



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE
CEPAS DE *Azospirillum* spp. DE
VENEZUELA AISLADAS DE LA
RIZÓSFERA DE CULTIVOS DE MAÍZ
(*Zea mays* L.) Y CAÑA DE AZÚCAR
(*Saccharum officinarum* L.) MEDIANTE
CEBADORES ERIC Y BOX A1R.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

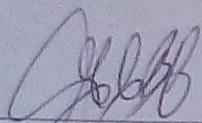
Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por el bachiller Jesús Pino como
requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Biología.

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE – 2016

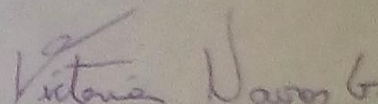
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. JESUS A. PINO C.**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Jesús A. Pino C., C.I: 18.915.434, titulado "Caracterización molecular de cepas de *Azospirillum* spp. de Venezuela aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante cebadores ERIC y BOX AIR.", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

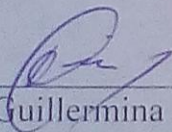
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinte (20) días del mes de Octubre del año 2016, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



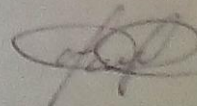
Prof. Giovanni Angiolillo



Profa. Victoria Navas



Prof. Guillermina Alonso
(Tutor - Coordinador)



Prof. Luis R. Angulo G.
(Tutor)

RESUMEN

El género *Azospirillum* comprende rizobacterias de vida libre con capacidad de fijación de nitrógeno y posee potencialidades benéficas, por la capacidad para reducir nitrato, solubilizar fosfatos y, sintetizar antibióticos y fitohormonas como sustancias promotoras del crecimiento de las plantas. En las plantas, la inoculación bacteriana promueve el desarrollo radical y el incremento de la tasa de absorción de agua y minerales. En consecuencia, la producción de biofertilizantes en base a cepas de *Azospirillum* spp. favorecería el manejo de los cultivos y la aplicabilidad de una tecnología ecológica con el ambiente. En el 2010 se inició el Proyecto de Biofertilizantes, Biocontroladores y Bioestimulantes para una Agricultura Sustentable (PBAS), con la finalidad de aislar cepas bacterianas procedentes de la rizósfera de los cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), en siete (7) estados de Venezuela. El objetivo de esta investigación fue caracterizar molecularmente veinte (20) cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de muestras de suelos de uso agrícola sin fertilizantes en esos cultivos, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores ERIC (ERIC 1R, ERIC 2) y BOX A1R. La PCR se realizó con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 minuto a 94 °C, hibridación 1 min a 55 y 60 °C, respectivamente, elongación 2 min a 72 °C (35 ciclos). Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. Todos los cebadores empleados en la amplificación por PCR generaron bandas polimórficas, observándose un máximo de 29 bandas generadas. Mediante el análisis de agrupamiento UPGMA, basado en el coeficiente de similitud de Dice, se conformaron cuatro grupos para los cebadores ERIC y BOX. En la amplificación de las secuencias ERIC-BOX, se conformaron 5 grupos. La amplificación por PCR de elementos repetitivos en este estudio resultó informativa para la caracterización molecular de *Azospirillum* spp. detectando alta variabilidad genética entre las cepas.

Palabras clave: Caracterización molecular, *Azospirillum* spp., agricultura sustentable

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad.

A la UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA, la casa que vence las sombras, por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

Al INSAI por el financiamiento de la investigación y al Laboratorio Bolívar Conservacionista del INIA-CENIAP por las actividades realizadas en la caracterización bioquímica y morfológica de las cepas.

Le doy gracias a mi abuela, Nidia Cárdenas (QEPD) por apoyarme en todo momento, por los valores inculcados, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida.

A mis hermanas, Kathlen, María Alexandra y Dharay Pino, y mi padre Hamil Pino, por ayudarme con mi desarrollo personal y profesional, y estar cuando más lo he necesitado.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mis Tutores: Angulo Luis y Alonso Guillermina. Igualmente a la Profa. Valentina Salas.

También me gustaría agradecer a mi familia, a todos los que participaron en mi formación, a cada uno de ustedes gracias por apoyarme y ayudarme a llegar hasta el final de esta etapa de vida, cada uno fue fundamental para estar en este punto; a Noemi Cárdenas y Yermey Rangel, gracias.

A mis amigos por confiar y creer en mí, brindarme su amor, y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré. Particularmente gracias a Alicia Quintero, Desireé Rojas, Katerin Joachimi, Yeni Vivas y Wilkianys Monasterios, su apoyo y cariño fue fundamental para llegar donde estoy.

A todos aquellos que, de una u otra manera, llegaron a mi vida para marcar cambios positivos, a cada uno de ustedes (Ana M., Vanessa A., Adriana C., Víctor C., Mayra Q., Zuleima S., Maxs M., Oriana M., Yeimi N., entre otros). Para ellos: Muchas gracias de corazón y que Dios los bendiga.

Jesús A. Pino C.

DEDICATORIA

A la memoria de mi Abuela, Nidia María Cárdenas Hernández de Pino (QEPD) que con la sabiduría de Dios me enseñaste a ser quien soy hoy. Gracias por tu paciencia, por enseñarme el camino de la vida, gracias por tus consejos, por el amor que me brindaste y el apoyo incondicional en mi vida. A ella se lo debo todo. Gracias por llevarme siempre en tus oraciones, estoy seguro que siempre lo harás.

INDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE SIGLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Proteobacteria.....	5
1.1.1. <i>Azospirillum</i> spp.....	5
1.1.2. <i>Azospirillum brasilense</i>	8
1.2. Cultivo de Maíz y Caña de azúcar.....	9
1.2.1. Maíz.....	9
1.2.2. Caña de azúcar.....	10
1.3. Bioinsumos.....	13
1.3.1. Biofertilizantes.....	13
1.4. Caracterización Molecular.....	14
1.4.1. Determinación de cantidad y pureza del ADN.....	16
1.4.2. Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR).....	17
1.4.3. Amplificación por PCR de elementos repetitivos.....	18
1.4.4. Marcadores Moleculares.....	18
1.4.4.1. Secuencias ERIC y BOX-PCR.....	20
1.5. Cuantificación de los Marcadores Moleculares.....	21
2. ANTECEDENTES	21

3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	26
5. MATEIALES Y MÉTODOS.....	27
5.1. Materiales.....	27
5.2. Métodos.....	29
5.2.1. Extracción de ADN.....	29
5.2.2. Cuantificación y pureza del ADN.....	30
5.2.3. Iniciadores Genéricos: ERIC y BOX A1R.....	31
5.2.3.1. Amplificación PCR.....	32
5.2.3.2. Visualización de los Productos Amplificados PCR.....	33
5.2.4. Análisis Estadístico.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7. CONCLUSIONES.....	55
8. BIBLIOGRAFÍA.....	57
9. ANEXOS.....	62
9.1. Aval Bioético de la institución responsable del proyecto: Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, UCV.....	62
9.2. Aval de consentimiento informado del Instituto y Departamento de Genética, Facultad de Agronomía, UCV.....	64
9.3. Aval de consentimiento informado del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, UCV.....	65

9.4. Manual de Bioseguridad del Laboratorio de Genética Molecular: Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, UCV.....	66
9.5. Estimación de Bioriesgo Ambiental.....	71
9.6. Riesgos Biológicos: Procedimientos al trabajar con Microorganismos.....	73
10. APÉNDICE.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación del género <i>Azospirillum</i> spp.....	7
Tabla 2. Producción agrícola, años 2008, 2014 y 2015.....	12
Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas en el Laboratorio Bolívar Conservacionista a los aislados bacterianos para su identificación preliminar como <i>A. spp.</i>	28
Tabla 4. Medio de reacción de PCR para iniciadores genérico ERIC y BOX A1R.....	32
Tabla 5. Programas de amplificación por PCR para iniciadores genérico ERIC y BOX A1R.....	32
Tabla 6. Cuantificación del ADN de <i>Azospirillum</i> spp. mediante NanoDrop.....	36
Tabla 7. Muestras <i>Azospirillum</i> spp. seleccionadas para la amplificación por PCR.....	38
Tabla 8. Cebadores utilizados en el estudio y número de bandas polimórficas.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología celular de <i>Azospirillum brasilense</i>	9
Figura 2. Estados de Venezuela donde se realizaron las colectas para la obtención de los aislamientos.....	27
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la extracción de ADN de 27 muestras de <i>Azospirillum</i> spp.....	36
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de <i>Azospirillum</i> spp. mediante cebadores ERIC 1R y ERIC 2.....	39
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de <i>Azospirillum</i> spp. mediante cebador BOX- A1R.....	40
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de <i>Azospirillum</i> spp. mediante cebadores ERIC 1R, ERIC 2 y BOX- A1R.....	41
Figura 7. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para los cebadores ERIC.....	43
Figura 8. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de <i>Azospirillum</i> a partir del Análisis de Coordenadas Principales para los cebadores ERIC.....	45
Figura 9. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para el cebador BOX-A1R.....	46
Figura 10. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de <i>Azospirillum</i> a partir del Análisis de Coordenadas Principales para el cebador BOX-A1R.....	48
Figura 11. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para los cebadores ERIC y BOX.....	49
Figura 12. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de <i>Azospirillum</i> a partir del Análisis de Coordenadas Principales para los cebadores ERIC y BOX.....	50

