un mayor crecimiento. El resto de las cepas UMCV mostraron en general un efecto de promotor de crecimiento no siempre estadísticamente significativo. En lo que respecta a la concentración de clorofila se vio que la cepa UMCV2 mostró las concentraciones más altas que el resto de los tratamientos y que del control sin inocular, siendo en esta ocasión 75 μM de hidróxido férrico la mejor concentración.

VI.9 ABSTRACT

The agriculture soil of the most part of Mexican territory, presents conditions of alkalinity, which is a problem that all the years costs million of Mexican pesos, since a diverse of nutrients loses their solubility at high levels of pH, one of these minerals is the Fe, which is essential for the development of the plants. In the present work the utility of a biotechnological tool for resolve this problem was evaluated. Four rhizobacterial Fe-reducing (UMCV) were used as inocule for alfalfa plants. The analyzed parameters were the length of the shoots and the leaves chlorophyll concentration. The plants inoculated with stains UMCV2 in tratmes added with Fe showed a greater development than the plants that did not inoculated wit that strain or without Fe, being 25 μM of ferric hidroxid the ideal concentration to generate a greater growth. The rest of UMCV stains showed in general a plant growth promote effect but not always statistically significant. Chlorophyll concentration in plants inoculated with the stain UMCV2 in treatments added with Fe was always higher than in plants uninoculated, inoculated with other strains or in treatments without addition of Fe, being in this occasion 75 μM of ferric hydroxide the best concentration.

VI.10 INTRODUCCION

La alfalfa es uno de los cultivos más importantes en el mundo, ya que es un cultivo muy extendido en los países de clima templado, tales como Francia Italia y con climas más cálidos como Grecia y México (Carrillo et al, 2002), sin embargo, esta requiere de condiciones muy particulares para su óptimo desarrollo, tales como la radiación solar, La temperatura y el pH, que este ultimo es considerado un factor limitante en el cultivo de la alfalfa, ya que el pH óptimo del cultivo es de 7.2, recurriendo a encalados siempre que el pH baje de 6.8, además los encalados contribuyen a incrementar la cantidad de iones de calcio en el suelo disponibles para la planta y reducir la absorción de aluminio y manganeso que son tóxicos para la alfalfa. En condiciones de alta alcalinidad la solubilidad del Fe se reduce generando deficiencias en el crecimiento de las plantas (Connolly et al, 2002), por otro lado, existen microorganismos capaces de solventar el problema de solubilidad de Fe para la planta, tal es el caso de distintas cepas bacterianas rizosfericas que se encuentran en el agua y en el suelo (O'Sullivan y O'Gara, 1992), (de Felipe, 2004), nosotros utilizamos las rizobacterias UMCV, que se sabe poseen actividad de ferrirreducción (Valencia et al, 2007) para evaluar su participación en el suministro de Fe en plántulas de alfalfa crecidas *in Vitro*, con la finalidad de conocer y aprovechar su función como cepas que solubilizan el Fe y promotoras de crecimiento para el mejoramiento de la alfalfa.

VI.11 MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron semillas de alfalfa variedad Española, ya que son semillas de talla pequeña, fáciles de germinar y son consideradas sensibles al estrés por Fe. Las semillas fueron facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias Forestales de la U.M.S.N.H. se utilizaron las cepas UMCV aisladas previamente (Velázquez et al, 2003), tienen la característica de ser bacterias rizosfericas y ferrirreductoras. Las plantas se crecieron en el medio nutritivo de Hoagland modificado, ya descrito en el capítulo 1.

Las semillas se esterilizaron sometiéndolas 5 min en alcohol al 70% en agitación, 7 min en hipoclorito al 20% y finalmente se enjuaga 5 veces con agua estéril. Posteriormente, las semillas esterilizadas fueron colocadas cuidadosamente en los frascos de vidrio con el medio nutritivo también estéril, en número de 5 semillas por frasco, todo esto en una campana de flujo para evitar la contaminación. En los tratamientos de plantas inoculadas con las bacterias UMCV, las semillas se inocularon con 1 ml de agua destilada por frasco conteniendo en suspensión, según se determinó por absorbencia a 595 nm. El total de los tratamientos se colocaron en una cámara de crecimiento con condiciones de luz de 24 hrs y temperatura de 28 °C.

Se realizó un experimento factorial con dos factores, cepa bacteriana y concentración de hidróxido férrico. La matriz de tratamientos que se generó fue la siguiente:

Presencia bacteriana	Concentración de Fe (Hidróxido férrico)			
	0 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M
Ninguna				
<i>Bacillus megaterium</i> UMCV1				
<i>Arthrobacter</i> sp UMCV2				
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UMCV3				
<i>Stenotrophomonas</i> sp. UMCV4				

Se cuantificó clorofila a los 25 días de sembradas las plantas, la cuantificación se realizó de acuerdo a una modificación de la técnica de Jeffrey y Humphrey (1975), en donde la parte aérea se coloca en tubos eppendorf de 1.5 ml, se le adiciona 1 ml de acetona y se muele vigorosamente, se deja reposar 24 h a 4°C y posteriormente se toma una muestra de 0.1 ml que se coloca en una celdilla de cuarzo con 0.9ml de acetona y se mide la absorbencia a 652 nm y utilizando al formula siguiente:

$$\text{Clorofila Total en la celdilla (mg/L)} = A_{652} \cdot 36 \text{ (Jeffrey y Humphrey, 1975)}$$

La clorofila en μ g/g de tejido aéreo se calculó tomando en cuenta la cantidad de tejido aéreo empleado para extraer la clorofila en un ml de acetona.

Potencial de acidificación de la alfalfa

Se formaron tratamientos con la cepa UMCV2 y la alfalfa. Se colocaron las semillas en tubos de 25 cm de largo por 2 de ancho, en un medio a 10 μ M de Fe(III) más bromotimol, el medio se ajustó a pH 7 y 8 en tratamientos en con la cepa UMCV2 y la alfalfa. Los inóculos se realizaron suspensiones bacterianas en 1ml de agua destilada con una absorbancia de 595 nm de longitud de onda, quedando los tratamientos de la siguiente manera:

Tratamientos			
pH7	Baja de pH	pH8	Baja de pH
ALFALFA	*	ALFALFA	*
UMCV2+ALFALFA	*	UMCV2+ALFALFA	*
UMCV2	*	UMCV2	*

El experimento se llevo a cabo en condiciones de esterilidad.

