

## Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol\*

### Isolation, molecular characterization and evaluation of nitrogen-fixing strains in promoting the growth of beans

Juan Gabriel Angeles-Núñez<sup>1§</sup> y Teresa Cruz-Acosta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Molecular de Plantas y Microorganismos-Campo Experimental Bajío, INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5. 38010 Celaya, Guanajuato. México. Tel: 01 46161-15-323 Ext. 141. (teracruz\_89@hotmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: angeles.gabriel@inifap.gob.mx.

#### Resumen

Las leguminosas como el frijol y soya, juegan un papel fundamental en la rotación de los cultivos, gracias al proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico que se lleva a cabo a través de la interacción simbiótica planta-microorganismo. La búsqueda y obtención de cepas de microorganismos capaces de fijar eficientemente el nitrógeno del suelo y promover el crecimiento de leguminosas de interés agronómico resulta indispensable para afrontar los retos de la agricultura moderna que implica el incremento de productos agrícolas, reduciendo el consumo de energía fósil y la emisión de gases de efecto invernadero generados por la utilización desmedida de fertilizantes nitrogenados. El objetivo de este estudio, fue aislar cepas fijadoras de nitrógeno y promotoras del crecimiento, provenientes de nódulos de *Glycine max* L. (soya) y *Pachyrhizus erosus* (jicama) y evaluar sus efectos promotores en el cultivo de *Phaseolus vulgaris* (frijol). En este trabajo se utilizaron técnicas de biología molecular, fisiología y bioquímica para caracterizar cepas promotoras de crecimiento aisladas de soya y jicama. La identificación molecular indica que las cepas aisladas de soya correspondieron a *Ramlibacter* sp., (INI26-13), *Sinorhizobium* sp., (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13), mientras que la cepa aislada de jicama correspondió a *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13). La capacidad promotora de estos aislados se estudió bajo

#### Abstract

Legumes like beans and soybeans play an important role in crop rotation, thanks to the process of biological nitrogen fixation which is carried out through the symbiotic plant-microorganism interactions. Finding and obtaining strains of microorganisms capable of fixing nitrogen efficiently from the soil and promote the growth of legumes of agronomic interest is essential to meet the challenges of modern agriculture that involves increasing agricultural products, reducing the consumption of fossil energy and the emission of greenhouse gases generated by the excessive use of nitrogen fertilizers. The objective of this study was to isolate nitrogen fixing strains and growth promoters, from nodules of *Glycine max* L. (soybean) and *Pachyrhizus erosus* (jicama) and evaluate their promoting effect *Phaseolus vulgaris* (bean). In this work, molecular biology, physiology and biochemistry techniques were used to characterize strains isolated from soy and jicama for growth promotion. The molecular identification indicates that strain isolates from soy corresponded to *Ramlibacter* sp., (INI26-13), *Sinorhizobium* sp., (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13), while the strain isolates from jicama corresponded to *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13). The promoter capability of these isolates were studied under greenhouse conditions in seedlings of *Phaseolus vulgaris* (bean), inoculated with a bacterial suspension with

\* Recibido: agosto de 2014  
Aceptado: enero de 2015

condiciones de invernadero en plántulas inoculadas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) con una suspensión bacteriana con  $10^8$  UFC/ml. Las plántulas fueron cosechadas 18 días después de la inoculación y separadas en vástagos y raíces para su estudio. Los vástagos no presentaron cambios en el peso seco, sin embargo en la raíz se incrementó en el tratamiento con la cepa de *Ramlibacter* sp. (INI26-13). La presencia de nódulos fue observada en las raíces de todos los tratamientos; sin embargo, fue el tratamiento con la cepa de *Ramlibacter* sp. (INI26-13) que presentó mayor número de nódulos. El perfil del contenido de carbohidratos en raíces fue modificado diferencialmente en todos los tratamientos y sólo los vástagos del tratamiento con la cepa de *Ramlibacter* sp. (INI26-13) presentaron incrementos en el contenido de glucosa, fructosa y almidón. Los resultados obtenidos en este trabajo son discutidos en función del papel que tienen los organismos promotores de crecimiento en la agricultura moderna.

**Palabras clave:** *Phaseolus vulgaris*, *Ramlibacter* sp., bacterias promotoras de crecimiento, carbohidratos.

## Introducción

Las leguminosas como el frijol, soya, alfalfa, lenteja, garbanzo y jícama juegan un papel fundamental en la rotación de los cultivos gracias al proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Estos cultivos poseen un papel fundamental en la agricultura moderna, ya que pueden contribuir de manera significativa a la disminución del consumo de energía fósil y la emisión de gases de efecto invernadero ocasionados por el uso de fertilizantes nitrogenados que originan gran parte de las emisiones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2\text{O}$  (Rispailla *et al.*, 2010).

En la agricultura existe un beneficio de los cultivos de frijol y soya en el mejoramiento de fertilidad de suelo, lo que convierte a estos cultivos en componentes esenciales de la agricultura sostenible (Lightfoot, 2008). La interacción de estas leguminosas con bacterias capaces de aprovechar una gran proporción del nitrógeno atmosférico (familia rhizobiaceae) resulta de gran importancia para el desarrollo de los cultivos (FAO, 1984).

La rizósfera de las plantas es una zona de intensa actividad microbiana y algunas bacterias habitantes de esta zona, (denominadas rizobacterias), exhiben diferentes funciones (Walker *et al.*, 2003). Las rizobacterias que ejercen efectos

$10^8$  CFU / ml. The seedlings were harvested 18 days after inoculation and separated into stems and roots for study. Stems did not present changes in dry weight, however in root increased in the treatment with *Ramlibacter* sp., (INI26-13). It was observed the presence of nodules in the roots of all treatments; however, was the treatment with *Ramlibacter* sp. (INI26-13) presented the highest number of nodes. The carbohydrate profile content in roots was modified by differentially in all treatments and only stems from treatment with strain *Ramlibacter* sp. (INI26-13) showed increases in the content of glucose, fructose and starch. The results obtained in this work are discussed in terms of the role that organisms of growth promoters in modern agriculture.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*, *Ramlibacter* sp., carbohydrates, growth promoting bacteria.

## Introduction

Legumes such as beans, soybeans, alfalfa, lentils, chickpeas and jicama play a key role in crop rotation thanks to the process of biological nitrogen fixation. These crops have a fundamental role in modern agriculture, since they can contribute significantly to the reduction of fossil fuel consumption and emission of greenhouse gases caused by the use of nitrogen fertilizers that produce a lot of  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2\text{O}$  emissions (Rispailla *et al.*, 2010).

In agriculture there is a benefit of bean and soybean crops in the improvement of soil fertility, making these crops essential components of sustainable agriculture (Lightfoot, 2008). The interaction of these legumes with bacteria capable of using a high proportion of atmospheric nitrogen (family Rhizobiaceae) is of great importance for the development of crops (FAO, 1984).

The rhizosphere of plants is an area of intense microbial activity and some bacteria inhabitants of this area, (called rhizobacteria) exhibit different functions (Walker *et al.*, 2003). Rhizobacteria that exert beneficial effects on plant development is known by its acronym as plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), and can affect plant growth directly (increasing the supply of nutrients to the plant) or indirectly (by reducing or preventing the deleterious effects of one or more pathogenic organisms) (Dardanelli *et al.*, 2011; Atieno *et al.*, 2012). The beneficial bacteria that are capable to establish a symbiotic relationship through

benéficos sobre el desarrollo de la planta se conoce por sus siglas en inglés como Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), y pueden afectar el crecimiento de la planta de manera directa (incrementando el suministro de nutrientes a la planta), o indirecta (mediante la disminución o prevención de los efectos deletéreos de uno o más organismos patogénicos) (Dardanelli *et al.*, 2011; Atieno *et al.*, 2012). Las bacterias benéficas que son capaces de establecer una relación simbiótica mediante la fijación de nitrógeno con plantas leguminosas (llamadas en conjunto rizobios) también son capaces de promover el crecimiento en cultivos que no pertenecen a la familia *leguminosae* (Dardanelli *et al.*, 2011). La asociación leguminosa-rizobio contribuye de manera significativa a la economía del nitrógeno en el suelo. Se estima que mediante la simbiosis, la fijación de nitrógeno por hectárea varía de 24 hasta más de 584 kg, siendo capaz de abastecer en algunos casos hasta 90% de las necesidades de las plantas (Meza, 2010).