LISTA DE SIGLAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AM-CR	Agar selectivo Ácido Málico - Rojo Congo
BOX A1R	Secuencia en mosaico del elemento BOX
CENIAP	Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias
CIBA	Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola
ERIC	Secuencias consenso intergénicas repetidas enterobacteriales
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
INSAI	Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral
LBC	Laboratorio Bolívar Conservacionista
MPPAT	Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHB	poli-β-hidroxibutirato
rep-PCR	Amplificación por PCR de elementos repetitivos
NFB	Medio libre de nitrógeno

1. INTRODUCCIÓN

Durante muchos años el planeta ha sufrido de la severidad del tiempo atmosférico como consecuencia de la contaminación, ya sea con desperdicios, gases de invernadero o fertilizantes químicos. Por todo esto, en los últimos años surge la idea de usar seres vivos (Bacterias) como promotores de crecimiento en las plantas, y como biocontroladores de plagas, reduciendo así el uso de químicos en la agricultura (Leal, 2009). En Venezuela, el Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras (MPPAT) realizó proyecciones sobre las necesidades de fertilizantes nitrogenados, estableciendo estrategias para disminuir las importaciones de alimentos y estimando el incremento de la superficie para la producción agrícola vegetal en 4.230.514 ha, en el período 2009-2019. Esto significaría elevar los requerimientos de fertilizantes, necesitando 671.299,97 y 1.585.226,55 t.año⁻¹ de urea y fórmula completa, respectivamente (López y col. 2010).

El nitrógeno es el nutriente que presenta deficiencias más generalizadas en la mayoría de cultivos, sin embargo, si los otros elementos nutricionales no se encuentran en niveles de suficiencia, la toma de nitrógeno será limitada (FAO, 1989). Cualquier material natural o industrializado, que contenga al menos cinco por ciento de uno o más de los tres nutrientes primarios requeridos por la planta (N, P₂O₅, K₂O), puede ser llamado fertilizante (FAO, 2002). Los fertilizantes a base de nitrógeno son clave en la producción de alimentos en el mundo. Después del carbono, el oxígeno y el hidrógeno, el nitrógeno es el cuarto elemento más abundante en las plantas. Es parte fundamental en la formación de proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y hormonas; las vitaminas del complejo B, las lectinas, glucósidos

y los alcaloides igualmente contienen este elemento. Al incrementar el contenido de nitrógeno en la planta se favorece la formación de compuestos proteicos, lo que a su vez estimula el desarrollo foliar de la planta y la fotosíntesis (Pérez, 2014).

El uso de nitrógeno, considerado motor del crecimiento de la planta, de manera excesiva y desequilibrada en cereales/arroz puede resultar en vuelco, mayor competencia de malas hierbas y ataques de plagas, con pérdidas sustanciales de producción de cereal o de arroz (en otros cultivos decrecerá la calidad, particularmente la capacidad de almacenamiento). Además, el nitrógeno no absorbido por el cultivo posiblemente se pierda en el ambiente (FAO, 2002). A pesar de su gran importancia y utilidad, la baja eficiencia en el uso del nitrógeno ha generado importantes daños económicos y medioambientales.

La necesidad de sustituir la agricultura convencional a base de agroquímicos por una agricultura sostenible, menos agresiva con el medio ambiente, ha llevado a la investigación y desarrollo de nuevos productos que sean biotecnológicamente viables con un impacto mínimo para el ecosistema y la salud humana (Rivera, 2008). La agroecología considera el conocimiento de los elementos y procesos que regulan el funcionamiento de los agroecosistemas y establece las bases científicas para una gestión eficaz, en armonía con el ambiente, proponiendo diseño de modelos agrarios, socialmente sensibles, centrados tanto en la producción, como en la estabilidad ecológica de los agroecosistemas, siendo los bioinsumos claves para garantizar la sustentabilidad agrícola (Toro y col. 2008).

En Venezuela, mediante la Ley de Salud Agrícola Integral (2008) se dio rango jurídico a la agricultura sustentable y al desarrollo rural integral. Esta Ley garantiza, a través de una plataforma biotecnológica en construcción, la producción de biofertilizantes simbióticos y asimbióticos, como estrategia de Estado para disponer de tecnologías alternativas que permitan transitar hacia un modelo socioproductivo sustentable (López y col., 2009).

Una alternativa de manejo para mejorar el estado nutricional de los suelos es el uso de mecanismos biológicos que permitan restituir su fertilidad, sin perturbar y/o empeorar su condición (Toro y col. 2008). Desde el punto de vista de una agricultura sostenible, los fertilizantes biológicos constituyen un medio económicamente viable y ecológicamente aceptable, al reducir los costos de producción en aquellos productores con acceso limitado a fertilizantes de síntesis química (Rivera, 2008).

Los microorganismos de la rizósfera, son esenciales porque juegan un papel muy importante en la metabolización o transformación de los nutrimentos de las plantas y pueden producir fitohormonas, las cuales son importantes para el desarrollo de la planta. Dentro de éstos microorganismos se encuentran las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y de éstas las más estudiadas son las rizobacterias. Éstas fueron definidas como de vida libre que bajo algunas condiciones, benefician a las plantas, incrementando su crecimiento y productividad. Cabe mencionar que la rizósfera alberga microorganismos de interés agrícola tales como simbiotes; dentro de estos microorganismos se encuentra *Azospirillum brasilense* que es una bacteria promotora del crecimiento vegetal, principalmente en gramíneas como sorgo y maíz (Vital y col., 2015).

El género *Azospirillum* se encuentra en especies distintas a los cereales bajo diversidad de suelos, climas y manejo agronómico (Cello y col., 1997). Sintetiza fitohormonas que promueven el crecimiento y cambios morfológicos y fisiológicos de la raíz y micro-biocontrol. Esto resulta en un mejor aprovechamiento de agua y nutrimentos, incremento de rendimiento, y productividad efectiva y consistente (Rangel-Lucio y col., 2011).

Bajo esta interacción “asociativa”, *Azospirillum* promueve la fijación biológica de nitrógeno sin formar nódulos en caña de azúcar, maíz o arroz (Sevilla y col., 2001), sin causar síntomas de enfermedad (Sturz y Nowak, 2000).

Cuando un bioinsumo se produce a escala comercial, se formula, empaqueta y vende como biofertilizante o biocontrolador, se requiere de su registro ante la autoridad competente, quien debe asegurar las pautas de identidad, eficacia agronómica, seguridad para el ambiente, la salud y el control de calidad (Altier, y col., 2012).

En Venezuela, mediante la Ley de Salud Agrícola Integral (2008) se dio rango jurídico a la agricultura sustentable y al desarrollo rural integral. Ese proyecto está conformado por tres ejes: *Azospirillum*, *Pseudomonas* y *Rhizobium*.

El propósito de este trabajo fue estandarizar técnicas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y en la amplificación de secuencias repetitivas ERIC y BOX-PCR ampliamente distribuidas en el genoma bacteriano para poder realizar la caracterización rápida y específica de cepas de *Azospirillum* spp. de

Venezuela, y de esta manera asegurar la identidad de los microorganismos que serán empleados en la elaboración de biofertilizantes en el INSAI.

Es importante señalar, que la investigación fue el primer trabajo en Venezuela en biología molecular para caracterización del género de *Azospirillum*.

1.1 Proteobacteria

El phylum Proteobacteria constituye en la actualidad el linaje filogenético fenotípicamente más diverso. Stackebrandt y col. (1988), lo llamaron Proteobacterias en honor al Dios griego Proteus, ya que podría asumir muchas formas diferentes, para reflejar la enorme diversidad de morfologías y fisiologías observadas dentro de este phylum bacteriano (Falkow y col., 2006).

Las Proteobacterias (o bacterias púrpuras) comprenden una de las mayores divisiones dentro de los procariotas y representan la gran mayoría de las bacterias Gram-negativas conocidas (Gupta, 2000). Este grupo es de gran importancia biológica, ya que incluye un gran número de patógenos en humanos, animales y vegetales. La mayoría de las bacterias de interés médico, veterinario, industrial y agrícola pertenecen a las proteobacterias (Falkow y col., 2006).