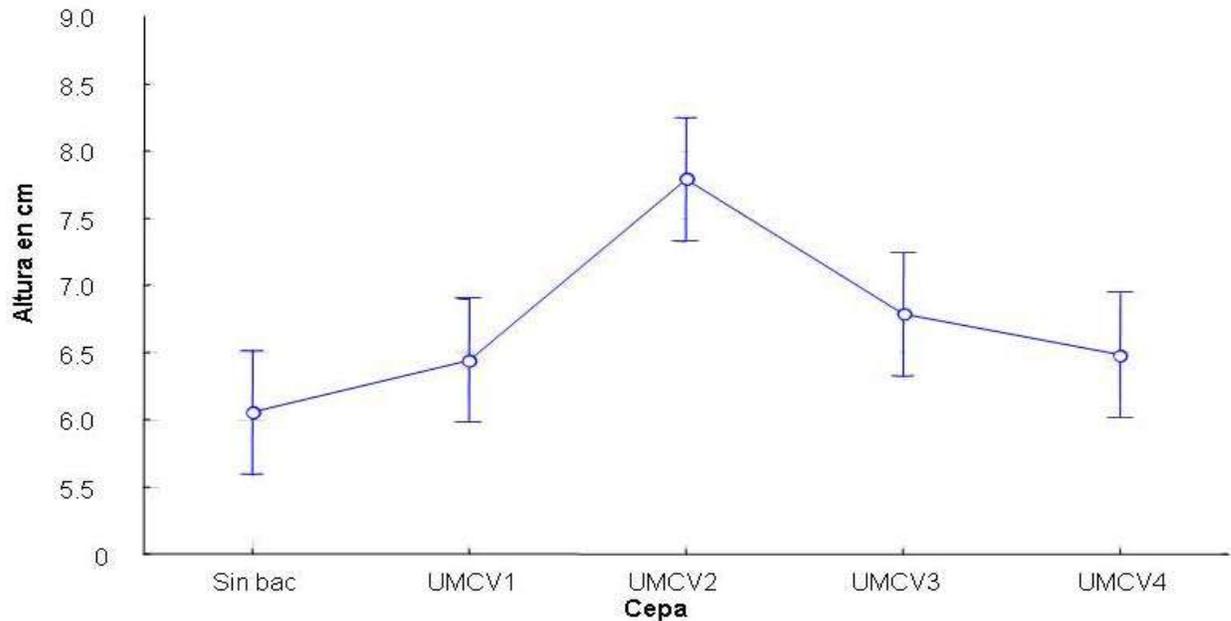
Se utilizó el paquete estadístico "STATISTICA" por el cual se analizaran los datos mediante un análisis de varianza multifactorial y Prueba de Duncan con una significancia de 0.05

VI.12 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas inoculadas con la cepa UMCV2 mostraron una mayor talla en la parte aérea que el tratamiento sin bacteria, en concentraciones superiores a 25 μM de hidróxido férrico. Esto probablemente porque esta cepa funge como promotora de crecimiento vegetal, provocando que la alfalfa crecida con el inóculo de la rizobacteria UMCV2 alcanzara tallas de 8.79, 8.25, 8.0 cm. en concentraciones de 25, 50 y 75 μM respectivamente, siendo estas las tallas las más grandes registradas en el experimento (Tabla 4). La lista de microorganismos benéficos para las plantas es amplia, (de Felipe, 2003, Montesinos et al, 2002, Alfonso, 2006), destacando cepas como *Rhizobium* (Bhuvanewari, 1977), *Franckia* (Molina, 2006), *Pseudomonas* (Carrillo, 2002), por lo cual es probable que las cepas de este experimento cumplan con la misma función.

El tratamiento con concentraciones de 75 μM de hidróxido férrico y la bacteria UMCV2, iguala la media de la longitud de la parte aérea del tratamiento con 75 μM de citrato férrico reportado en el capítulo I. Esto sugiere que la cepa en cuestión está proporcionando el Fe disponible para la planta al grado de compararse con una fuente biológicamente disponible como lo es el citrato férrico, ya que cabe recordar que la planta inoculada con UMCV2 contaba con hidróxido férrico (insoluble) como fuente de Fe. Si consideramos solo la variable cepa como fuente de variación en el experimento (ignoramos el factor concentración férrica), podemos ver como la UMCV2 se encuentra por encima del resto de los tratamientos con las otras bacterias y que con el control (gráfica 4) en cuanto a la longitud de la planta.

En cuanto a la longitud de la planta, es notorio que la UMCV2 contribuye de alguna manera al crecimiento de la planta, no obstante que Valencia et al (2007) encontrara que la Bacteria UMCV2 no produjo aumento en el crecimiento de plantas de frijol crecida en suelo alcalino en comparación con el control no inoculado.



Grafica 4. Longitud del tejido aéreo de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Variable cepa. Las barras representan intervalos de confianza para la media por LSD $\alpha < 0.05$

Autores como Carrillo (2002), Marschner (2005), muestran la influencia positiva de microorganismos rizosfericos hacia la planta en donde la presencia de estos estimula el crecimiento de la planta en diversos aspectos de su desarrollo.

El resto de las rizobacterias probadas en este experimento (UMCV1, UMCV3 y UMCV4) mostraron una tendencia similar a la de la UMCV2 pero sin ser estadísticamente superiores a los tratamientos sin bacterias y siendo estadísticamente por debajo de la bacteria UMCV2 (Tabla 7).

Una posible explicación del porque no todas las rizobacterias probadas en este experimento se comportaron de la misma manera, muy probablemente debido a que las plantas secretan exudados a través de la raíz, mediante los cuales ejercen una selección en cuanto a la colonización de la comunidad bacteriana se refiere, y por esta razón no todas las rizobacterias inoculadas en la planta de alfalfa se pudieron establecerse de manera adecuada ya que existe la posibilidad que se requiera de un mayor tiempo para la colonización, ya que esto puede variar de acuerdo a la especie de planta como de la bacteria (Kirk et al, 2005), trabajos como el de Grayston en 1997 sustentan esta idea.

En lo que respecta a la clorofila, la inoculación de la rizobacteria UMCV2 mostró un aumento en las distintas concentraciones de hidróxido férrico como fuente de Fe en relación a los tratamientos de hidróxido férrico (Tabla 5). Esto es porque seguramente la cepa UMCV2 contribuye al abastecimiento de Fe de la planta, ya que ésta rizobacteria se ha visto que contribuye a la reducción de Fe en la rizósfera (Velázquez, 2003, Hernández, 2006), la aseveración de que el estatus nutrimental en cuanto al Fe se refiere es mejor en plantas inoculadas con la bacteria UMCV2 descansa en el hecho de que la concentración de clorofila es un indicador del nutrimento porque contribuye a la síntesis de la molécula de clorofila (Guan, 2001), que al ser insuficiente se presenta clorosis férrica y la cantidad total de clorofila disminuye. Sumando el efecto visto anteriormente en donde la biomasa de la planta es mayor en relación a los otros tratamientos dando por consiguiente plantas con índices superiores de clorofila. De la misma manera si consideramos la variable cepa (gráfica 6) se aprecia claramente como la UMCV2 arroja concentraciones de clorofila por encima del resto de los tratamientos.