Las bacterias comúnmente conocidas como rizobios habitan en los nódulos fijadores de nitrógeno de las raíces de las leguminosas. El carbón fijado fotosintéticamente en el cloroplasto de la hoja es transportado a las raíces y es en este tejido donde la bacteria lo usa como una fuente de energía y de electrones para la reducción de di-nitrógeno atmosférico a amonio, que sirve como fuente de nitrógeno para las plantas. La interacción que se lleva a cabo entre los microorganismos fijadores de nitrógeno y sus hospederos puede resultar muy específica.

La especificidad del hospedero y la interacción planta-bacteria que origina el desarrollo de nódulos, es mediado por la señalización específica de moléculas secretadas por la planta (flavonoides) y la bacteria (factores nod) (Freixas *et al.*, 2010). Una vez que este fenómeno ocurre, la bacteria invade la raíz y eventualmente, forma células diferenciadas conocidas como bacteroides, sub-rodeadas por membranas peribacteroides.

Los géneros *Sinorhizobium*, *Rizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* de la familia rhizobiacea son simbióticos fijadores de nitrógeno que pueden encontrarse en las raíces de las plantas, principalmente las leguminosas. Estos microorganismos son los responsables de la porción más grande del nitrógeno fijado en el mundo (los microorganismos aporta 65% del nitrógeno disponible en la biósfera) (Ludwing *et al.*, 2004). El estudio de los miembros de la familia rhizobiacea, así como el de otras familias que contribuyen de manera significativa a la productividad de los cultivos agrícolas ha resultado ser un factor clave para la obtención de herramientas biotecnológicas que ayuden a enfrentar los retos de la agricultura moderna.

nitrogen-fixing with legume plants (called as group rhizobia) are also able to promote growth in crops that do not belong to the *leguminosae* family (Dardanelli *et al.*, 2011). The legume-rhizobium association contributes significantly to the economy of nitrogen in the soil. It is estimated that through symbiosis, nitrogen fixation per hectare ranges from 24 to over 584 kg, being able to supply in some cases up to 90% of the needs of the plants (Meza, 2010).

The bacteria commonly known as rhizobia inhabit in the nitrogen fixing nodules on the roots of legumes. The carbon fixed photosynthetically in the chloroplast of the leaf is conveyed to the roots and is in this tissue where the bacteria uses it as a source of energy and electrons for the reduction of atmospheric di-nitrogen to ammonia, which serves as nitrogen source for plants. The interaction that takes place between nitrogen-fixing microorganisms and their hosts can be very specific.

Host specificity and plant-bacteria interaction originate the development of nodules, is mediated by specific signaling molecules secreted by the plant (flavonoids) and bacteria (Nod factors) (Freixas *et al.*, 2010); once this phenomenon occurs, the bacteria invade the roots and eventually form differentiated cells known as bacteroides, sub surrounded by peribacteroides membranes.

The genera *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* and *Azorhizobium* from rhizobiacea family are symbiotic nitrogen fixers that can be found in root plants, especially in legumes. These microorganisms are responsible for the largest portion of fixed nitrogen in the world (microorganisms contribute 65% of the available nitrogen in the biosphere) (Ludwig *et al.*, 2004). The study of members from the rhizobiacea family as well as other families that contribute significantly to the productivity of agricultural crops has proved to be a key factor to obtain biotechnological tools that help meet the challenges of modern agriculture.

The benefits from growth promoting microorganisms from family Rhizobiaceae make them an excellent model for study, for which in recent years the research has expanded regarding to plant-microorganism interactions in order to understand in detail the processes that are carried out during and after the symbiosis. Similarly, the isolation of new growth promoting microorganisms has attracted attention since it has been observed that some isolates that do not belong to the rhizobiaceae family induce nodule

Los beneficios que aportan los microorganismos promotores de crecimiento de la familia rhizobiaceae los convierten en un excelente modelo de estudio, por lo cual en los últimos años se han ampliado las investigaciones respecto a la interacción planta-microorganismo con la finalidad de entender a detalle los procesos que se llevan a cabo durante y después de la simbiosis. De igual manera, el aislamiento de nuevos microorganismos promotores del crecimiento ha llamado la atención ya que se ha observado que algunos aislados que no pertenecen a la familia rhizobiaceae inducen la formación de nódulos y favorecen el desarrollo de las raíces, permitiendo con ello el fortalecimiento de la planta y en consecuencia un aumento en los rendimientos de los cultivos. El objetivo de este trabajo fue aislar nuevas cepas promotoras del crecimiento, provenientes de nódulos de soya y jícama, y evaluar sus efectos de promoción de crecimiento en frijol.

## Materiales y métodos

Como material biológico se utilizaron nódulos de raíces de *Glycine max* L. (soya) y *Pachyrhizus erosus* (jícama) para el aislamiento de cepas promotoras del crecimiento y semillas de *Phaseolus vulgaris* (frijol), variedad Flor de Mayo, para el análisis de promoción de crecimiento.

### Preparación de nódulos

Se aislaron nódulos de raíces de soya y jícama para esterilizarlos por inmersión en una solución de cloro al 10% (v/v) durante 5 min y en una solución de etanol al 70% (v/v) por un periodo de 10 min. Posteriormente se realizaron tres lavados con agua estéril, con una duración de 1 min cada uno. Posteriormente los nódulos fueron utilizados para el aislamiento de microorganismos promotores de crecimiento.

### Aislamiento de cepas promotoras de crecimiento

Los microorganismos promotores del crecimiento empleados en este estudio fueron aislados de nódulos de raíces de soya y jícama provenientes de la región norte y centro de México, respectivamente. Los nódulos previamente esterilizados fueron macerados con 5 ml de agua destilada estéril en un mortero previamente esterilizado. Posteriormente, se tomó 1 ml del macerado y se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener diluciones de  $10^1$  a  $10^7$ . De cada dilución se estriaron 500  $\mu$ l sobre cajas Petri conteniendo medio

formation and promote the development of roots, thereby allow strengthening the plant and as result an increase in crop yields. The aim of this work was to isolate new growth promoting strains, from soybean and jicama nodules, and evaluate their growth promoting effects in beans.

## Materials and methods

As biological material root nodules from *Glycine max* L. (soybean) and *Pachyrhizus erosus* (jicama) to isolate growth promoting strains and seeds of *Phaseolus vulgaris* (bean), Flor de Mayo variety were used, to analyze growth promotion.

### Nodules preparation

Root nodules from soybean and jicama were isolated to sterilize them by immersion in a solution of 10% bleach (v / v) for 5 min and in a solution of 70% ethanol (v / v) for a period of 10 min. Then three washes with sterile water, with duration of 1 min each. Subsequently the nodules were used for the isolation of growth promoting microorganisms.

### Isolation of growth promotion strains

Growth promoting microorganisms used in this study were isolated from root nodules of soybean and jicama coming from the north and center of Mexico, respectively. Previously sterilized nodules were macerated with 5 ml of sterile distilled water in a mortar previously sterilized. Subsequently, 1 ml of macerate was taken and diluted with sterile distilled water to obtain dilutions  $10^1$  to  $10^7$ . From each dilution 500  $\mu$ l were streaked on petri plates containing culture medium ELMARC ( $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ , NaCl, mannitol, yeast extract). The colonies that was able to grow in the growth medium ELMARC were streaked in selection media (ELMARC and yolk) to select candidate colonies.