1.1.1 *Azospirillum* spp

Spirillum lipoferum, ahora llamado *Azospirillum*, fue descrito por primera vez en 1925 por Martinus Willem Beijerinck, luego de lo cual la bacteria permaneció en el olvido por varias décadas. Las observaciones de Juan José Peña-Cabriales y Johanna Döbereiner en 1973, inician la época moderna de este microorganismo (Rivera, 2008).

El género *Azospirillum* fue el primero estudiado por J. Döbereiner por su capacidad de fijación de nitrógeno y ocurrencia en la rizósfera, formando diferentes clases de asociaciones simbióticas con plantas no leguminosas. Las especies de *Azospirillum* son rizobacterias fijadoras de nitrógeno, con potencial para incrementar los rendimientos de cereales y gramíneas de importancia económica en diferentes regiones climáticas. Las bacterias del género *Azospirillum* spp. pueden utilizar como fuente de carbono azúcares, alcoholes, sales de ácidos orgánicos y como fuente de nitrógeno pueden disponer de nitrato, sales de amonio y ciertos aminoácidos (Rivera, 2008).

Las bacterias del género *Azospirillum*, tienen rutas metabólicas de utilización del carbono y nitrógeno muy versátiles, adaptados para establecerse en ambientes competitivos, donde predominan la desecación y limitación de nutrientes. Además, estas bacterias tienen mecanismos fisiológicos eficientes, como la formación de quistes y flóculos, producción de melanina y protección interna contra esporas de hongos, las cuales les ayudan a sobrevivir en condiciones desfavorables. El cambio morfológico está acompañado por el desarrollo de una capa externa de polisacáridos y por la acumulación de gránulos de poli- β -hidroxibutirato, que pueden servir como fuente de carbono y energía bajo condiciones de estrés e inanición, y que no sólo tienen propiedades similares a las del petróleo sino que, además, son biodegradables en un tiempo promedio de 6 a 12 meses cuando se exponen a la microbiota del suelo y a los sedimentos marinos (Baca y col., 2010).

El resumen de las características morfológicas y metabólicas para la identificación de *Azospirillum* spp. se encuentra reportado en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984), el cual se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación del género *Azospirillum* spp.

PRUEBA BIOQUÍMICA	RESULTADO PARA <i>Azospirillum</i> spp.
Tinción Gram	Gram (-)
Forma Celular	Bacilos ligeramente curvados o rectos.
Catalasa	+
Oxidasa	+
Ureasa	+
Sulfatos	-
Indol	-
Lactosa	-
Motilidad	+ de forma espiral.
Reducción de nitratos	+
Tinción del polímero Poli- β -hidroxibutirato	+
Crecimiento en medio NFB semisólido	Presencia de un velo espeso de color blanco, entre 0.5 y 1.5 cm bajo la superficie y cambio de color del medio de verde a azul.
Morfología de colonias en Agar AM-CR	Las colonias poseen forma: circular ovoide con paredes gruesas similares a quistes; superficie: rugosa y brillante; de bordes ondulados; consistencia: cremosa; y adquieren una coloración rojo oscuro o escarlata por absorción del colorante rojo Congo.

Taxonómicamente, según la novena edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Holt y col. 1994), el género *Azospirillum* pertenece a:

Domino:	Bacteria
División:	Proteobacteria
Clase:	Alpha-Proteobacteria
Orden:	Rhodospirillales
Familia:	Rhodospirillaceae
Género:	<i>Azospirillum</i>
Especies:	<i>A. brasilense</i> , <i>A. lipoferum</i> , <i>A. amazonense</i> , <i>A. halopraeferans</i> , <i>A. irakense</i> , <i>A. largimobile</i> , <i>A. doebereineriae</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. melinis</i> , <i>A. zaeae</i> , <i>A. canadense</i> y <i>A. rugosum</i>

1.1.2 *Azospirillum brasilense*

Azospirillum brasilense son bacterias aeróbicas fijadoras de nitrógeno o diazótrofos, forma Gram-negativas, móviles, espiral, con flagelo polar en medio líquido, flagelo polar y cilios lateral en medios sólidos (Cassán y García, 2008); con un diámetro de 0,8 a 1µm de largo y 2 a 4µm de ancho, tienen una cantidad de G+C equivalente al 68% a 70%. Ellos son capaces de llevar a cabo todas las vías del ciclo del nitrógeno, excepto la nitrificación. Estas células son bacterias típicas quimioorganotróficas, positivos para prueba de hidrogenasa, producir fitohormonas tales como auxinas, giberelinas y citoquininas, fijan N₂ en condiciones tropicales (30-40°C), pueden colonizar los tejidos de cultivos como maíz, trigo, arroz, sorgo y plantas no gramíneas como endófitos facultativos y se producen diazótrofos asociados a la rizosfera (Cassán y García, 2008).

En la siguiente figura, se muestra la morfología celular de *Azospirillum brasilense*.

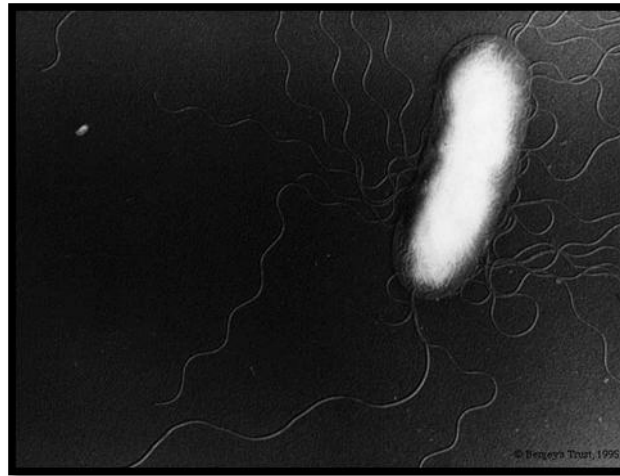


Figura 1. Morfología celular de *Azospirillum brasilense*.
(<http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrs0160.jpg>)

Algunas de sus características útiles en la identificación rutinaria son la forma vibroide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral. Las células contienen cantidades elevadas de poli- β -hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Rivera, 2008), observándose al microscopio las células jóvenes con abundantes gránulos refringentes.

1.2 Cultivo de Maíz y Caña de azúcar

1.2.1 Maíz

El maíz es una planta anual con un gran desarrollo vegetativo, tallo nudoso y macizo con quince a treinta hojas alargadas y abrasadoras. Es una planta monoica o sea que cada una lleva flores masculinas y femeninas. Es el cultivo más importante del sector agrícola vegetal en Venezuela y ha sido considerado como un rubro estratégico, dada su importancia en la dieta diaria del venezolano, con un aporte proteico de 6,5 gramos/persona/día y aporte calórico de 316 calorías/persona/día,

además de constituir una fuente generadora de empleos debido al gran número de personas que lo cultivan a través de casi toda la geografía nacional (Segovia y Alfaro, 2009).

“La producción de maíz en el 2015 se estimó en 1.244.250 t, el volumen más bajo desde el año 2003. En comparación con el año 2014, la producción de este rubro cayó un 26% y la participación de la producción nacional en el consumo aparente se redujo a un 32%” (FEDEAGRO, 2015). Los productores de maíz se vieron afectados por el régimen climático perdiéndose área sembrada y retrasándose la época de siembra de invierno, hecho que afectó la productividad del cultivo (FEDEAGRO, 2015).

Hasta finales de la década del 50, la producción de maíz estaba distribuida en todo el territorio nacional, siendo los estados de mayor concentración de la producción: Guárico, Portuguesa, Zulia, Falcón, Anzoátegui y Trujillo; en las décadas del 70 y el 80 se percibe el cambio en lo que respecta al uso de las tecnologías y la concentración de la superficie cosechada en los estados llaneros (Guárico, Portuguesa y Barinas); los estados Zulia, Trujillo y Falcón son desplazados como estados productores de maíz. Esta situación se mantiene similar hasta la fecha actual, adicionándose los estados Yaracuy y Bolívar (Segovia y Alfaro, 2009).

1.2.2 Caña de azúcar

La caña de azúcar, *Saccharum* spp. híbrido, en Venezuela se cultiva en diferentes ambientes, desde zonas con alta pluviosidad como los llanos occidentales, hasta las zonas de baja precipitación, y en suelos arcillosos hasta suelos arenosos. Esto

refleja la gran importancia que tiene este cultivo para el país (Bastidas y col., 2009); sin embargo, se ha mantenido un orden deficitario de aproximadamente 30% en la producción nacional de azúcar, señalándose entre otras causas de este déficit, al factor varietal, a los bajos niveles de productividad y a la poco favorable relación costo/beneficio (Zérega y col., 2001).