Tabla7. Longitud de la parte aérea de plantas de alfalfa con 25 días de crecimiento

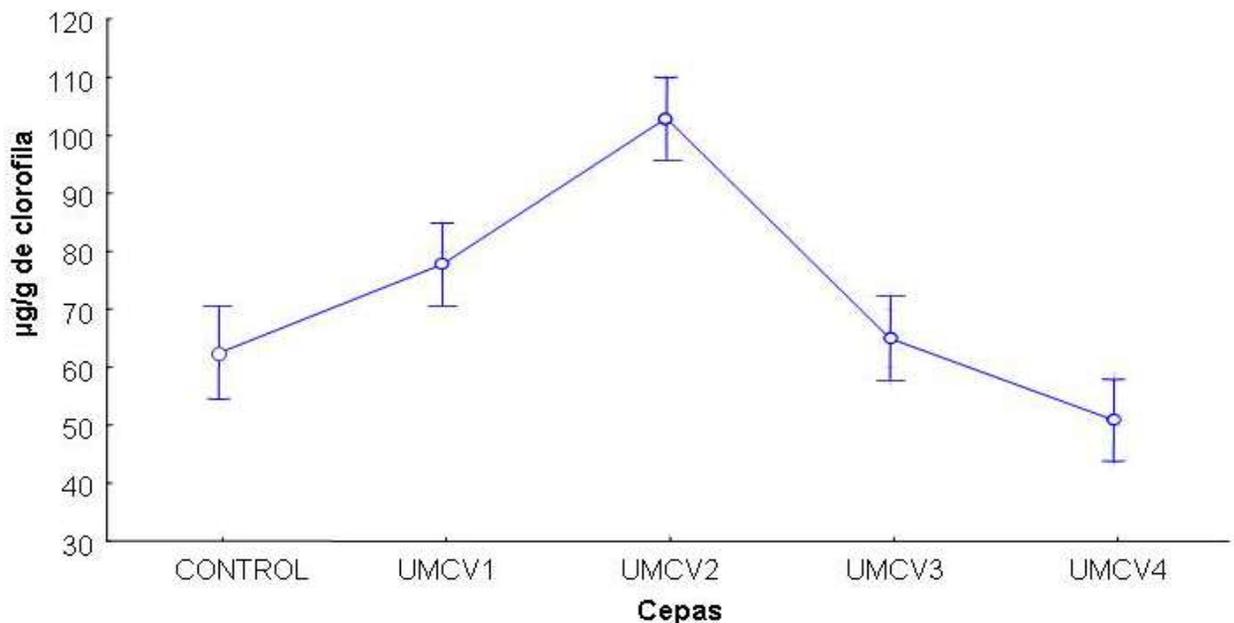
Tratamiento	Concentración	Media
UMCV2	25 μ M	8.8 a
UMCV2	50 μ M	8.3 a b
UMCV2	75 μ M	8.0 a b c
UMCV3	50 μ M	7.5 a b c d
UMCV3	75 μ M	7.4 a b c d
sin Bacteria	25 μ M	7.4 a b c d
UMCV4	75 μ M	7.3 b c d
UMCV1	50 μ M	6.9 b c d e
UMCV1	25 μ M	6.7 c d e
UMCV4	25 μ M	6.7 c d e
UMCV3	25 μ M	6.5 c d e
UMCV4	50 μ M	6.4 d e f
UMCV1	75 μ M	6.4 d e f
sin Bacteria	0 μ M	6.3 d e f
UMCV2	0 μ M	6.1 d e f
UMCV1	0 μ M	5.7 e f
UMCV3	0 μ M	5.7 e f
UMCV4	0 μ M	5.6 e f
sin Bacteria	50 μ M	5.5 f
sin Bacteria	75 μ M	5.0 f

Prueba de Duncan, sig 0.05

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales

Al comparar la eficiencia de las 4 cepas pudimos observar que nuevamente la UMCV2 obtiene valores superiores que la otras 3 rizobacterias, aún a concentración de 50 25 y 75 μM dando valores de 127.7, 126.3 y 121.9 $\mu\text{g/g}$ de clorofila respectivamente (Tabla 8), produciendo los 3 valores más altos.

En cuanto a la biomasa, podemos ver como la cepa UMCV2 también arroja valores altos: 0.235 gramos en concentraciones de 75 μM , siempre que estén en presencia del Fe, estando por encima de los tratamientos que no fueron inoculados, y con los inoculados con las otras cepas (tabla 6). De la misma manera, al considerar la variable concentración de Fe (gráfica 7) se aprecia como al ir en aumento también lo hace la biomasa, lo cual concuerda con el aumento en la longitud, siendo superiores a los tratamientos que no poseen fuente de Fe.



Gráfica 6. Concentración de clorofila de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Variable cepa. Las barras representan intervalos de confianza para la media por LSD $\alpha < 0.05$