### Characterization of candidate microorganisms

Candidate strains were grown in LB medium overnight to extract genomic DNA using Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Then, the 16S region of the different bacteria were amplified through polymerase chain reaction (PCR) using the extracted DNA. The 16S region was cloned and transformed using the TOPO TA cloning kit from Invitrogen 2.1. The transformant colonies were extracted

de cultivo ELMARC ( $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4$ , NaCl, manitol, extracto de levadura). A continuación, las colonias que lograron crecer en el medio ELMARC fueron estriadas en medios de selección (ELMARC y yema) para la selección de colonias candidatas.

### Caracterización de los microorganismos candidatos

Las cepas candidatas fueron crecidas en medio LB durante toda la noche para extraer el ADN genómico utilizando el kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit. Posteriormente, la región 16S de las distintas bacterias se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN extraído. La región 16S fue clonada y transformada utilizando el kit de Invitrogen TOPO TA cloning 2.1. A las colonias transformantes se les extrajo el ADN plasmidico utilizando el kit QIA prep<sup>®</sup> Spin Miniprep kit (250) de QUIAGEN, el cual fue utilizado para un análisis de restricción confirmatorio. Las cepas con inserto se enviaron a secuenciar y su secuencia fue analizada en la base de datos <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

### Preparación de la semilla

Se esterilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris* (frijol) variedad Flor de Mayo por inmersión en una mezcla de cloro al 10% (v/v) durante 14 min. Después las semillas fueron sumergidas en etanol al 70% (v/v) por un periodo de 5 min y finalmente se realizaron 5 lavados con agua estéril (1 min cada uno). Una vez esterilizadas, las semillas se germinaron bajo condiciones asépticas sobre una capa húmeda de algodón contenida en el interior de una charola de aluminio estéril. Se le dio el seguimiento al crecimiento radicular de las semillas durante 60 h hasta que la radícula alcanzó una longitud de 1-1.5 cm, tiempo en el que fueron transferidas a macetas para la evaluación de la capacidad promotora de crecimiento de los aislados bacterianos.

### Preparación de suelo y macetas

El suelo se preparó a partir de una mezcla de suelo arcilloso y arena (1:2), el cual fue esterilizado en autoclave por 30 min. Posteriormente fue utilizado para llenar macetas con una capacidad de 1.2 kg las cuales se mantuvieron en riego a capacidad de campo, determinada especialmente para la mezcla de suelo-arena utilizada en este estudio conforme al método descrito en Daubenmire (1974).

plasmid DNA using the QIA prep<sup>®</sup> Spin Miniprep kit (250) from QUIAGEN, which was used for confirmatory restriction analysis. The strains with insert were sent for sequencing and its sequence was analyzed in the data base <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

### Seed reparation

Seeds of *Phaseolus vulgaris* (bean) Flor de Mayo variety were sterilized by immersion in a mixture of 10% bleach (v/v) during 14 min. After the seeds were immersed in 70% ethanol (v/v) for a period of 5 min and finally 5 washes were made with sterile water (1 min each). Once sterilized, seeds are germinated under aseptic conditions on a wet cotton layer contained inside a sterile aluminum tray. Root growth of seeds were monitored for 60 h until the radicle reached a length of 1-1.5 cm, and then transferred to pots for evaluation of growth promoting capability of bacterial isolates.

### Soil and pots preparation

The soil was prepared from a mixture of clay soil and sand (1:2), which was sterilized in autoclave for 30 min. Then used to fill pots with a capacity of 1.2 kg, that were kept irrigated to field capacity, determined just for the mix of soil-sand used in this study according to the method described in Daubenmire (1974).

### Preparation of bacterial inoculum

For growth of diazotrophic bacteria, ELMARC growth medium was used; this was autoclaved for 15 min at 121 °C (15 psi). A colony obtained from an axenic culture of strains isolated in this study was inoculated in 15 ml of ELMARC; then incubated at 28 °C and 200 rpm until an optical density (OD) between 0.500-0.600 at a wavelength of 600 nm.

### Assessing treatments for growth promotion

For this analysis two controls and four treatments were used. The negative control (C-) consisted on sowing germinated seeds on sterile soil without performing any inoculation while the medium control (C/M) consisted of adding 1 ml of ELMARC medium to a pre-germinated seed radicle. Inoculation treatments consisted in adding 1 ml of bacterial suspension ( $10^8$  CFU /ml) of *Ramlibacter* sp., (treatment 1), *Sinorhizobium* sp., (treatment 2), *Sinorhizobium fredii*



### Preparación del inóculo bacteriano

Para el crecimiento de las bacterias diazotróficas se utilizó el medio de cultivo ELMARC, el cual se esterilizó en autoclave durante 15 min a 121 °C (15psi). Una colonia obtenida de un cultivo axénico de las cepas aisladas en este trabajo se inoculó en 15 ml de medio ELMARC. Posteriormente se incubó a 28 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 0.500-0.600 a una longitud de onda de 600 nm.

### Tratamientos para la evaluación de la promoción de crecimiento

Para este análisis se utilizaron dos controles y cuatro tratamientos. El control negativo (C-), consistió en sembrar semillas germinadas sobre suelo estéril sin llevar a cabo ningún tipo de inoculación mientras que el control con medio (C/M) consistió en adicionar 1 ml de medio de cultivo ELMARC a la radícula de semillas pre-germinadas. Los tratamientos de inoculación consistieron en adicionar 1 ml de una suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/ml) de *Ramlibacter* sp., (tratamiento 1) *Sinorhizobium* sp. (tratamiento 2) *Sinorhizobium fredii* (tratamiento 3) y *Bradyrhizobium japonicum* (tratamiento 4) a la radícula de semillas pre-germinadas de frijol. En todos los tratamientos se empleo riego a capacidad de campo con H<sub>2</sub>O estéril.

### Evaluación de la promoción de crecimiento en frijol

Las cepas candidatas fueron crecidas en medio ELMARC hasta alcanzar una DO de 0.500-0.600 a una longitud de onda de 600 nm; posteriormente 1 ml de esa suspensión bacteriana fue utilizada para inocular las raíces de semillas de frijol que fueron previamente germinadas sobre una capa de algodón bajo condiciones asépticas. Una vez inoculadas las plántulas se dejaron crecer por un periodo de dieciocho días en invernadero. Transcurrido este tiempo las plántulas fueron cosechadas para la determinación del número de nódulos, peso seco y análisis de carbohidratos.

### Número de nódulos

Las plántulas de frijol fueron extraídas de la maceta 18 días después de la germinación y sus raíces lavadas para realizar un conteo de la cantidad de nódulos por planta.

(treatment 3) and *Bradyrhizobium japonicum* (treatment 4) to the radicle of pre-germinated seeds of bean; in all treatments irrigation at field capacity with sterile H<sub>2</sub>O was applied.

### Evaluation of growth promotion in beans

Candidate strains were grown in ELMARC medium until an OD of 0.500-0.600 at a wavelength of 600 nm; then 1 ml of the bacterial suspension was used to inoculate the roots of bean seeds which were previously germinated on a layer of cotton under aseptic conditions; once inoculated the seedlings were allowed to grow for a period of eighteen days in the greenhouse. After this time the seedlings were harvested to determine the number of nodules, dry weight and carbohydrate analysis.

### Number of nodules

Bean seedlings were removed from the pot eighteen days after germination and its roots were washed to count the number of nodules per plant.