En la producción de caña de azúcar la caída fue del 21,2%, y el volumen producido, 4.700.000 t, el mayor decrecimiento de los últimos años. En este cultivo confluyen los factores adversos que pesan sobre la agricultura venezolana, en especial los relativos al no reconocimiento de los costos en los precios del producto terminado y el retraso en el pago del subsidio. El costo del servicio de cosecha se ha elevado considerablemente como consecuencia de la escasez de repuestos, cauchos, baterías de la maquinaria y el transporte de las empresas especializadas en este servicio (FEDEAGRO, 2015). Otro hecho que marcó el comportamiento de la cosecha del 2015 fue el diferimiento del proceso de caña por parte de los Centrales del estado, los cuales no operaron a su capacidad, quedando alrededor de 300.000 t de caña en campo sin cosechar (FEDEAGRO, 2015).

En Venezuela la caña de azúcar se cultiva desde zonas con alta pluviosidad como el sur del Lago de Maracaibo hasta zonas de baja precipitación como el centro y oeste del estado Lara y en suelos que varían desde arcillosos hasta arenosos (Marcano, 2003).

FEDEAGRO en el 2015 publicó una comparación de producción agrícola para los años 2008, 2014 y 2015, la cual se muestra en la Tabla 2, evidenciando un decrecimiento de la producción para ambos rubros alimenticios.

Tabla 2. Producción agrícola, años 2008, 2014 y 2015. (FEDEAGRO, 2015).

Comparación Resultados Producción Agrícola. Años 2008, 2014 y 2015.					
Rubro	Producción 2008 (t)	Producción 2014 (t)	Producción 2015 (t)	Crecimiento 15-08 (%)	Crecimiento 15-14 (%)
Maíz	2.995.662	1.675.389	1.244.250	-58,5%	-25,7%
Caña	9.690.791	5.961.000	4.700.000	-51,5%	-21,2%

Los estudios de supervivencia de *Azospirillum* en su nicho microecológico natural demuestran que este microorganismo sobrevive por periodos prolongados y sólo el tamaño de la población llega a variar. Se ha demostrado que *Azospirillum* sobrevive en raíces durante toda la temporada de crecimiento de cereales (Bashan y Levanony, 1987). La importancia ecológica de esta habilidad de supervivencia a largo plazo todavía tiene que ser determinada.

Azospirillum tiene el potencial para mantener un buen nivel de supervivencia en la rizósfera. Es probable que su versatilidad metabólica le permita competir eficazmente con otra microflora de la rizósfera (de-Bashan y col., 2007).

En la aplicación del biofertilizante *Azospirillum* en relación con el fertilizante nitrogenado, se aprecia rendimientos superiores a las 30 t/ha de caña (Becerra y col., 2014), además, en los tratamientos con *Azospirillum brasilense* se incrementa significativamente el diámetro del tallo, longitud del tallo y número y longitud de las raíces (Serna y col., 2011). Ambos autores consideran que resulta más rentable

económicamente aplicar el biofertilizante como una alternativa al uso de fertilizantes químicos.

Dada la capacidad de *Azospirillum* para sobrevivir por periodos prolongados, su habilidad de reinoculación y su fase aérea, ya que una sola inoculación del producto bastaría para producir efectos benéficos por varios años (de-Bashan y col., 2007), el Proyecto de Biofertilizantes, Biocontroladores y Bioestimulantes para una Agricultura Sustentable consideró a este microorganismo como microorganismo promisorio para la producción de bioinsumos con potencial de biofertilizar eficiente y eficazmente gramíneas y otras especies de interés socio productivo.

1.3 Bioinsumos

Un bioinsumo se define como un producto de origen biológico formulado con microorganismos (ej. Bacterias, hongos, virus) o con compuestos activos microbianos, los cuales son utilizados para mejorar la productividad, la calidad y la salud de las plantas, o las características biológicas del suelo (Altier, y col., 2012).

Para formular un bioinsumo, las cepas o metabolitos microbianos son seleccionados por su capacidad de promover el crecimiento vegetal: de forma directa, facilitando la absorción de nutrientes por la planta o de forma indirecta, contribuyendo al manejo sanitario de enfermedades y plagas de impacto económico; incluyendo biofertilizantes y biocontroladores (Altier, y col., 2012).

1.3.1 Biofertilizantes

El biofertilizante, es un bioinsumo elaborado con base en una o más cepas de microorganismos benéficos que, al aplicarse al suelo o a las semillas, promueve el

crecimiento vegetal o favorece el aprovechamiento de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera. Incluye entre otros los inoculantes elaborados con rizobios, micorrizas y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Altier, y col., 2012).

Los biofertilizantes o bioestimuladores microbianos representan un componente vital de los elementos sustentables, ya que constituye un medio económicamente atractivo y ecológicamente aceptable al reducir los insumos externos y mejorar la cantidad y calidad de los recursos internos, mediante la utilización de microorganismos del suelo debidamente seleccionados, mediante identificación morfológica, bioquímica, molecular, y estudios en campo, capaces de aportar a los cultivos el nitrógeno fijado de la atmosfera, fosforo transformado a partir del que está fijado en el suelo y sustancias fisiológicamente activas que, al interactuar con la planta, desencadenan una mayor activación del metabolismo vegetal (Castellanos y Valecillos, 2011).

Para el desarrollo y producción de bioinsumos, es necesario identificar correctamente los microorganismos a utilizar. En ocasiones los datos de caracterización bioquímica y evaluación morfológica no son suficientes para establecer diferencias entre individuos de una misma especie, sin embargo es posible recurrir a estudios del genoma, utilizando marcadores moleculares.

1.4 Caracterización Molecular

Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así

como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. El estudio del ADN ha permitido señalar aquellas características que resultan útiles o ventajosas para ciertas especies. Algunas de estas características son la resistencia natural de los microorganismos benéficos a ciertos patógenos y plagas, un alto nivel de productividad, altura ideal de las plantas, color y otras características de interés agronómico (Wilches, 2004).

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (no todas las cepas de una misma especie muestran características homogéneas, una misma cepa puede generar diferentes patrones en ensayos repetidos y también las limitaciones en las bases de datos, entre otros), los métodos moleculares se han erigido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia a los fenotípicos, permitiendo establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, una mayor precisión o una diferenciación intra-especie en grupos, biovariedades, genovariedades o similar (Fernández y col., 2010)

Se han descrito una gran cantidad de metodologías moleculares para el análisis de la diversidad genética. Estos métodos se enfocan en el estudio de genes específicos que permiten diferenciar entre especies y/o cepas (Telléz y col., 2007).

En los últimos años, se han desarrollado múltiples aplicaciones tecnológicas para la biología molecular. Existen diferentes métodos moleculares para la identificación de secuencias de ADN en organismos basadas en la amplificación *in vitro* de segmentos específicos de ADN, tecnología conocida como reacción en cadena de la polimerasa PCR (por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction). Estos métodos tienen

como ventaja su gran capacidad de multiplicación de la porción de ácidos nucleicos, lo que le da alta sensibilidad y especificidad, por la utilización de iniciadores (cebadores) capaces de reconocer una secuencia única; y su rapidez, comparada con otras técnicas tradicionales fenotípicas, lo cual es otra ventaja para destacar (Telléz y col., 2007).

1.4.1 Determinación de cantidad y pureza del ADN

La técnica NanoDrop microvolumen sistema de retención (Thermo Científico Productos NanoDrop) funciona mediante la combinación de la tecnología de fibra óptica y las propiedades naturales de la tensión superficial para captar y retener pequeñas cantidades de muestra independiente de los aparatos de contención tradicionales, tales como cubetas o capilares. Además, el sistema cuenta con un amplio rango de mediciones de concentración de ácido nucleico, básicamente eliminando la necesidad de realizar diluciones. Reducir el volumen de muestra necesario para el análisis espectroscópico, también facilita la inclusión de nuevas medidas de control de calidad a lo largo de muchos flujos de trabajo molecular, incrementando la eficiencia y en última instancia conduce a una mayor confianza en los resultados posteriores (Desjardins y col. 2010).

Es una técnica que aporta una información objetiva sobre la concentración de las muestras y su pureza. Mediante espectrofotometría se puede determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADN, basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. De este modo la concentración de la muestra de ADN se calcula

teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260nm. Mientras que la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. La relación A_{260}/A_{280} es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación $A_{260}/A_{280} > 1.6$. Un valor $A_{260}/A_{280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. Un radio $A_{260}/A_{280} > 2.1$ podría deberse a la presencia de ARN en la muestra (Desjardins y col. 2010).

1.4.2 Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción de la Cadena de la Polimerasa es una técnica descrita por Kary Mullis y su equipo en 1985 (Mullis, 1990), cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo, en teoría, de una copia única de ese fragmento (Rincones, 2008).

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de la ADN-Polimerasa para replicar hebras de ADN (Rincones, 2008). Utiliza uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente entre 10 a 30 bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la

acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Azofeita-Delgado, 2006).