Tabla 8. Clorofila ($\mu\text{g/g}$) a 25 días de edad

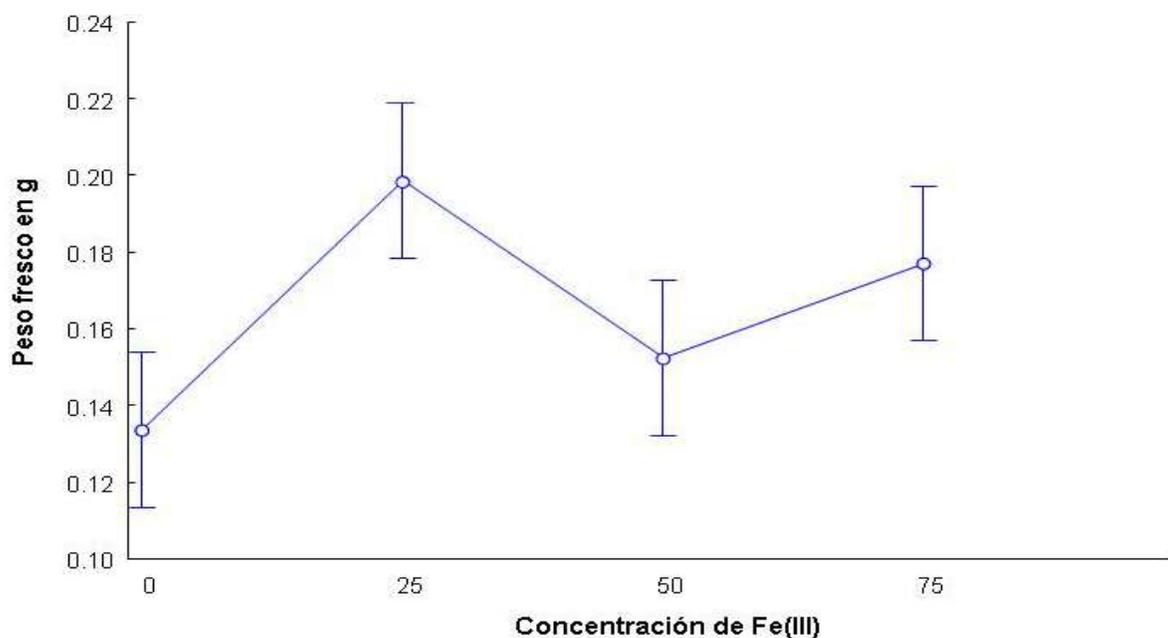
Tratamiento	Concentración	ug/g	
Sin bacteria	0	23.4	a
UMCV2	0	36.0	a b
UMCV4	50	46.0	b c
UMCV4	25	46.3	b c
UMCV3	0	50.1	b c
UMCV3	50	50.4	b c
UMCV1	0	52.2	b c
UMCV4	0	54.7	b c d
UMCV4	75	56.4	b c d e
Sin bacteria	25	61.5	c d e f
UMCV3	25	75.0	d e f g
Sin bacteria	75	78.4	e f g
UMCV1	50	79.5	f g
UMCV3	75	84.3	g
Sin bacteria	50	86.5	g
UMCV1	25	89.5	g
UMCV1	75	89.7	g
UMCV2	75	122.0	h
UMCV2	25	126.4	h
UMCV2	50	127.5	h

[†]Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05

Tabla 9. Biomasa de la parte aérea de plantas de alfalfa (gramos), a 25 días de edad

Tratamiento	μM	Gramos	
Sin Bacteria	50	0.037	a
Sin Bacteria	75	0.052	a b
UMCV4	0	0.110	b c
UMCV1	0	0.120	b c d
UMCV3	0	0.136	c d e
Sin Bacteria	0	0.142	c d e f
UMCV3	50	0.160	c d e f g
UMCV4	50	0.164	c d e f g
UMCV2	0	0.166	c d e f g
UMCV1	75	0.180	c d e f g
UMCV1	25	0.193	d e f g
UMCV4	25	0.196	e f g
UMCV1	50	0.201	e f g
UMCV3	25	0.202	e f g
UMCV2	25	0.202	e f g
UMCV2	50	0.204	e f g
Sin Bacteria	25	0.206	e f g
UMCV4	75	0.207	e f g
UMCV3	75	0.214	f g
UMCV2	75	0.235	g

†Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05.



Grafica 7. Biomasa de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Variable concentración de Fe. Las barras representan intervalos de confianza para la media por LSD $\alpha < 0.05$

Por otro lado, al investigar si la rizobacteria ferrirreductora *Arthrobacter* sp. UMCV2 o las plantas estaban acidificando el medio, pudimos ver lo siguiente:

Tabla 9.1. Efecto de la inoculación de la bacteria *Arthrobacter* sp. UMCV2 en el pH de la rizósfera de alfalfa.

pH7	Baja de pH		pH8	Baja de pH	
ALFALFA	6.4	a	ALFALFA	7.1	a
UMCV2+ALFALFA	6.9	b	UMCV2+ALFALFA	7.4	b
UMCV2	7	b	UMCV2	7.6	b

†Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05

En la tabla 9.1 podemos apreciar que las bacterias y la combinación de bacteria más planta son las que presentan la capacidad de acidificación más baja, siendo la planta de alfalfa por si sola la que acidifica el medio de una mejor manera, ya que es una estrategia 1 (Römheld, 1987). Con esta evidencia podemos decir que la contribución de las rizobacterias UMCV es debido a la capacidad de solubilización del medio como ya se había propuesto en otros trabajos (Hernández, 2006) y no por una actividad de acidificación.

VI.13 CONCLUSIONES

-Las cepas UMCV2 a concentraciones arriba de 25 μM de Fe incrementa la longitud de la planta de alfalfa.

-La biomasa incrementa en presencia de las cepas, en comparación con los tratamientos que no la poseen.

-Considerando la variable cepa, la UMCV2 en presencia del Fe arroja valores significativamente mayores de clorofila que el resto de los tratamientos.

-La UMCV2 no solo no acidifica la rizosfera, sino que inhibe parcialmente la capacidad de acidificación de la alfalfa.

VI.14 LITERATURA CITADA

1. asufrar.com.ar/index.html
2. Carrillo G, Muñoz J.J, Ruiz D.L. Müller R. et al, 2002, Alfalfa growth promotion by bacteria grown under Fe limiting conditions, *Adv in env. res*, 6 391-399
3. Connolly E.L. y Guerinot M.L., 2002, Iron Stress in Plants. *Genome biology*, 1024.1-1024.4
4. de Felipe A. M, 2004, Interacciones Microorganismo-Suelo-Planta en la Preservación del Medio Ambiente y la Salud. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 70: 743-776
5. Grayston S. J, Wang S, Campbell C y Edwards A. 1997. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere, *soil soil biochem*.
6. Guan L, Kanoh K y Kamino K, 2001, Effect of the Exogenous siderophores on Fe uptake activity of marine bacteria under Fe- limited conditions. *Appl. Envir.*
7. Hernandez C. 2006, Influencia de las rizobacterias ferrirreductoras en la disponibilidad de Fe en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. v. Flor de Mayo Bajío). Tesis de Maestría. IIQB-UMSNH.
8. <http://www.cervantesvirtual.com>
9. Jeffrey y Humphrey, 1975, *Biochem. Biophys. Phlantz.* 167:191-194.
10. Kirk J.L. Klironomos J. N , Lee H, Trevors J. T. 2005, The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil, *Environmental Pollution*.
11. Mengel K. 2001, *Principles of plant Nutrition*. Kluwer Acad. Publi. 5ta ed.