### Determination of dry weight

Bean seedlings harvested after its establishment in pots (18 days), were separated into stems and roots, and then placed in brown paper bags, previously labeled, to be dried according to the protocol proposed by Stephan-Sarkissian (1990), which consist on drying in an oven at 60 °C for a period of 48 h. In this paper, drying was performed in a furnace 1321F SHEL LAB Forced Air Ovens, 1.7 Cu/ Ft/ 120V. At the end of this time, stems and roots were removed from the oven and weighed on an analytical balance PW 124 ae Adam equipment.

### Determination of carbohydrate

To determine carbohydrates (glucose, fructose, sucrose, starch) 5-10 mg of dry weight of the samples were used, using a coupled enzyme assay reported by Angeles-Nunez and Tiessen (2010).

### Statistical analysis

The analysis of the results was made based on a completely randomized design. Statistical analysis was performed based on a comparison of means using the experimental design package FAUANL version 2.5, from the Faculty of Agronomy UANL, Martin NL (Olivares, 1994).

### Determinación del peso seco

Las plántulas de frijol cosechadas después de su establecimiento en macetas (18 días), fueron separadas en vástagos y raíces y colocadas en bolsas de papel estraza, previamente rotuladas, para ser secadas de acuerdo al protocolo propuesto por Stephan-Sarkissian (1990), el cual consiste en secar en horno a 60 °C por un periodo de 48 h. En este trabajo, el secado se realizó en un horno 1 321F SHEL LAB Forced Air Ovens, 1.7 Cu/Ft/120V. Al término de este tiempo, los vástagos y raíces fueron retirados del horno y pesados en una balanza analítica modelo PW 124 ae Adam equipment.

### Determinación de carbohidratos

Para la determinación de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa, alimón) se utilizaron 5-10 mg de peso seco de muestra utilizando un ensayo enzimático acoplado reportado por Angeles-Núñez y Tiessen (2010).

### Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó con base en un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico se realizó a partir de una comparación de medias utilizando el paquete de diseños experimentales FAUANL versión 2.5, Facultad de Agronomía UANL, Martín N. L. (Olivares, 1994).

## Resultados y discusión

El estudio de la interacción planta-microorganismo, ha permitido identificar algunos procesos biológicos que resultan importantes en la generación de soluciones a las múltiples necesidades de la agricultura moderna. Esta misma, demanda un alto rendimiento vegetal a un costo relativamente bajo, sin deteriorar la fertilidad del suelo y haciendo frente al gran problema del consumo de agua, fertilizantes y pesticidas. En este trabajo nos hemos focalizado en buscar nuevas cepas fijadoras de nitrógeno y promotoras de crecimiento que ayuden a mejorar los rendimientos del cultivo de frijol disminuyendo el uso de productos químicos que generan problemas muy serios de fertilidad del suelo.

## Results and discussion

The study of plant-microorganism interactions, has allowed identifying some biological processes that are important in generating solutions to the multiple needs of modern agriculture. This, demands high plant yield at a relatively low cost without deteriorating soil fertility and facing the big problem of water consumption, fertilizers and pesticides. In this paper we have focused on finding new nitrogen-fixing strains and growth promoters that help improve crop yields from bean reducing the use of chemicals that pose serious problems for soil fertility.

### Growth promoter microorganisms isolated from soybean and jicama roots

In this work, three putative diazotrophic strains were successfully isolated from soybean nodules (INI26-13, INI43-13 and INI51-13) and one strain from jicama nodules (INI13-13). The molecular analysis allowed to identify strains such as *Ramlibacter* sp., (INI26-13), *Sinorhizobium* sp., (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13) and *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) (data not shown). Nowadays, it is widely known that soil bacteria belonging to the rhizobiaceae family such as *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* among others, interact with the roots of legumes to form nodules in which atmospheric nitrogen can be fixed (Pueppke and Broughton, 1999; Fraysse *et al.*, 2002). However, little or nothing is known about the symbiosis that exists between the bacteria *Ramlibacter* sp., and legumes. There are few reports which indicate that this bacterium is within the group of  $\beta$ -proteobacteria (play a role in nitrogen fixation in a variety of plants) (Heulin *et al.*, 2003). This work is the first to analyze and report the growth promoting of *Ramlibacter* sp., in bean.

### Effect of diazotrophic strains on nodule formation in bean plants

The results showed that strains (*Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*) from nodules of soybean (*Glycine max* L.) were able to nodulate the roots of bean (*Phaseolus vulgaris*), while the strain from nodules of Jicama (*Bradyrhizobium japonicum*) was not able to induce the formation of nodules on bean 18 days after inoculation

### Microorganismos promotores del crecimiento aislados de raíces de soya y jícama

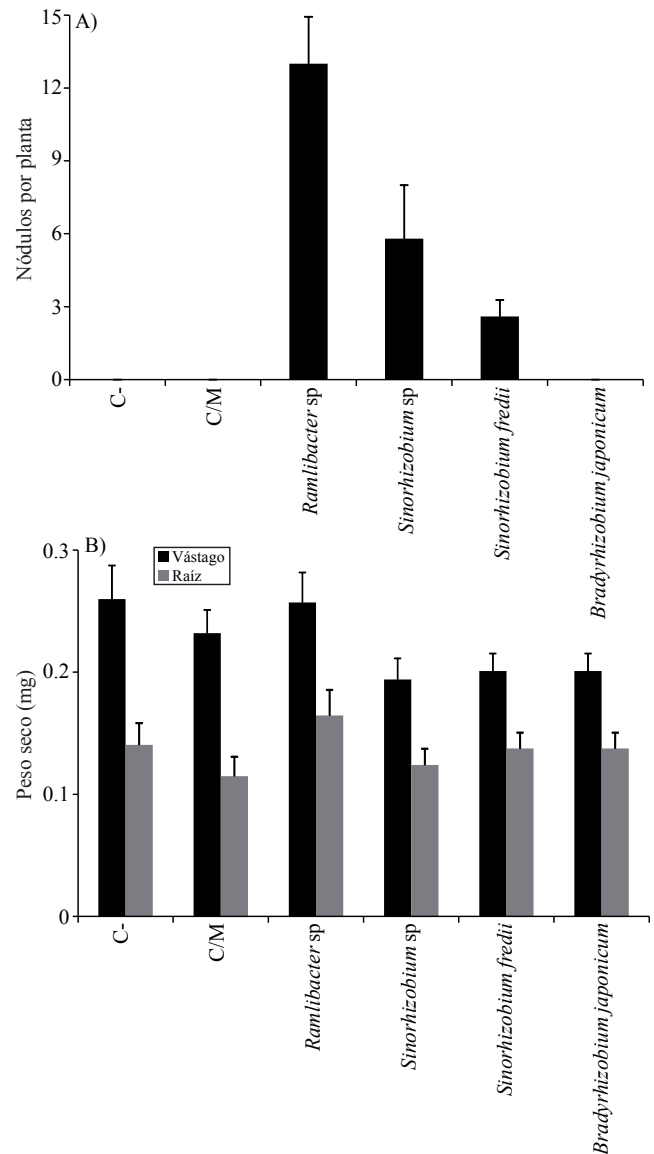
En este trabajo se lograron aislar tres cepas diazotróficas putativas de nódulos de soya (INI26-13, INI43-13, INI51-13) y una cepa de nódulos de jícama (INI13-13). El análisis molecular, permitió identificar cepas como *Ramlibacter* sp. (INI26-13), *Sinorhizobium* sp. (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13) y *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) (datos no mostrados). En la actualidad, es ampliamente conocido que las bacterias del suelo pertenecientes a la familia rhizobiaceae tales como *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* entre otras, interactúan con las raíces de las leguminosas para formar nódulos en los que el nitrógeno atmosférico puede ser fijado (Frayse *et al.*, 2002; Pueppke y Broughton, 1999). Sin embargo, poco o nada es conocido sobre la simbiosis que se establece entre la bacteria *Ramlibacter* sp., y las leguminosas. Los pocos reportes que existen sobre esta bacteria indican que se encuentra dentro del grupo de la  $\beta$ -proteobacterias (desempeñan un papel en la fijación de nitrógeno en diversos tipos de plantas) (Heulin *et al.*, 2003). Nuestro trabajo es el primero que analiza en frijol y reporta la capacidad promotora de crecimiento de la bacteria *Ramlibacter* sp.