1.4.3 Amplificación por PCR de elementos repetitivos (rep-PCR)

La amplificación por PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) consiste en la amplificación de fragmentos espaciadores localizados entre motivos repetidos en el genoma, mediante el uso de una pareja de cebadores en condiciones de alta restricción. Esta técnica se basa en la presencia de distintas secuencias repetitivas específicas y conservadas en el genoma de bacterias (REP, ERIC y BOX) (Pállas y col., 2008).

Así mismo, la amplificación por rep-PCR produce menor número de fragmentos de ADN amplificado (10 a 30 fragmentos por genoma que oscila entre 200pb a 6kb) en comparación con otras amplificaciones por PCR. Sin embargo, proporciona poder de discriminación entre los genotipos evaluados. Una de sus ventajas es la mayor reproductibilidad, lo cual permite su estandarización para su uso en sistemas de caracterización, y existe un juego de cebadores y un protocolo prácticamente universal para grupos de bacterias muy diversos, tolerando un alto rango de concentración del ADN (Pállas y col., 2008).

1.4.4 Marcadores moleculares

Un marcador molecular es una secuencia de ADN medible que es heredada según el Modelo Mendeliano Simple (Tapia, 1998). Según Ferrera y Grattapaglia (1998) definen un marcador molecular a cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de un segmento específico de ADN correspondiente a

regiones codificantes o no codificantes del genoma y cuya secuencia puede o no ser conocida, que presenta diferencias entre individuos y un patrón de heredabilidad medible.

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (Azofeita-Delgado, 2006).

Los marcadores moleculares presentan muchas ventajas en comparación con los marcadores genéticos de tipo morfológico, especialmente por su alto número y su independencia de los efectos del medio ambiente. Los marcadores permiten revelar las diferencias que existen entre los genomas como producto del proceso evolutivo (Wilches, 2004).

Un marcador molecular ideal debe tener algunas propiedades deseables (Kumar y col., 2009):

1. Naturaleza altamente polimórfica: Debe ser polimórfico, ya que es el polimorfismo el que se utiliza para medir la diversidad genética.
2. Herencia codominante: Determinación de los estados homocigotos y heterocigotos de organismos diploides, por ejemplo los microsatélites o SSR simples secuencias repetidas (por sus siglas en inglés: Simple sequence repeats).

3. Ocurrencia frecuente en el genoma: Un marcador debe ser distribuido uniformemente y con frecuencia a lo largo del genoma.
4. Comportamiento de selectividad neutro: Las secuencias de ADN de cualquier organismo son neutrales a condiciones ambientales o las prácticas de manejo.
5. Fácil acceso (disponibilidad): Debe ser fácil, rápido y de bajo costo su detección.
6. De ensayo fácil y rápido.
7. Alta reproducibilidad.
8. Fácil intercambio de datos entre laboratorios.

1.4.4.1 Secuencias ERIC y BOX-PCR

La introducción de técnicas como las secuencias ERIC y BOX-PCR, basadas en la amplificación por PCR de secuencias repetidas, han facilitado la tipificación de diversos microorganismos, ya que reducen los costos y el tiempo de los análisis (Rincones, 2008).

Las secuencias ERIC y BOX, la primera llamada consenso intergénicas repetidas enterobacteriales de 124 a 127pb (ERIC), y la segunda secuencias en mosaico del elemento box de 154pb (BOX A1R), tienen el potencial para formar las estructuras del stem-loop (tallo-vuelta) y pueden jugar un papel importante en la organización del genoma bacteriano (Rincones, 2008). Se piensa que la organización del genoma está formada por la selección y así la dispersión de las secuencias REP, ERIC y BOX, que pueden ser un indicativo de la estructura y evolución del genoma bacteriano (Lupski y Weinstock, 1992).

1.5 Cuantificación de los marcadores moleculares

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. Las bandas del rep-PCR se pueden cuantificar mediante un sistema binario de presencia o ausencia, aplicando el valor uno (1) si una banda está presente y cero (0) si no lo está; al aplicar dicha función se obtiene un cuadro que refleja la variabilidad de las bandas, de una forma cuantitativa y numérica, a la cual se le pueden proponer medidas estadísticas que expresen la diversidad genética entre individuos en estudio, como los índices de similaridad genética (Rincones, 2008).

2 ANTECEDENTES

Los marcadores moleculares se han utilizado en la identificación de especies y cepas dentro de un mismo género de *Azospirillum*. Carrera (2012) caracterizó mediante pruebas moleculares 20 cepas de *Azospirillum* spp, aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la sierra ecuatoriana, mediante iniciadores específicos (oligonucleótidos) para la amplificación por PCR de secuencias de genes 16S ADN ribosomal; utilizando la técnica análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado, para tres enzimas: *TaqI*, *AluI* y *EcoRI*. Mediante el programa bioestadístico NTSYSpe Versión 2.02. El autor obtuvo las matrices de similaridad mediante el coeficiente de Dice, el análisis de agrupamiento UPGMA y su representación del dendrograma. Se incluyó los patrones de restricción virtual de las especies *A. brasilense*, *A. lipoferum* y *A. amazonense* como patrones positivos. En el

análisis de agrupamiento indicó que todas las muestras poseen un coeficiente de similitud genotípica del 18%, dando lugar a la formación de dos grupos.

Couillerot (2009) logró distinguir molecularmente 26 cepas de *Azospirillum*: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* utilizando iniciadores BOX y ERIC. Entre sus resultados, los productos de amplificación BOX-PCR, visualizó once bandas en el gel de agarosa, de las cuales seis eran específicas para *Azospirillum brasilense* y ERIC-PCR generaron ocho bandas totales, de las cuales dos fueron específicas para *A. brasilense*. El autor recomienda para la identificación de *A. brasilense* utilizar iniciadores BOX por su mayor especificidad, al compararlo con los cebadores ERIC.

Por otra parte, D. Espinosa-Victoria y col. (2006) evaluaron la diversidad genética de 21 cepas de *Azospirillum brasilense* en suelos cultivados con maíz, en dos campos experimentales del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicados en Santa Isabel de Ajuno-Michoacán; Pabellón de Arteaga-Aguascalientes y el campo experimental de los Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA) en Villadiego, Guanajuato. Mediante la técnica RAPD, con el empleo de oligonucleótido NP2, detectando cuatro bandas: 100, 250, 300 y 400 kb en el grupo de cepas analizados. El patrón de bandas obtenido con cada iniciador se analizó a través de una matriz de datos para determinar matrices de distancia genética con el programa S-PLUS 2001, Versión 6.0. Se generó un dendrograma por el método UPGMA, observándose tres grupos con una distancia de similitud de 0,25. El valor promedio de diversidad genética de la población de 0,229.

Mamaril y col. (1998) detectaron diferencias en seis cepas aisladas de *Azospirillum* spp. mediante rep-PCR, para los productos de amplificación obtenidos por los iniciadores BOX-AIR y ERIC (ERIC1R, ERIC2) y REP (REP 1R, REP2), en geles de agarosa. Se observaron patrones únicos en las cepas, a partir de la información de los cebadores ERIC, lo cual permitió la identificación y clasificación de los aislamientos *Azospirillum* para las especies: *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Los autores recomiendan la utilización de estas secuencias en la identificación rápida de especies bacterianas, su detección y diferenciación de variantes moleculares en cepas de *Azospirillum*.

Por otra parte, la presente investigación fue el primer trabajo en Venezuela en biología molecular para caracterización del género de *Azospirillum*, debido a esto no existen trabajos previos a nivel nacional que puedan ser utilizados como antecedentes en esta investigación.

3 JUSTIFICACIÓN

Dada la necesidad de buscar alternativas sostenibles para la fertilización de cultivos, por la creciente demanda a nivel mundial, de tecnologías limpias y seguras para el ambiente, se ha planteado el desarrollo y promoción de los biofertilizantes. En Venezuela, con el objetivo de brindar un marco legal a esta actividad, en el año 2008 se creó Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI), adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras; fundamentado en la Ley de Salud Agrícola Integral (2008).

La misión del INSAI es ser el órgano regulador de la salud agrícola nacional, particularmente en la producción agrícola destinada a los rubros alimenticios. Cabe destacar que el artículo 69, de la mencionada Ley, establece que el INSAI emitirá certificados de libre venta de biofertilizantes, entre otros insumos agropecuarios.

El INSAI desde el 2010 desarrolla el Proyecto Nacional de Producción de Biofertilizantes, Biocontroladores y Bioestimuladores para una agricultura sustentable. El objetivo general de su eje de investigación es la identificación y certificación de organismos promisorios para la producción de bioinsumos a base de microorganismos nativos con potencial de biofertilizar eficiente y eficazmente gramíneas y otras especies de interés socio productivo, contribuyendo así a la soberanía alimentaria de nuestro país, conservación del suelo y ambiente.

En ocasiones los datos de caracterización bioquímica y evaluación morfológica no son suficientes para establecer diferencias entre individuos de una misma especie. En muchas investigaciones es posible recurrir a estudios del genoma, utilizando marcadores moleculares. Esta tecnología permite la identificación exacta en la caracterización de individuos de una misma especie. Ambas técnicas se complementan al caracterizar morfológica y molecularmente, a grupos de individuos de una misma especie.