12. O'Sullivan D.J. y O'Gara F, 1992, Traits of fluorescent pseudomonas spp. Involved in suppression of plant root pathogens. Microbiol. Rev. 56 662-676
13. Valencia C.E, Hernandez C.E, Velazquez B.C, Lopez M.J, Alfaro C.R. y Lopez B.J., 2007. Role of dissimilatory fermentative Fe-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. Plant soil. 291: 263-273
14. Velásquez B.C. 2003, Contribución de las bacterias ferrirreductoras al suministro de Fe en plantas de maíz(*Zea mays*) y frijol(*Phaseolus vulgaris* L.), UMSNH.

CAPITULO 3

Diseño de mezcla bacteriana Fe-reductor

VI.15 RESUMEN

Los denominados consorcios bacterianos consisten en el cultivo de 2 o más miembros en el que cada organismo se beneficia de la actividad de otros. Estas asociaciones de microorganismos son en muchas ocasiones benéficas para las plantas, ya que facilitan la nutrición mineral. La idea del diseño de estos consorcios es importante para el desarrollo para las plantas de cultivo de nuestro país. En este trabajo se diseñaron mezclas de las distintas cepas UMCV con la intención de observar efectos sinérgicos en la nutrición de Fe de las plantas de alfalfa. Para ello se formaron tratamientos factoriales de las rizobacterias UMCV. Los tratamientos inoculados con las cepa UMCV2 y el consorcio UMCV1-2 desarrollaron una longitud superior al tratamiento control y al resto de los tratamientos, esto debido a que probablemente el tiempo de crecimiento de la UMCV2 es más lento que la del resto de las cepas y no tiene la capacidad de establecerse cuando las otras sí lo hacen. En cuanto a la biomasa en consorcio UMCV2-3 obtuvo el valor más alto pero siendo estadísticamente igual a los consorcios UMCV2-4 y todas las bacterias juntas. La concentración de clorofila en todos los tratamientos con el consorcio bacteriano es igual estadísticamente pero siendo todos ellos diferentes al control, lo cual indica la importancia de las bacterias para la obtención del Fe.

VI.16 ABSTRACT

The bacterial consortia consists of the culture of 2 or more bacteria in which each organism benefits from activity of others. These associations of microorganisms are in many occasions, beneficial for the plants, since they facilitate the mineral nutrition. The idea of the design of these consortia is important for the development for the plants of culture of Mexico. In this work designed mixtures of the different stains UMCV that facilitate the nutrition of the Fe. For it factorial treatments of rhizobacterial UMCV formed. The treatments inoculated with stains UMCV2 and partnership UMCV1-2 developed to a length superior to the treatment control and the rest of the treatments, this because probably the time of growth of the UMCV2 is but slow that the one of the rest of the stains and it does not have to the capacity to settle down when the others if they do it. As far as the biomass in partnership UMCV2-3 it upper obtained the value but being statistically equal to partnerships UMCV2-4 and all the together bacteria. The chlorophyll concentration in all the treatments with the bacterial partnership is equal statistically but being all of them different ones from the control, which indicates the importance of the bacteria for the obtaining of the Fe.

VI.17 INTRODUCCION

Existe en la naturaleza un gran número de asociaciones que se pueden dar entre organismos de distinta especie, orden, división, etc. sin embargo, denominamos consorcio bacteriano al cultivo de 2 o más miembros en el que cada organismo se beneficia de la actividad de otros (Madigan et al, 1999). Estas asociaciones de microorganismos son en muchas ocasiones benéficas para las plantas, ya que facilitan la nutrición mineral. Por otro lado, sabemos de las deficiencias nutrimentales de nuestros cultivos en el país, entre las cuales tenemos al Fe, a pesar de que el Fe es muy abundante en la naturaleza por debajo del Si y Al, es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, los contenidos de Fe en el suelo son alrededor de 1 a 5% , sin embargo, el contenido total en Fe no es útil como índice para conocer su disponibilidad para la planta ya que éste se encuentra en forma férrica, la cual es insoluble y por tanto indisponible para la planta (Mengel, 2001). Uno de los factores que influyen en el la disponibilidad de Fe es el contenido de arcilla y materia orgánica. En los suelos arcillosos, existe una tendencia a retener el Fe. Un contenido adecuado de materia orgánica, actúa de forma favorable en cuanto al aprovechamiento del Fe por parte del cultivo, debido a sus características acidificantes y reductoras, así como a la capacidad de determinadas sustancias húmicas para formar quelatos en condiciones adversas de pH (Mengel, 2001). En México se estima que entre un 50 a 60% del territorio posee características que favorecen la deficiencia del Fe provocando clorosis férrica, que es una condición debida a la falta de Fe, causa que las flores se pongan amarillas mientras que las venas de la hoja se mantienen verdes. Las nuevas hojas al final de las ramas son las más afectadas. En estados avanzados, la clorosis férrica causa

que el tejido de la planta muera, lo cual se manifiesta por áreas cafés quemadas en las hojas (Mengel, 2001).

La deficiencia de Fe es una fuente de numerosas pérdidas económicas para los agricultores del mediterráneo, por lo que en la actualidad se están llevando a cabo numerosas investigaciones con el fin de determinar que capacidad poseen las plantas para resistir esa falta y cómo se podría suplir. Asimismo, se están estudiando nuevas vías para el control de la clorosis férrica, con el fin de que ésta no sea devastadora para los cultivos, y se están seleccionando los que sean capaces de soportarla con mayor facilidad (Carrillo, 2002).

Por nuestra parte, estamos en busca de diseñar una mezcla de bacterias ferrirreductor que eficiente el suministro de Fe para la alfalfa, ya que se sabe de microorganismos ferrirreductores que son capaces de realizar una reducción desasimilatoria del ion férrico a ferroso (Lovley, 1993, Valencia et al, 2007) volviéndolo disponible para la planta.

VI.18 MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron semillas de alfalfa variedad Española, ya que son semillas de talla pequeña, fáciles de germinar y son consideradas sensibles al estrés por Fe. Las semillas fueron facilitadas por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias Forestales de la U.M.S.N.H. ya estériles las semillas se sembraron en la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) que tiene la característica de poseer los macronutrientes y micronutrientes que la planta requiere, como se muestra enseguida:

KNO₃	1,02 grs/l
Ca(NO₃), 4 H₂O	0,492 grs/l
NH₄H₂ (PO₄)	0,23 grs/l
MgSO₄, 7 H₂O	0,49 grs/l
H₃BO₃	2,86 mgrs/l
MnCl₂, 2 H₂O	1,81 mgrs/l
CuSO₄, 5 H₂O	0,08 mgrs/l
ZnSO₄, 5 H₂O	0,22 mgrs/l
Na₂MoO₄, H₂O	0,09 mgrs/l

el Fe presente en esta formulación no fue incluido ya que se adicionó en forma de hidróxido férrico a 10 µM, siendo una forma de Fe insoluble en concentraciones sub

óptimas. La solución se le agregó fitagar a una concentración de 0.02% p/v material solidificante inerte para la planta, el pH del medio se ajustó a 7.