### Efecto de cepas diazotróficas sobre la formación de nódulos en plantas de frijol

Los resultados obtenidos mostraron que las cepas (*Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*) provenientes de nódulos de soya (*Glycine max* L.) fueron capaces de nodular las raíces del frijol (*Phaseolus vulgaris*), mientras que la cepa proveniente de nódulos de jícama (*Bradyrhizobium japonicum*) no fue capaz de inducir la formación de nódulos en el cultivo de frijol 18 días después de la inoculación (Figura 1A). Este resultado es coherente con otros reportes de nodulación que indican que *Phaseolus vulgaris* es nodulado por aislados de crecimiento rápido, tal es el caso de las cepas *Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., y *Sinorhizobium fredii*.

Contrariamente a estas bacterias *Bradyrhizobium japonicum* es considerada una bacteria de crecimiento lento, y su capacidad de formar nódulos en raíces de *Phaseolus vulgaris* es muy contradictoria. Mientras que los resultados de los estudios de Ishizawa, (1954) y Graham y Parker (1964) han indicado que varios aislados de *B. Japonicum* nodulan las raíces de *P. vulgaris*, Taha *et al.* (1970) han reportado que

(Figure 1A). This result is consistent with other nodulation reports indicating that *Phaseolus vulgaris* is nodulated by isolates of fast-growing, as is the case of *Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., and *Sinorhizobium fredii*.



**Figura 1. Cambios Fisiológicos en plántulas de Frijol (A).** Número de nódulos formados en plantas de frijol inoculadas con bacterias diazotróficas; y (B). Peso seco de plantas de frijol inoculadas con aislados bacterianos. Los valores son la media  $\pm$  ES (n=5). Para el análisis estadístico se utilizó una comparación de medias con un nivel de significancia de 0.05.

**Figure 1. Physiological changes in bean seedlings (A).** Number of nodules formed on bean plants inoculated with diazotrophic bacteria; and (B). Dry weight of bean plants inoculated with bacterial isolates. The values are the mean  $\pm$  SE (n=5). For statistical analysis a comparison of means with a significance level of 0.05 was used.



las cepas de *B. japonicum* que ellos examinaron no nodularon los diferentes genotipos de *P. vulgaris* analizados. De igual manera el equipo de Sadowsky *et al.* (1988) concluyó que los resultados que ellos obtuvieron utilizando una amplia variedad geográfica y de germoplasma (754 genotipos) fue que las cepas de *Bradyrhizobium* no mostraron una relación simbiótica.

Una posible explicación para todos estos resultados contradictorios es que muchos de los genotipos utilizados en los estudios anteriores han sido reclasificados como pertenecientes a los géneros *Vigna* y *Macroptilium* (Allen y Allen, 1981) y se han demostrado que ambos huéspedes forman simbiosis con un gran número de especies y de cepas de rhizobia (Graham y Parker, 1964). Nuestro resultado de inducción de nódulos en plantas de *Phaseolus vulgaris* con la cepa INI13-13 de *Bradyrhizobium japonicum* es coherente con el trabajo de Sadowsky *et al.* (1988), ya que al igual que ellos nuestra cepa de *Bradyrhizobium japonicum* no estableció una relación simbiótica (formación de nódulos) con las plantas de frijol inoculadas.

Sin embargo, las cepas de crecimiento rápido (*Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*) si establecieron esa simbiosis lo cual dio lugar a la formación de nódulos en las raíces de frijol inoculadas. Los resultados obtenidos indican que nuevamente fue la cepa de *Ramlibacter* sp., la mejor efectora ya que la inoculación de las raíces con este aislado favoreció la formación de nódulos en el área radicular de las plántulas de frijol analizadas. Este resultado, es una clara evidencia que la bacteria *Ramlibacter* sp., perteneciente a la clase de las  $\beta$ -proteobacterias establece una simbiosis con raíces de *Phaseolus vulgaris* para inducir la formación de nódulos.

### **Efecto de aislados bacterianos sobre la promoción de crecimiento en plántulas de frijol**

Los resultados del peso seco, indicaron que el tratamiento con el aislado de *Ramlibacter* sp., es capaz de promover el crecimiento de la raíz de plántulas de frijol pero no el de la parte aérea (vástago) (Figura 1B). Por otro lado, el perfil de azúcares solubles (glucosa y fructosa) si cambió tanto en la raíz como en el vástago (Figura 2). Este resultado, indica que la promoción de crecimiento ejercida por *Ramlibacter* sp., sobre la raíz de frijol, está correlacionada con la acumulación de azúcares solubles, lo cual es coherente con el incremento de carbohidratos observado en órganos y tejidos en crecimiento (Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez y Tiessen, 2010).

Contrary to these bacteria, *Bradyrhizobium japonicum* is considered a slow-growing bacteria and their ability to form nodules on roots of *Phaseolus vulgaris* is very contradictory. While the results of studies from Ishizawa (1954) and Graham and Parker (1964) have indicated that various isolates of *B. japonicum* nodulate roots of *P. vulgaris*; Taha *et al.* (1970) have reported that *B. japonicum* strains that they examined did not nodulate the different genotypes of *P. vulgaris*. Similarly Sadowsky *et al.* (1988) team concluded that the results they obtained using a wide geographic range and germplasm (754 genotypes) was that *Bradyrhizobium* strains showed no symbiotic relationships.

One possible explanation for these contradictory results is that many of the genotypes used in previous studies have been reclassified as part of the genus *Vigna* and *Macroptilium* (Allen and Allen, 1981) and have shown that both guests form symbiosis with many species and rhizobia strains (Graham and Parker, 1964). Our result of nodule induction in *Phaseolus vulgaris* with strain INI13-13 of *Bradyrhizobium japonicum* is consistent with Sadowsky *et al.* (1988) work, because like them our *Bradyrhizobium japonicum* strain did not establish a symbiotic relationship (nodule formation) with inoculated plants of bean.

However, strains of rapid growth (*Ramlibacter* sp., *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium fredii*) established that symbiosis which led to the formation of nodules on the roots of inoculated beans. The results indicate that *Ramlibacter* sp. was the best, since inoculation of roots with this isolate favored the formation of nodules on the root area of bean seedlings. This result is clear evidence that *Ramlibacter* sp., belonging to group of  $\beta$ -proteobacteria establishes a symbiosis with the roots of *Phaseolus vulgaris* to induce nodule formation.

### **Effect of bacterial isolates on growth promotion in bean seedlings**

The results from dry weight indicated that treatment with *Ramlibacter* sp., is capable to promote root growth of bean seedlings but not of the aerial part (stem) (Figure 1B). Furthermore, the profile of soluble sugars (glucose and fructose) changed in root and stem (Figure 2). This result indicates that growth promotion exerted by *Ramlibacter* sp. on bean root is correlated with the accumulation of soluble sugars, which is consistent with the increase of carbohydrate in growing organs and tissues (Fait *et al.*, 2006; Angeles-Núñez and Tiessen, 2010).