En función de lo antes expuesto y en vista de la necesidad de ofrecer información exacta y confiable, sobre la variabilidad de las cepas de *Azospirillum* spp, se ha planteado realizar esta investigación. Además, la relevancia de la misma es de obtener el patrón molecular de estos microorganismos y es necesario que un ente

científico apoye al INSAI en la emisión de los certificados de *Azospirillum brasilense* promisorios para la producción de inóculos.

En este sentido, la presente investigación aportará parte del conocimiento científico, en la caracterización mediante secuencias ERIC y BOX AIR y la identificación molecular de sus productos de amplificación PCR de las cepas de *Azospirillum* spp aisladas de suelos sin uso de fertilizantes en varios estados del país. Esta información le permitirá al INSAI realizar la legitimación de uno de los elementos biológicos usados en la elaboración de biofertilizantes.

4 OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar molecularmente cepas de *Azospirillum* spp. de Venezuela, aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante cebadores ERIC Y BOX A1R.

Objetivos Específicos

- Identificar los patrones de bandas obtenidos mediante la amplificación PCR de los iniciadores ERIC-PCR y BOX A1R-PCR de las cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de suelos de uso agrícola sin fertilización de los estados: Apure, Guárico, Mérida, Táchira, Trujillo, Vargas y Yaracuy.
- Evaluar el polimorfismo de los patrones de bandas PCR mediante iniciadores ERIC y BOX A1R de los aislamientos de *Azospirillum* spp. de suelos de uso agrícola sin fertilización de los estados: Apure, Guárico, Mérida, Táchira, Trujillo, Vargas y Yaracuy.
- Estimar los índices de similaridad genética y análisis de agrupamiento entre los aislados de *Azospirillum* spp. de los diferentes suelos de uso agrícola sin fertilización de suelos de uso agrícola sin fertilización de los estados: Apure, Guárico, Mérida, Táchira, Trujillo, Vargas y Yaracuy.

5 MATERIALES Y METODOS

La caracterización molecular de las cepas nativas de *Azospirillum* spp. fue realizada en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Campus Maracay, estado Aragua.

5.1 Materiales

Se realizó la caracterización molecular de veinte (20) cepas de *Azospirillum* spp. aisladas en el Laboratorio Bolívar Conservacionista del INIA-CENIAP, Maracay, de suelos agroecológicos de uso agrícola sin fertilizantes de zonas productoras de caña de azúcar y maíz de los estados Apure, Guárico, Mérida, Táchira, Trujillo, Vargas y Yaracuy de Venezuela.

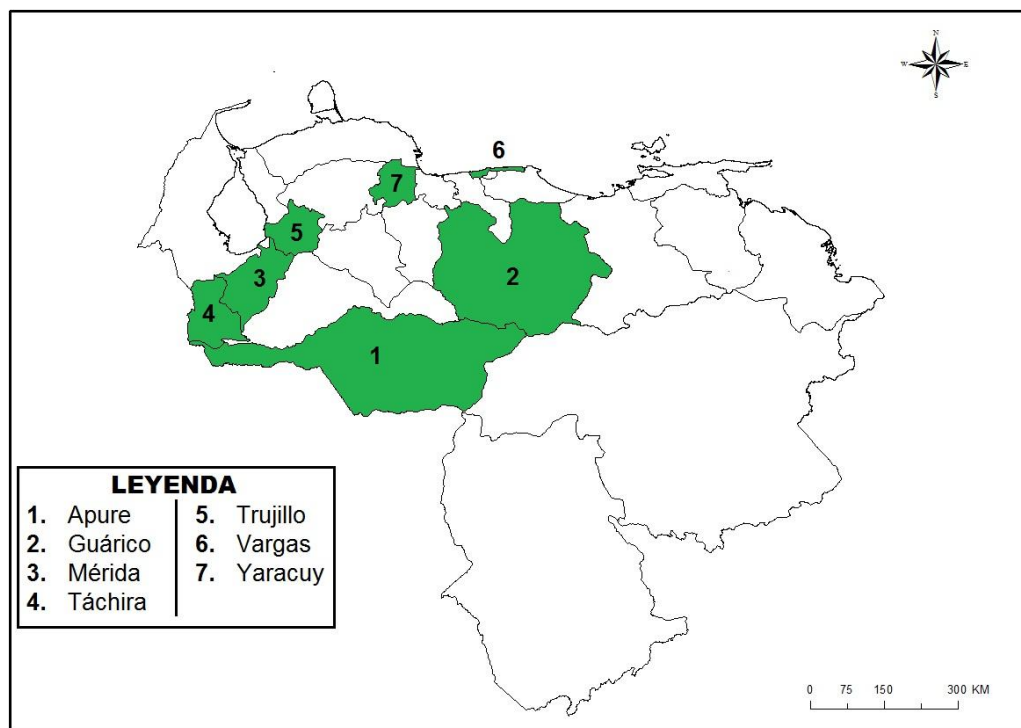


Figura 2. Estados de Venezuela donde se realizaron las colectas para la obtención de los aislamientos.

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas en el Laboratorio Bolívar Conservacionista a los aislados bacterianos para su identificación preliminar como *Azospirillum* spp.

N°	Cepa	Tinción de Gram	Catalasa	Citocromoxidasa	Hidrólisis de la gelatina	Hidrólisis de almidón	Reducción de NO ₃ -NO ₂	Ureasa	Motilidad
-	Control*	B-	+	+	-	-	+	+	+
1	AzMex	B-	+	+	-	-	-	-	+
2	Ap176	B-	+	-	+	-	+	-	+
3	Ap180	B-	-	+	-	-	-	+	+
4	Ap181	B-	+	+	-	-	-	+	+
5	Ap187	B-	+	+	-	-	-	+	+
6	Ap200	B-	+	-	-	-	-	+	+
7	Gu157	B-	+	-	-	-	+	+	+
8	Gu162	B-	+	+	+	-	-	+	+
9	Me419	B-	+	+	+	-	-	+	+
10	Me420	B-	-	-	-	-	+	-	+
11	Me421	B-	+	-	-	-	-	-	+
12	Me422	B-	+	+	-	-	+	-	+
13	Me466	B-	+	-	-	-	+	+	+
14	Ta227	B-	+	+	-	-	-	+	+
15	Ta314	B-	+	-	-	-	-	-	+
16	Ta316	B-	+	+	-	-	+	+	+
17	Ta394	B-	+	+	-	-	-	+	+
18	Tru369	B-	-	+	-	-	-	+	+
19	Tru374	B-	-	+	-	-	-	+	+
20	Tru820	B-	+	+	-	-	+	+	+
21	VT7	B-	+	+	-	-	-	+	+
22	VT18	B-	+	+	-	-	+	+	+
23	VT44	B-	+	-	-	-	-	+	+
24	Y92	B-	+	+	-	-	-	+	+
25	Y124	B-	+	+	+	-	-	-	+
26	Y128	B-	+	+	-	-	-	+	+
27	Y148	B-	+	-	+	-	-	+	+

*Valores de referencia para la identificación del género *Azospirillum* reportado en el

Manual Bergey`s de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984).

Se utilizaron de uno (1) a cinco (5) aislamientos obtenidos de cada uno de los siete estados donde se realizarán las colectas, para un total de 20 muestras.

El medio de cultivo microbiológico utilizado universalmente para obtener un crecimiento óptimo del género *Azospirillum* corresponde al NFB (medio libre de nitrógeno) semisólido, utilizando malato como fuente de carbono (Dobereiner y col., 1976). Las bacterias después de ser cultivadas en el medio NFB, fueron sembradas en agar selectivo ácido málico - rojo congo (AM-RC), en el cual las colonias presentan características fenotípicas que se usan como criterio para reconocer tentativamente a *Azospirillum* (Caballero, 2001).

5.2 Métodos

5.2.1 Extracción de ADN

Las cepas en medio de cultivos específicos para el género *Azospirillum* y la verificación bioquímica-morfológica en placas de Petri fueron proporcionadas por el Laboratorio Bolívar Conservacionista del INIA-CENIAP, Maracay, por parte del personal del INSAI. La extracción de ADN de las cepas se realizó siguiendo los pasos del procedimiento descrito por Ausubel y col. (1992), con algunas modificaciones realizadas en la Unidad de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, como se describe a continuación:

1. Las cepas bacterianas crecidas en la placa Petri se le adicionaron 500µL de agua destilada estéril (ADE) y se removieron con una lanceta estéril.
2. La suspensión fue colocada en un tubo de minicentrifuga de 1,5 mL.