Se emplearon 4 replicas por condición para cada grupo, los cuales se montaron en frascos de vidrio de 18 cm de alto X 6cm de ancho, se les agrega 140 ml de la solución nutritiva de Hoagland sin Fe.

Los experimentos se realizaron en condiciones de esterilidad, sometiendo a los frascos con el medio nutritivo a una autoclave a 15 libras de presión/15 min/120°C.

Los inoculantes bacterianos se realizaron de acuerdo a los siguientes criterios:

- i. La bacteria UMCV2
- ii. La bacteria UMCV2 con cada una de las otras 3
- iii. Todas las bacterias juntas.
- iv. Control sin inocular.

Las variables de respuesta de este experimento son las mismas que se describieron para el experimento anterior y se evaluaron bajo las mismas condiciones de tiempo.

Se utilizó el paquete estadístico "STATISTICA" por el cual se analizaron los datos mediante un análisis de varianza y Prueba de Duncan con una Significancia de 0.05

VI.19 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En lo referente a la talla de las plantas, la inoculación con la cepa UMCV2 y la inoculación mixta UMCV1-UMCV2, tuvieron un crecimiento estadísticamente superior al de las plantas sin inocular que tuvieron las tallas menores (Tabla 10).

Tabla 10. longitud (centímetros) a 25 días de edad

Tratamiento	Altura de las plantas (cm)
Control	4.00 a
Todas	4.20 a b
UMCV2-3	4.25 a b
UMCV2-4	4.33 a b
UMCV2	5.05 b
UMCV2-1	5.20 b

†Valores con la misma letra son estadísticamente iguales. Prueba de Duncan, sig 0.05

Los valores arrojados por la cepa UMCV2 en este experimento no son similares a los vistos en el experimento reportado en el capítulo 2, en el cual se tienen longitudes por encima de 8 cm. Esto se debe a que la concentración de Fe en el medio no es la misma, siendo de 25, 50 y 75 μM para aquel experimento y de 10 μM para el presente experimento, concentración que fue especialmente desfavorable para el crecimiento de la planta según se reporta en el capítulo 1.

De manera similar la inoculación de la cepa UMCV2, sola o en cualquiera de las mezclas bacterianas produjo un aumento de al menos el doble en la concentración de la clorofila de las plantas en comparación con el control no inoculado, sin embargo

todas las formulaciones bacterianas (conteniendo todas a la UMCV2) produjeron resultados estadísticamente similares (Tabla 11).

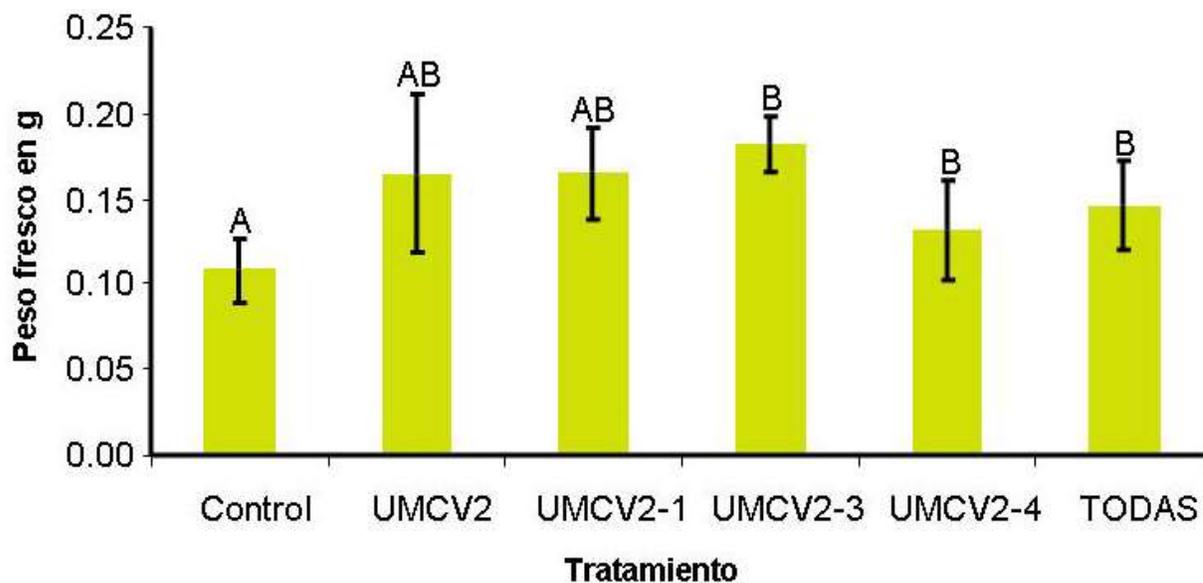
Los valores arrojados en este punto al parecer son bajos en relación con la cantidad de clorofila que la planta de alfalfa debería de presentar, pero son claramente superiores al control estéril. Con los datos arrojados podemos asumir que la presencia de las cepas contribuye a un mejor suministro de Fe (que estaba en condiciones limitantes) a la planta, situación que se manifestó como una mayor producción de clorofila y en al menos la mezcla de las cepas UMCV2-3 en una mayor producción de la biomasa.

En cuanto a la biomasa, se encontró que todos los tratamientos inoculados con la cepa UMCV2 tuvieron biomásas estadísticamente similares y solo las inoculaciones con las mezclas UMCV2-UMCV3, UMCV2-UMCV2 y la mezcla de todas las cepas UMCV tuvieron biomásas estadísticamente superiores al control sin inocular (Gráfica 8). Esto es por la carencia de Fe que la planta experimenta en su desarrollo, aunado a la baja concentración de clorofila fenómeno generado por la misma razón., ya hemos visto en otros trabajos como C. Chatterjee y colaboradores en el 2006 que la planta de *Solanum tuberosum* L. al ser desarrollada en un ambiente carente de Fe, ésta presenta déficit en la concentración de clorofila, retardo en su crecimiento entre otros. Esto parámetros si los relacionamos podemos ver como el mineral con el que trabajamos se vuelve vital para la planta en cierta concentración, pero sin embargo, la planta de alfalfa al estar expuesta a las cepas en los distintos tratamientos, se aprecia un incremento en la concentración de clorofila (Tabla 11), con valores por encima de los 40 $\mu\text{g/g}$ en contraste con los 23.3 $\mu\text{g/g}$ de clorofila obtenidos de el tratamiento control sin inocular.