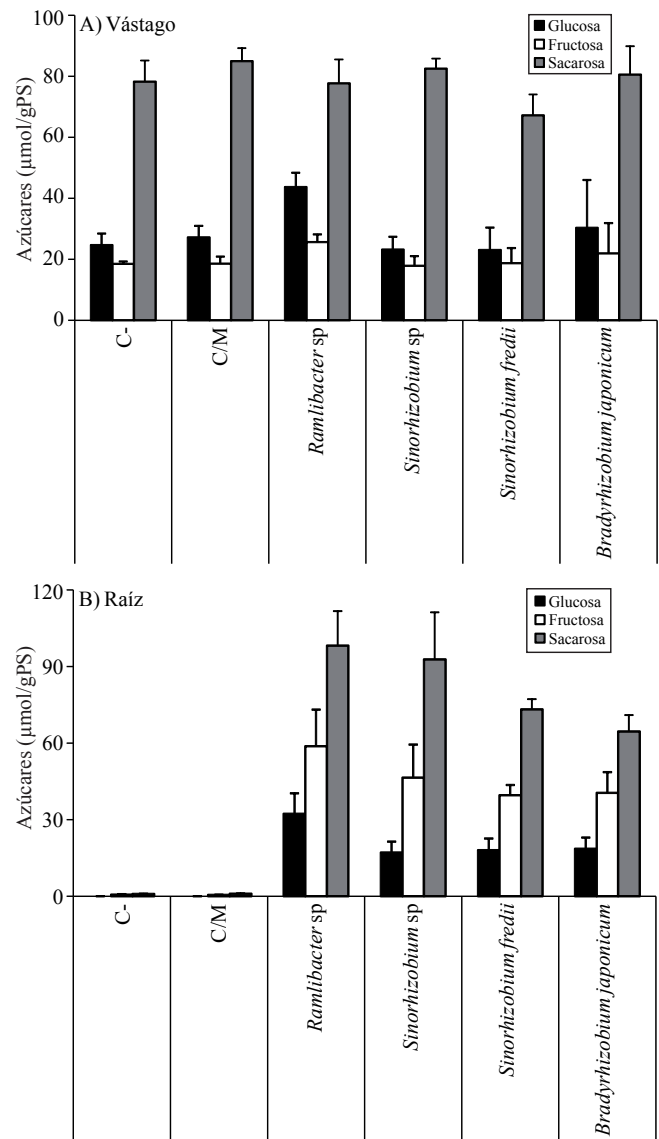
Los cambios observados en el peso seco de la raíz y del contenido de azúcares solubles en vástagos del tratamiento con *Ramlibacter* sp., no fueron observados en plántulas tratadas con los otros aislados. Este resultado indica que el efecto de promoción de crecimiento ejercido por *Sinorhizobium* sp. (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13) y *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) en plántulas de frijol, es más lento comparado con el efecto que ejerce la cepa de *Ramlibacter* sp. Los cambios observados en el perfil de azúcares solubles en las raíces de estos aislados, indican que la relación simbiótica de *Ramlibacter* sp., genera modificaciones metabólicas que producen cambios en la biomasa de las plantas de frijol (Figuras 1-3). Esta idea es coherente con Flores *et al.* (1999) que indican que la raíz es un órgano que sintetiza, acumula y secreta una gran variedad de compuestos que favorecen el incremento de biomasa y la interacción planta-microorganismo.

Los cambios fisiológicos y bioquímicos observados en plantas de frijol inoculadas con el aislado de *Ramlibacter* sp., podría explicarse también a través del número de nódulos formados en las plantas inoculadas con esta bacteria, ya que estas plantas presentaron 2 y 4 veces más formación de nódulos con respecto a *Sinorhizobium* sp., y *sinorhizobium fredii* respectivamente, lo cual favorece la fijación de nitrógeno atmosférico y por ende el incremento en el área radicular y vegetativa (Yadegari *et al.*, 2008; Fiasconaro *et al.*, 2012).

### ***Ramlibacter* sp., y *Bradyrhizobium japonicum* modifican el perfil del contenido de almidón en plantas de frijol**

Las cepas aisladas de *Ramlibacter* sp., y *Bradyrhizobium japonicum*, fueron capaces de inducir la acumulación de almidón en vástagos de frijol (Figura 3). El incremento en el contenido de almidón en plantas de frijol inoculadas con *Ramlibacter* sp., es una respuesta a la promoción de crecimiento, la cual se ve reflejada en el incremento del peso seco de las plantas de frijol (Figuras 1B, 3). Esto idea se explica a través de la síntesis de giberelinas que se producen durante el proceso de interacción planta-microorganismo. Estas giberelinas activan genes que sintetizan ARNm, el cual favorece la síntesis de enzimas hidrolíticas, como  $\alpha$ -amilasa, que desdobra el almidón en azúcares, aportando una fuente importante de átomos de carbono a los órganos y tejidos vegetales favoreciendo su crecimiento, desarrollo y llenado de grano.

Esto es coherente con el incremento del contenido de carbohidratos que se observan en órganos y tejidos en desarrollo (Angeles-Núñez y Fait *et al.*, 2006; Tiessen,

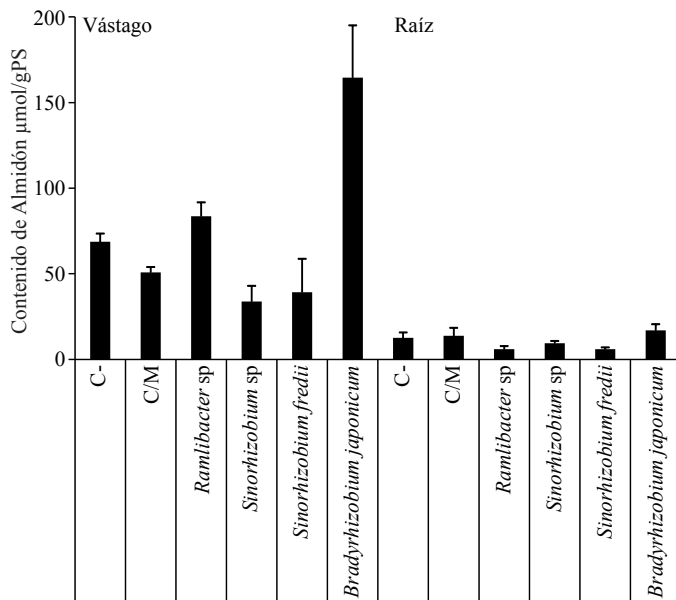


**Figura 2. Efecto de bacterias diazotróficas sobre el contenido de azúcares solubles en plántulas de frijol (A).** Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en vástagos; y (B) Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en raíces. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=5$ ). Para el análisis estadístico se utilizó una comparación de medias con un nivel de significancia de 0.05.

**Figure 2. Effect of diazotrophic bacteria on soluble sugar content in bean seedlings (A).** Content of glucose, fructose and sucrose in stem; (B) content of glucose, fructose and sucrose in root; values are the mean  $\pm$  SE ( $n=5$ ). For statistical analysis a comparison of means with a significance level of 0.05 was used.

The changes in root dry weight and soluble sugar content in stems from treatment with *Ramlibacter* sp. weren't observed on seedlings treated with other isolates. This result indicates that the growth promoting effect exerted by *Sinorhizobium*

2010). En otros cultivos como cebada y maíz, el almidón que se acumula en el tallo durante el desarrollo de la planta es utilizado como fuente de carbono para el llenado del grano (Blum, 1998; Mi *et al.*, 2009; Madani *et al.*, 2010). Todos estos cambios que se generan por la removilización de compuestos almacenados en los diferentes órganos y tejidos de la planta a lo largo de su desarrollo se traducen en cambios importantes de biomasa y de rendimiento.



**Figura 3. Efecto de bacterias diazotróficas sobre el contenido de almidón de plántulas de frijol.** Contenido de almidón en vástagos y raíces de plántulas de frijol inoculadas con aislados bacterianos. Los valores son la media  $\pm$  ES ( $n=5$ ). Para el análisis estadístico se utilizó una comparación de medias con un nivel de significancia de 0.05.