3. Se centrifugó durante 3 minutos a 4°C por 12.000rpm, para luego eliminar el sobrenadante.
4. Cuidadosamente con una micropipeta se adicionó 400µL de la solución Tris Acetato 40mM (pH 7,8) y 1µL de ARNasa.
5. Seguidamente se agitó en el vortex.
6. Se adicionaron 134µL de NaCl 5M para luego ser agitado por 15 minutos y centrifugado durante 30 minutos a 4°C a 12.000rpm.
7. Se extrajo el sobrenadante (aproximadamente 470µL) con una micropipeta y fue transferido un tubo nuevo, para agregar 470µL de cloroformo-butanol (49:1). Se agitó suavemente, para luego ser centrifugado durante 10 minutos a 4°C y 12.000rpm.
8. La fase superior fue extraída y transferida a un tubo nuevo (aproximadamente 350µL).
9. De la cantidad de sobrenadante recuperado se agregó el doble de etanol absoluto, para luego ser almacenado a -20°Celsius durante 30 minutos.
10. Se centrifugó 30 minutos a 12.000rpm a 4°C.
11. Por último, se descartó el sobrenadante y se adicionó al precipitado de ADN 25µL de tampón TE 1X (50mM Tris-HCl; 0,7M NaCl y 10mM EDTA).

5.2.2 Cuantificación y Pureza del ADN

Mediante espectrofotometría se determinó la concentración y la pureza de una muestra de ADN, basado en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. La concentración de la muestra de ADN fue calculada mediante el valor de absorbancia obtenido a una longitud de

onda de 260nm. Mientras que la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} se utilizó para evaluar la pureza de las muestras.

La cantidad e integridad del ADN obtenido fue evaluada también mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa 1,0%. En la imagen del gel se evaluarán tres aspectos: Degradación del ADN, apariencia nítida luminosa de la banda y aparente visualización de ARN. La cantidad de ADN fue determinada mediante la comparación con un ADN de concentración conocida, en este caso el bacteriófago Lambda (λ) sin digerir a $100\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Se utilizaron $3\mu\text{L}$ de cada ADN aislado mezclado con $3\mu\text{L}$ tampón de carga para gel de agarosa. Se utilizaron $5\mu\text{L}$ de bromuro de etidio a $0.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el gel como agente intercalante entre las bases del ADN y realizó la visualización del ADN en un transiluminador UV.

La electroforesis fue realizada a 80V constantes y 25mA durante 30 min, con tampón TBE 0,5X (250mM de Tris-HCl, 30mM de ácido bórico y 42mM de EDTA). La concentración de ADN fue determinada a través del análisis visual de las imágenes obtenidas en un Gel-Doc BIO-RAD, utilizando el programa Quantity One versión 4.2.

5.2.3 Iniciadores Genéricos: ERIC y BOX A1R

La caracterización molecular de los aislados se realizó con los cebadores ERIC y BOX A1R correspondiente a secuencias repetidas bacterianas:

1. Secuencia en mosaico del elemento (BOX A1R, por sus siglas en inglés):
(5'CTACGGCAAGCGACGCTGACG 3'). (Sánchez, 2011)

2. Secuencias consenso intergénicas repetidas enterobacteriales (ERIC, por sus siglas en inglés): ERIC 1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'); ERIC 2 (5' AAGTAAGTGACTGGGGTGACGG 3'). (Sánchez, 2011)

Para realizar las reacciones de PCR se utilizaron los medios de reacción de la Tabla 4, se realizó una mezcla para los iniciadores ERIC y otra para el iniciador BOX A1R.

Tabla 4. Medio de reacción de PCR para iniciadores genérico ERIC y BOX A1R. (Sánchez, 2011)

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final
ADN	5ng.µL ⁻¹	1ng.µL ⁻¹
Tampón	5X	1X
MgCl ₂	25mM	2,5mM
dNTP's	2,5mM	0,15mM
Iniciador	5mM	0,05mM
Taq polimerasa (Promega)	5U.µL ⁻¹	0,04U.µL ⁻¹
H ₂ O (Milli-Q)		
Volumen final		25µL

5.2.3.1 Amplificación PCR

La PCR se realizó en un termociclador PTC 100 DNA Engine Cycler BIO-RAD, en las siguientes condiciones:

Tabla 5. Programas de amplificación por PCR para iniciadores genérico ERIC y BOX A1R. (Modificado de Sánchez, 2011)

Fases	Condiciones de amplificación
Desnaturalización inicial (1 ciclo)	95 °C por 5 min
35 ciclos:	
Desnaturalización	94 °C por 50s
Alineación (Hibridación)	55-60 °C por 50s
Extensión (Elongación)	72 °C por 10 min
Extensión final (1 ciclo)	72 °C por 7 min

La temperatura de alineación fue de 55°C para los cebadores ERIC y de 60°C para el cebador BOX-A1R.

Se utilizó una cepa previamente secuenciada de *Azospirillum brasilense* proveniente de México como control positivo, la cual fue entregada por el Laboratorio Bolívar Conservacionista. Para el control negativo se utilizó *Xanthomonas albilineans*, esto debido a que los ensayos de estandarización y el primer trabajo de investigación en el laboratorio del CIBA fue con *Xanthomonas*, además las condiciones de amplificación fueron estandarizadas en este microorganismo.

5.2.3.2 Visualización de los Productos amplificados PCR

Los productos de amplificación se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%: Agarosa D-1 LE GQT preparados con TBE 0,5X. La electroforesis fue realizada en una cámara horizontal BIORAD usando solución tampón TBE 0,5X y las condiciones: 80V durante 3 horas y media. Los perfiles electroforéticos observados para cada aislamiento fueron identificados por su tamaño en pares de base (pb), calculado con base a un marcador molecular de talla conocida: 50pb y 1 kb. El gel se le colocó bromuro de etidio, como fue mencionado en la etapa de visualización del ADN.

5.2.4 Análisis Estadístico

Para la evaluación de las amplificaciones de ADN en gel de agarosa de cada aislamiento y cebador genérico, se construyó una matriz binaria de datos, asignando el valor uno (1) para la presencia o cero (0) para la ausencia de bandas amplificadas. La matriz obtenida fue analizada con el programa estadístico Uvitec Essencial V 11.2, para obtener los índices de similitud genética, realizar el análisis de

conglomerados (Ward), basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard. (Sánchez, 2011)

Se obtuvieron los cálculos de algunos de los índices que reflejan diversidad genética:

(1) Porcentaje de polimorfismo; (2) Análisis de agrupamiento (dendrograma) usando el método de la distancia promedio no ponderada UPGMA (Vicente y col., 2004), y (3) Análisis de coordenadas principales (ACP) con base en el coeficiente de Dice para los iniciadores, empleando el programa Palaeontological Statistics (Hammer y col., 2001).

El análisis permitió visualizar las relaciones genéticas entre los aislados evaluados.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Toda la información genética de un organismo vivo se encuentra acumulada en la secuencia lineal de los cuatro nucleótidos que conforman la molécula de ADN (Rada y Taboada, 1998). La importancia del proceso de obtención y purificación del material genético es recobrar el máximo de ADN de alto peso molecular libre de proteínas, fenol e inhibidores de las enzimas de restricción y de la Taq polimerasa. El ADN de alta calidad es un requisito para su uso en técnicas de biología molecular como la PCR (para la identificación de las secuencias específicas de ADN mediante el uso de cebadores), no así el ADN degradado que no sustenta los sitios blancos para los cebadores (Rada y Taboada, 1998).

La cuantificación de ADN se verificó mediante la visualización de la intensidad de las bandas obtenidas luego de una corrida electroforética, y se basó en la tinción fluorescente del ADN con bromuro de etidio (Mendoza y col., 2010). El bromuro de etidio se intercala entre los pares de bases apareadas de la doble hebra de ADN y al ser excitado por luz ultravioleta (302nm) emite luz fluorescente. La cantidad de ADN fue establecida por la comparación del campo de fluorescencia de la muestra con un estándar de concentración conocida (Bacteriófago Fago Lambda) (Mendoza y col., 2010).

La cuantificación por este método también permitió analizar la integridad de ADN, ya que muestras degradadas forman barrido o no permiten la definición de una banda única de ácido nucleico (Mendoza y col., 2010).