Tabla 11. Concentración de Clorofila en el tejido aéreo de plántulas de alfalfa a los 25 días de edad ($\mu\text{g/g}$),

Tratamiento	Concentración $\mu\text{g/g}$
Control	23.4 a
UMCV2-4	41.6 b
UMCV2-1	41.7 b
UMCV2	44.7 b
TODAS	44.9 b
UMCV2-3	46.9 b

† Valores con la misma letra son estadísticamente iguales (Duncan $p < 0.05$)



Grafica 8. Biomasa de la parte aérea de plántulas de alfalfa a 25 días de edad. Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

En poblaciones de microorganismos, es decir, en donde coexisten mas de uno, la planta ejerce una influencia selectiva hacia la microflora bacteriana mediante la secreción de exudados (KozdroÅ , 2000, Kirk et al, 2005), lo cual es probable que un efecto similar se halla llevado a cabo en este experimento, ya que las diversas mezclas de bacterias probadas no ejercieron por igual una influencia positiva como vimos anteriormente, solo la mezcla UMCV2-1 y UMCV2-3 obtuvieron los valores mas altos en cuanto a la longitud de la planta y la biomasa respectivamente, siendo por ésta la razón del porque no todas las mezclas fueron diferentes al control sin inoculo. Destacando la capacidad de solubilizar el Fe por parte de las cepas UMCV determinante para generar un mejor desarrollo para la alfalfa (Valencia et al, 2007).

VI.20 CONCLUSIONES

- 1- Las plantas inoculadas con la rizobacteria UMCV2 solo o en combinación con las otras bacterias, desarrollan un crecimiento superior que las que no la poseen, esto en cuanto a la longitud de la planta y la concentración de clorofila.
- 2- La inoculación de las otras bacterias UMCV junto con la UMCV2 no produjo una mejora significativa en las plantas en los parámetros de talla, clorofila o biomasa.

VI. 21 LITERATURA CITADA

- 1- Chatterjee C, Gopa R. y Dube B.K. 2006, Impact of Fe stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Scientia Horticulturae* .
- 2- Daughtry C. S. T, 2000, Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration from Leaf and Canopy Reflectance., *remote sens. Environ.* 74:229–239.
- 3- Hoagland, D. R. and D. I. Arnon, 1950, The water-culture method for growing plant without soil. California. College of Agric. Univ. Circular 347.
- 4- Muñoz R.J. y Caballero M.J. 2005, La interacción de glucobacterobacter diatroficas-caña de azúcar como modelo para la transmisión de bacterias benéficas. Benemérita universidad autónoma de puebla.
- 5- Kozdro J. J. y van Elsas J.D. 2000, Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry.* 32 1405±1417
- 6- Kirk J. L. Klironomos J. N , Lee H, Trevors J. T. 2005, The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil, *Environmental Pollution*.
- 7- Mengel K. 2001, Principles of plant Nutrition. Kluwer Acad. Publi. 5ta ed.
- 8- Madigan T. M. 1999, Brock, Biología de los Microorganismos. España 8va edición, Prentice Hall.
- 9- Valencia C.E, Hernandez C.E, Velazquez B.C, Lopez M.J, Alfaro C.R. y Lopez B.J., 2007, Role of dissimilatory fermentative Fe-reducing bacteria in Fe uptake by common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown in alkaline soil. *Plant soil.* 291: 263-273

- 10- Jin C.W, He Y.F, Tang C.X, Wu P. y Zheng S.J. 2006 Mechanisms of microbially enhanced Fe acquisition in red clover (*Trifolium pratense*L.) *Plant, Cell and Environment* 29: 888–897

VII. DISCUSION GENERAL

Los valores arrojados por los tratamientos de citrato férrico fueron estadísticamente iguales en concentraciones de arriba de 25 μM , debido a que el citrato férrico es una fuente de Fe disponible para la planta (John C. Brown y Rufus L. Chaney, 1971) ya que las concentraciones de Fe adecuadas para que la planta se desarrolle son de 1.12 ppm (www.walcoagro.com), en cambio el Fe bajo la forma de hidróxido férrico es insoluble y no está al alcance de las plantas, pero al pasar el tiempo y por la acción de ciertos microorganismos y por la propia planta puede solubilizarse formando parte de quelatos orgánicos y asimilado por las plantas (Romheld 1987) Probablemente los tratamientos con hidróxido férrico tuvieron el tiempo suficiente para solubilizar el cantidad necesaria para crecer e igualarse al tratamiento de citrato férrico.

Por su parte, los tratamientos inoculados con las cepas UMCV mostraron en general un desarrollo superior al control sin inocular referente a la longitud de la planta y a la concentración de clorofila, pero destacando que la cepa UMCV2 se encontró por encima del resto de los tratamientos, esto se debe a que las plantas secretan exudados a través de la raíz, mediante los cuales ejercen una selección en cuanto a la colonización de la comunidad bacteriana se refiere, y por esta razón no todas las rizobacterias inoculadas en la planta de alfalfa se pudieron establecerse de manera adecuada ya que existe la posibilidad que se requiera de un mayor tiempo para la colonización, ya que esto puede variar de acuerdo a la especie de planta como de la bacteria (Kirk et al, 2005) siendo la UMCV2 la de mayor compatibilidad simbiótica para la planta de alfalfa. Jin et al en el 2006 proponen un modelo para la selección de la comunidad microbiológica en trébol rojo, en donde la excreción de compuestos

fenolicos ejercen una influencia sobre la selección de dicha comunidad, nosotros en éste trabajo creemos que ocurre algo similar, en donde la rizosfera de alfalfa ejerce una selección de las cepas UMCV y es la razón del porque no todas las bacterias ejercieron un efecto positivo de igual manera, ya que solo la UMCV2 lo hizo de manera significativa.

Por otro lado, los tratamientos con el amortiguador Tris, al encontrarse en un ambiente con pH8 mostraron un desarrollo inferior a los que no poseían el Tris, ya que el pH óptimo del cultivo de la alfalfa es de 7.2 (<http://www.infoagro.com>), 6.6 a 7.2 (www.agry.purdue.edu/ext/forages/Publications/). Esto ocasionó que las plantas en parámetros como longitud y concentración de clorofila fueran bajos en todas las concentraciones de Fe probadas, quedando en evidencia la poca capacidad de la alfalfa para solubilizar el Fe en ambientes de pH8 y su deficiencia para acidificar el medio.