**Figure 3. Effect of diazotrophic bacteria on starch content of bean seedlings;** starch content in stems and roots of bean seedlings inoculated with bacterial isolates. The values are the mean  $\pm$  SE ( $n=5$ ). For statistical analysis a comparison of means with a significance level of 0.05 was used.

Para el caso de la acumulación de almidón en plantas tratadas con la cepa *Ramlibacter* sp., es claro que es una respuesta a los estímulos ejercidos por el establecimiento de la simbiosis. Sin embargo, no es el caso para la acumulación de almidón observada en plantas tratadas con la cepa de *Bradyrhizobium japonicum*, ya que a pesar de ser una bacteria simbiótica asociada a la formación de nódulos y fijación de nitrógeno en leguminosas en muchos trabajos e incluso en este, se ha determinado no ser capaz de formar nódulos en las raíces de *Phaseolus vulgaris*; sin embargo, si es capaz de modificar el perfil de carbohidratos en plantas de frijol.

sp. (INI43-13), *Sinorhizobium fredii* (INI51-13) and *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) in bean seedlings, it is slower compared to the effect that *Ramlibacter* sp., exerts. The changes in the profile of soluble sugars in roots of these isolates indicate that the symbiotic relationship of *Ramlibacter* sp. generates metabolic modifications that produce changes in the biomass of bean plants (Figures 1-3). This notion is consistent with Flores *et al.* (1999) indicating that root is an organ that synthesizes, accumulates and secretes a variety of compounds that promote an increase in biomass and plant-microorganism interactions.

Physiological and biochemical changes observed in bean plants inoculated with isolate *Ramlibacter* sp., could be explained through the number of nodules formed in plants inoculated with the bacteria, since these plants had 2 to 4 more times nodule formation regarding *Sinorhizobium* sp., and *sinorhizobium fredii* respectively, which favors atmospheric nitrogen-fixation and therefore an increase in root and vegetative area (Yadegari *et al.*, 2008; Fiasconaro *et al.*, 2012).

### ***Ramlibacter* sp., and *Bradyrhizobium japonicum* modify the profile of starch content in bean plants**

*Ramlibacter* sp., and *Bradyrhizobium japonicum* isolates were able to induce the accumulation of starch in bean stems (Figure 3). The increase in starch content in bean plants inoculated with *Ramlibacter* sp., is a response to growth promotion, which is reflected in the increase of dry weight of bean plants (Figures 1B, 3). This idea is explained through gibberellin synthesis occurring during plant-microorganism interactions. These gibberellins activate genes that synthesize mRNA which promote the synthesis of hydrolytic enzymes such as  $\alpha$ -amylase that splits starch into sugars, providing a significant source of carbon atoms to organs and plant tissue, promoting its growth, development and grain filling.

This is consistent with the increase in carbohydrate content observed in growing organs and tissues (Angeles-Núñez and Fait *et al.*, 2006; Tiessen, 2010). In other crops like barley and corn, the starch that is accumulated in the stem during the development of the plant is used as source of carbon for grain filling (Blum, 1998; Mi *et al.*, 2009; Madani *et al.*, 2010). All these changes generated by the remobilization of compounds stored in different organs and tissues of the plant throughout its development result in significant changes in biomass and yield.

Este evento puede ser explicado como un efecto indirecto ejercido por bacteria al haber sido inoculada en la raíz. Ya que existen reportes que la colonización de la raíz es el primer paso importante en la interacción de bacterias benéficas con plantas (Kloepper y Beauchamp, 1992). Para actuar como bacterias promotoras de crecimiento (PGPR), los microorganismos deben ser capaces de colonizar y sobrevivir en la rizosfera de las plantas. Una vez establecidas en las raíces de las plantas producen compuestos (fitohormonas y sideroforos) que generan efectos antagonistas contra muchos patógenos de plantas favoreciendo el crecimiento. Hay estudios en los que se ha determinado que las PGPR inducen la promoción de crecimiento de un amplio rango de hospederos (cereales, leguminosas y árboles) por modos de acción directos o indirectos (Beauchamp, 1993; Kapulnik, 1996; Lazarovits y Nowak, 1997).

En un estudio donde se determinó el potencial de promoción de crecimiento de la cepa Soy 213 de *Bradyrhizobium japonicum* usando rábano como planta modelo, se observó que la cepa fue capaz de tener un alto efecto de estimulación sobre el peso seco (60%) a través de un modo de acción indirecto (Antoun *et al.*, 1998). Además se ha reportado que la interacción planta-microorganismo genera cambios metabólicos importantes por la transición del estado fuente-demanda (sink-source) de los tejidos fotosintéticos (Berger *et al.*, 2007) y evidencias más recientes publicadas por Ezquer *et al.* (2010) indican que los microorganismos son capaces de emitir compuestos volátiles que cambian el perfil metabólico de las plantas generando modificaciones en su crecimiento y desarrollo.

Se espera que las cepas aisladas y caracterizadas en este trabajo contribuya de manera importante al estudio de las rutas que regulan la interacción planta-microorganismo, así como al desarrollo de los biofertilizantes que demanda la agricultura moderna.

## Conclusiones

Se aislaron y caracterizaron molecular y bioquímicamente tres cepas de nódulos de raíces de soya (INI26-13, INI43-13, INI51-13) y una de nódulos de raíces de jícama (INI13-13).

In the case of starch accumulation in plants treated with *Ramlibacter* sp., it is clear that is a response to stimuli exerted by the establishment of the symbiosis. However, it is not the case for starch accumulation in plants treated with *Bradyrhizobium japonicum*, because despite being a symbiotic bacteria associated with nodule formation and nitrogen fixation in legumes in many papers and even in this, has been determined not to be able to form nodules on roots of *Phaseolus vulgaris*; however, it is able to modify the profile of carbohydrates in bean plants.

This situation can be explained as an indirect effect exerted by bacteria when inoculated in the root. Since there are reports that root colonization is the first major step in the interaction of beneficial bacteria with plants (Kloepper and Beauchamp, 1992). To act as growth-promoting bacteria (PGPR), microorganisms must be able to colonize and survive in plant rhizosphere. Once established in the roots of plants, produce compounds (phytohormones and siderophores) that generate antagonistic effects against many plant pathogens, favoring growth. There are studies in which has been determined that PGPR promote growth of a broad host range (cereals, legumes and trees) through direct or indirect action mode (Beauchamp, 1993; Kapulnik, 1996; Lazarovits and Nowak, 1997).

In a study that determined the growth promotion potential from strain Soy 213 of *Bradyrhizobium japonicum* using radish as a model plant, it was observed that the strain was able to have a high stimulating effect on the dry weight (60%) through indirect mode of action (Antoun *et al.*, 1998). It has also been reported that plant-microorganism interaction generate significant metabolic changes by the transition of sink-source from photosynthetic tissues (Berger *et al.*, 2007) and more recent evidence published by Ezquer *et al.* (2010) indicate that the microorganisms are capable of emitting volatile compounds that change the metabolic profile of plants, generating modifications in its growth and development.

It is expected that the strains isolated and characterized in this work contribute significantly to the study of the pathways that regulate plant-microorganism interactions, as well as the development of biofertilizers demanded by modern agriculture.



La cepa de *Ramlibacter* sp., (INI26-13), fue la mejor efectora de la formación de nódulos en raíces de frijol, lo cual se vio reflejado en un incremento del peso seco y en cambios en el perfil de carbohidratos tanto en raíz como en vástago.

Las cepas de *Ramlibacter* sp., (INI26-13) y *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) fueron capaces de inducir la acumulación de almidón en vástagos de frijol.

Los resultados obtenidos con el tratamiento de la cepa *Ramlibacter* sp., resultan 100% novedosos ya que actualmente no se han reportado efectos de promoción de crecimiento con esta bacteria.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue desarrollado con recursos otorgados a través de proyectos 2013 del INIFAP mediante el convenio Núm. 15534132023.