La mezcla bacteriana UMCV1-2 produjo un mayor crecimiento a las plantas de alfalfa y el total de los consorcios desarrollados generaron una mayor concentración de clorofila comparadas con el control, quedando claro que la presencia de los consorcios benefician a la planta de alfalfa. Estos efectos ya se han visto en plantas de tomate en donde la presencia de diversas rizobacterias estimulan positivamente el crecimiento también contribuyen al estado nutricional de las mismas, generando incrementos en el rendimiento (Elein, 2006), mostrando en este trabajo que la solubilidad del Fe por parte de las rizobacterias generó los efectos ya mencionados.

VIII. CONCLUSIÓN GENERAL

La bacterias rizosférica ferrirreductora *Arthrobacter* sp. UMCV2 contribuye a la adquisición de Fe de las plantas de alfalfa crecidas in vitro durante sus primeros estadios de vida.

IX. PERSPECTIVAS

-Como consecuencias de los resultados obtenidos en este trabajo, como perspectiva se desea ampliar los tratamientos del capítulo 2, en cuanto a las concentraciones de hierro.

-Por otra parte, resulta necesario prolongar el tiempo en el cual se realizó el análisis de las plantas de alfalfa, a etapas de 40, 80 y 120 días con la finalidad de conocer si la tendencia observada en los resultados se mantiene o amplía.

-Por último realizar un estudio en la capacidad de colonización de las cepas UMCV en los tiempos marcados.

X. BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

1. Agronomy Facts, 2000, Soil fertility management for forage crops. College of Agricultural Sciences.
2. Carvalho M. F, Alves C. C. T, Ferreira M. I. M, Marco P. y Castro P. M. L. 2002, Isolation and Initial Characterization of a Bacterial Consortium Able To Mineralize Fluorobenzene, *Appl. and Envir. Microb.* 102-105
3. Crowley D. E, 1988, Root-microbial effects on plant Fe uptake from siderophoros and phytosiderophoros. *Plant and soil* 142 1-7
4. de Felipe A.M. *Biotecnologías limpias en Agricultura. Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC*
5. Elein T. A, y Leyva G. A. 2006, Evaluación agrobiológica de la coinoculación micorrizas-rizobacterias en tomate. *Agronomía Costarricense* 30(1): 65-73.
6. Grayston S. J, Wang S, Campbell C y Edwards A. 1997. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere, *soil soil biochem.*
7. <http://www.infojardin.com/articulos/carencias-nutrientes-minerales.htm>.
8. IFA Agriculture conference, Kunming, China 27 February – 2 March 2006
9. Imsande, J, 1998, Fe, sulfur, and chlorophyll deficiencies: a need for an e.c., Delany, I, 1997, Mechanism involved in biocontrol by microbial inoculants. *Agronomie* 1610 71-79
10. Integrative approach in plant physiology. *Physiol. Plant*, 103 139-144
11. Jurkevitch E., Hadar Y, Chen Y, 1988, Involvement of bacterial siderophoros in the remedy of lime-induced chlorosis in peanuts. *Soil Sci. Soc. Am.* 52 1032-1037

12. Katyal J. C, 1987, FAO Fertilizer and plant nutrition bulletin 7, New Delhi India.
13. King G.M. y Garey M.A, 1999, Ferric Fe reduction by bacteria associated with the roots of freshwater and marine macrophytes. *Appl. Env. Microbiol*, 65 4393-4398
14. López B. J, Campos C. J, Hernández C. E, Velásquez B. C Farías R. R, Macías R. L y Valencia C. E, 2007, *Bacillus megaterium* Rhizobacteria Promote Growth and Alter Root-System Architecture Through an Auxin- and Ethylene-Independent Signaling Mechanism in *Arabidopsis thaliana*, The American Phytopathological Society. Vol. 20, No. 2, 2007, pp. 207–217
15. Luis E. Fuentes, 2003, Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas. Benemérita universidad de puebla.
16. Molina M. L, Medina M y Orozco H. 2006, El efecto de la interacción Frankia - micorrizas -micronutrientes en el establecimiento de árboles Aliso (*Alnus acuminata*) en sistemas silvopastoriles. *Rev Col Cienc Pec* Vol. 19:1
17. Muñoz R. J. y Caballero M.J. 2005, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. UNAM.
18. Peters J. B. Kelling K.A. y Speth P.E. 1999, Alfalfa response to K at various soil pH levels, Department of Soil Science, UW-Madison.
19. Radianingtyas H. 2003, Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology*.
20. Razeto B. 1993, La nutrición mineral de los frutales. Deficiencias y excesos. Soquimich, Chile. 105p.
21. Römheld V. 1987, Different strategies for Fe acquisition in higher plants, *Physiol. Plan.* 70: 231-234.

22. Rroço E, Kosegarten H, Harizaj F, Imani J y Mengel K. 2001, The importance of soil microbial activity for the supply of iron to sorghum and rape, Department of Agronomy, Agricultural University of Tirana, Kamëz, Tirana, Albania.
23. Sanz M. 1997, Floral analysis as possible tool for the prognosis of Fe deficiency in peach. *Acta Horticulturae* 448:241 - 245.
24. Tagliavini M, 2001, Fe deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems, *European Journal of Agronomy*.

XI. ANEXOS



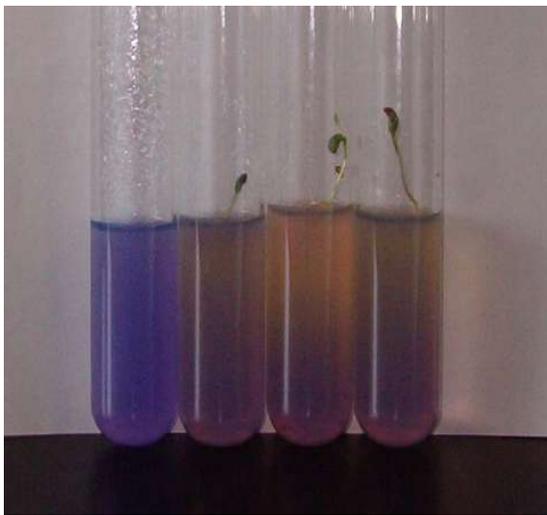
Plantas de alfalfa a 25 días de edad, tratamiento citrato férrico + tris 8µM



Plantas de alfalfa a 25 días de edad, tratamiento citrato férrico 8µM



Semillas de alfalfa



← Acidificación del medio por la alfalfa, crecidas en pH8

Acidificación del medio por la alfalfa, crecidas en pH7