## Literatura citada

- Allen, O. N. and Allen, E. K. 1981. The *Leguminosae*; a source book of characteristics, uses, and nodulation. University of Wisconsin Press, Madison. 511-515 pp.
- Angeles-Núñez, J. G. and Tiessen A. 2010. Arabidopsis sucrose synthase 2 and 3 module metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta*. 232:701-718.
- Antoun, H.; Beauchamp, C. J.; Goussard, N.; Chabot, R. and Lalande, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativa* L.). *Plant Soil*. 204:57-67.
- Atieno, M.; Herrmann, L.; Okalebo, R. and Lesueur, D. 2012. Efficiency of different formulations of *Bradyrhizobium japonicum* and effect of co-inoculation of *Bacillus subtilis* with two different strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *W. J. Microbiol. Biotech*. 7:2541-2550.
- Beauchamp, C. J. 1993. Mode d'action des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes et potentiel de leur utilisation comme agent de lutte biologique. *Phytoprotection*. 74:19-27.
- Berger, S.; Sinha, A. and Roitsch, G. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot*. 58:4019-4026.
- Blum, A. 1998. Improving wheat grain filling under stress by stem reserve mobilization. *Euphytica*. 100:77-83.
- Dardanelli, M. S.; Carletti, S. M.; Paulucci, N. S.; Medeot, D. B.; Rodríguez, E. A.; Vita, F. A.; Bueno, M.; Fumero, M. V. and García, M. B. 2011. Benefits of plant growth-promoting rhizobacteria and rhizobia in agriculture. *Microbiol Monographs*. 18:1-20.
- Daubenmire, R. F. 1974. Plants and environment. A textbook of autoecology. Wiley, J. and Sons. L. Inc, New York. 422.

## Conclusions

Three strains were isolated, molecular and biochemically characterized, from root nodules of soy (INI26-13, INI43-13 and INI51-13) and one from root nodules of jicama (INI13-13).

*Ramlibacter* sp. (INI26-13) was the best on nodule formation in roots of bean, which was reflected in an increase of dry weight and in changes on carbohydrate profile both in root and in stem.

*Ramlibacter* sp. (INI26-13) and *Bradyrhizobium japonicum* (INI13-13) were able to induce the accumulation of starch in bean stems.

The results obtained with the treatment of *Ramlibacter* sp., are 100% novel since nowadays has not been reported effects of growth promotion with this bacteria.

*End of the English version*



- Ezquer, I. Li. J.; Ovecka, M.; Baroja-Fernández, E.; Muñoz, F. J.; Montero, M.; Díaz de Cerio, J.; Hidalgo, M.; Sesma, M. T.; Bahaji, A.; Etxeberria, E. and Pozueta-Romero, J. 2010. Microbial volatile emissions promote accumulation of exceptionally high levels of starch in leaves in mono and dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol*. 51:1674-1693.
- Fait, A.; Angelovici, R.; Less, H.; Ohad, I.; Urbanczyk-Wochniak, E. and Fernie, A. R. 2006. Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol*. 142:839-854.
- Fiasconaro, M. L.; Gogorcena, Y.; Muñoz, F.; Andueza, D.; Sánchez-Díaz, M. and Antolín, M. C. 2012. Effects of nitrogen source and water availability on stem carbohydrates and cellulosic bioethanol traits of alfalfa plants. *Plant Sci*. 191-192:16-23.
- Flores, H. E.; Vivanco, J. M. and Loyola-Vargas, V. M. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci*. 4:220-226.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1984. Legume inoculants and their use. Rome, Italy: FAO. 1-32 pp.
- Frayse, N.; Jabbouri, S.; Treilhou, M.; Couderc, F. and Poinot, V. 2002. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides. *Glycobiology*. 12:741-748.
- Freixas, J. A.; Reynaldo, I. M. and Napoles, M. C. 2010. Influencia de la sequía sobre el metabolismo del nitrógeno fijado durante la simbiosis *Bradyrhizobium*-soya. *Cultivos Tropicales*. 31:66-73.
- Graham, P. H. and Parker, C. A. 1964. Diagnostic features in the characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant Soil*. 20:383-396.



- Heulin, T.; Barakat, M.; Chisten, R.; Lesourd, M.; Sutra, L.; De Luca, G. and Achouak, W. 2003. *Ramlibacter tataouinensis* gen. nov., sp. nov., and *ramlibacter henchirensis* sp. nov., cyst-producing bacteria isolated from subdesert soil in Tunisia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:589-594.
- Ishizawa, S. 1954. Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants. II. The relationship between nodule bacteria and leguminous plants, part 1. From the view of nodule roduction.
- Kapulnik Y. 1996. Plant growth promoting rhizosphere bacteria. *In: plant roots the hidden half*, Waisel, Y.; Eshel, A. and Kafkafi, U. (Eds.). Marcel, D., N.Y. 769-781.
- Klopper, J. W. and Beauchamp, C. J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219-1232.
- Lazarovits, G. and Nowak, J. 1997. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment, *HortScience.* 32:188-192.
- Lightfoot, D. A. 2008. Soybean genomics: developments through the use of cultivar "Forrest". *Intern. J. Plant Gen.* 793158:1-22.
- Ludwing, F.; Dawson, T. E.; Prins, H. H. T.; Berendse, F. and de Kroon, H. 2004. Below-ground competition between trees and grasses may overwhelm the facilitative effects of hydraulic lift. *Ecol Lett.* 7:623-631.
- Madani, A.; Shirani- Rad, A.; Pazoki, A.; Nourmohammadi, G. and Zarghami, R. 2010. Wheat (*Triticum aestivum* L.) grain filling and dry matter partitioning responses to source: sink modifications under postanthesis water and nitrogen deficiency. *Acta Sci. Agron.* 32:145-151.
- Meza, G. J. C. 2010. Acumulación de nitrógeno en suelos y residuos vegetales de un cultivo con dos variedades de jícama (*Pachyrhizuserosus*). Tesis de ingeniería. Facultad de agro-biología. 25-32 pp.
- Mi, G.; Chen, F. and Zhang, F. 2009. Grain filling rate is limited by insufficient sugar supply in the large-grain wheat cultivar. *J. Plant Breed. Crop Sci.* 1:60-64.
- Olivares- Sáenz, E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL versión 2.5, Facultad de Agronomía UANL, Martín N. L.
- Pueppke, S. G. and Broughton, W. J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 12:293-318.
- Rispaila, N.; Kalo, P.; Kissb, G. B.; Ellisc, N. T. H.; Gallardod, K.; Richard, D.; Thompsond, Pratsa, E.; Larrainzare, E.; Ladrerae, R.; González, E. M.; Arrese- Iгоре, C.; Fergusong, B.; J.; Gresshoffg, P. M. and Rubiales, D. 2010. Model legumes contribute to faba bean breeding. *Field Crop Res.* 253-262.
- Sadowsky, M. J.; Cregan, P. B. and Keyser, H. H. 1988. Nodulation and nitrogen fixation of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1907-1910.
- Stephan- Sarkissian, G. and Grey, D. 1990. Growth determination and medium analysis. *Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology.* 6:13-27.
- Taha, S. M.; Mahmoud, S. A. and Salem, S. H. 1970. Differentiation of root-nodule bacteria. *In: Iizuka, L. and Hasegawa, T. (Eds.). Culture collections of microorganisms.* University Park Press, Baltimore. 523-539 p.
- Walker, T. S.; Pal- Bais, H.; Grotewold, E. and Vivanco, J. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132:44-51.
- Yadegari, M.; Rahmani, H.; Noormohammadi, A. and Ayneband, G. 2008. Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components. *Pak. J. Biol. Sci.* 11:1935-1939.