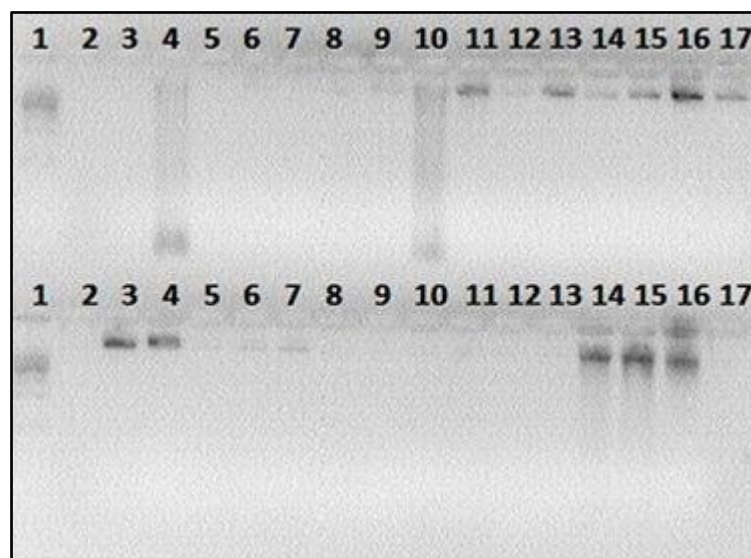


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% correspondiente a la extracción de ADN de 27 muestras de *Azospirillum* spp. Peine 1:1 Patrón de Peso Molecular Lambda; 2 control negativo; 3 *Azospirillum brasilense* México; 4-17 ADN de *Azospirillum* spp (4-8 Apure, 9 y 10 Guárico, 11-15 Mérida, 16 y 17 Táchira). Peine 2: 1 Patrón de Peso Molecular Lambda; 2 y 17 control negativo; 3- 14 ADN de *Azospirillum* spp (3 y 4 Táchira, 5-7 Trujillo, 8-10 Vargas, 11-14 Yaracuy); 15 y 16 *Xanthomonas albilineans*.

Tabla 6. Cuantificación del ADN de *Azospirillum* spp. mediante NanoDrop.

N°	Cepa	[ng.µL ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	N°	Cepa	[ng.µL ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	AzMex	15,56	1,75	1,62	16	Ta316	680,24	1,86	1,92
2	Ap176	7,24	1,09	1,64	17	Ta394	696,19	1,86	1,79
3	Ap180	0,24	0,18	0,03	18	Tru369	36,90	1,73	1,77
4	Ap181	42,74	1,71	0,36	19	Tru374	42,98	1,84	2,00
5	Ap187	0,30	0,08	1,60	20	Tru820	84,19	1,79	2,10
6	Ap200	0,10	0,22	1,78	21	VT7	0,07	0,08	0,07
7	Gu157	82,06	1,75	1,74	22	VT18	0,03	0,51	0,33
8	Gu162	104,61	1,01	0,80	23	VT44	16,38	1,80	1,99
9	Me419	258,17	1,89	1,67	24	Y92	17,51	1,83	1,68
10	Me420	91,45	1,79	1,61	25	Y124	0,12	0,77	0,02
11	Me421	139,77	1,83	1,90	26	Y128	16,45	1,61	2,10
12	Me422	92,98	2,01	2,00	27	Y148	733,65	1,64	2,53
13	Me466	112,84	1,86	2,10	28	Xh7	1228,22	1,59	2,58
14	Ta227	398,93	1,82	1,91	29	Xh8	855,79	1,73	1,48
15	Ta314	104,19	1,87	2,10					

En la Tabla 6, se reportan los valores de concentración y pureza A_{260}/A_{280} de las muestras que presentaron ADN una vez evaluada la extracción, siendo estas las muestras seleccionadas para realizar el estudio. La cantidad del ADN extraído estuvo entre 0,03 y 1.228,22 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$.

La pureza del ADN obtenido fue realizada en base a lecturas de absorbancia a 260 y 280nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 de las muestras de ADN obtenidas.

A 230nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. En general, se considera que el ADN es puro cuando el valor A_{260}/A_{230} se sitúa en torno 1.5-2.2. Un valor menor de 1.5 indica presencia de contaminantes en la muestra (Desjardins y col. 2010). Las muestras seleccionadas presentaron valores de A_{260}/A_{230} mayores o cercanos a 1.5, lo cual asegura que el ADN empleado para la PCR se encontró libre de agentes contaminantes.

Se utilizó el método de NanoDrop porque sólo requiere 1 μL (microvolumen) para la cuantificación de ácidos nucleicos y fue una alternativa práctica y eficaz a la metodología de cuantificación del ADN extraído. También, permitió determinar la pureza del ADN obtenido (Desjardins y col. 2010).

Para realizar esta investigación fueron seleccionados aquellos ADN que, según los resultados obtenidos, presentaron niveles óptimos de pureza y mayor concentración. En la reacción de PCR fueron utilizados 20 aislados de los 29 suministrados por el Laboratorio Bolívar Conservacionista (ver Tabla 7).

Tabla 7. Muestras *Azospirillum* spp. seleccionadas para la amplificación por PCR.

N°	Muestra	N°	Muestra	N°	Muestra	N°	Muestra
AzMex	Control +	7	Me421	13	Ta394	19	Y92
2	Ap181	8	Me422	14	Tru369	20	Y148
3	Gu157	9	Me466	15	Tru374	Xh7	Control -
4	Gu162	10	Ta227	16	Tru820	Xh8	Control -
5	Me419	11	Ta314	17	VT7		
6	Me420	12	Ta316	18	VT44		

El procedimiento descrito por Ausubel y col. (1992), con algunas modificaciones realizadas en la Unidad de Biotecnología Vegetal INIA-CENIAP, resultó apropiado para la extracción del ADN de las colonias que arrojaron resultados positivos para las pruebas bioquímicas (ver Tabla 3) y la cepa control positivo.

El microorganismo seleccionado control negativo fue *Xanthomonas albilineans*, agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum sp.*) aisladas en caña de azúcar, sector Santa Clara del estado Aragua, previamente obtenido y caracterizado en el Laboratorio de Genética Molecular, del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

Se verificó las concentraciones del ADN para la mezcla de reacción PCR, realizando una corrida electroforética en gel de agarosa al 1%. Mediante la observación de la nitidez de la banda del ADN, la mayoría de los ADN tenían la concentración ideal para la PCR ($5\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). En el caso de las muestras que no presentaron dicha concentración, se procedió a ajustar el valor hasta obtener la concentración requerida.

Las extracciones evaluadas en el gel de agarosa presentaron integridad, lo cual indica un buen rendimiento para el aislamiento de ADN de las bacterias del género *Azospirillum*.

La amplificación por PCR de los aislamientos de ADN correspondientes a las muestras de *Azospirillum* fue utilizada para estudios de diversidad, y de esta manera determinar la posible relación entre las distintas muestras, se evaluaron los iniciadores específicos ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R en tres combinaciones: Una amplificación utilizando solo cebadores ERIC (ERIC 1R y ERIC 2), otra con el cebador BOX- A1R, y por último una mezcla cebadores ERIC (ERIC 1R y ERIC2) y BOX-A1R.

Los patrones electroforéticos generados por la amplificación de los iniciadores para todos los aislamientos evaluados se observan en las Figuras 4, 5 y 6.

Las comparaciones en los patrones de amplificación para estos iniciadores revelan la presencia de variantes genóticas entre los aislamientos evaluados.

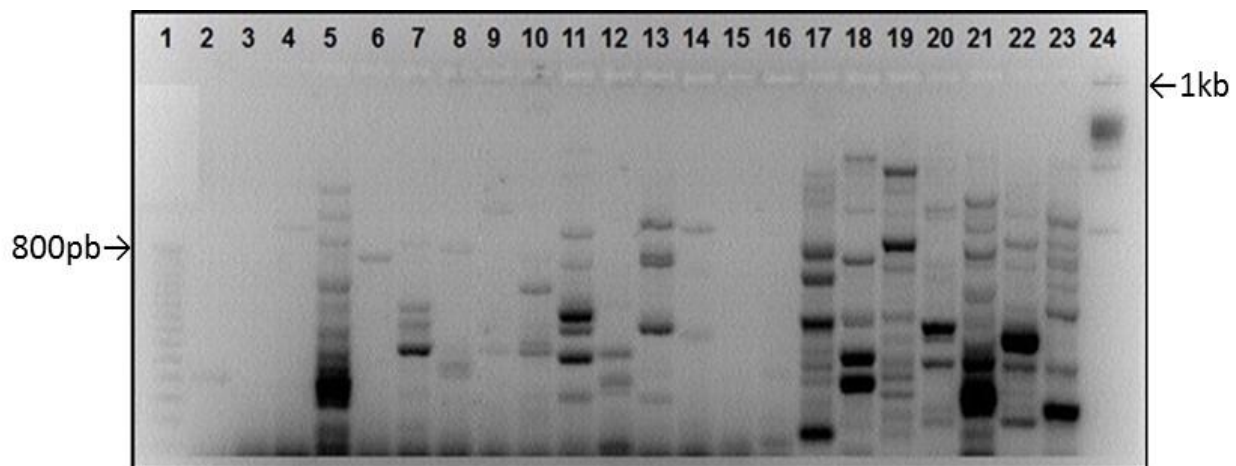


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de *Azospirillum* spp. mediante cebadores ERIC 1R y ERIC

2. 1 Marcador de Peso Molecular 50pb; 2 *Azospirillum brasilense* México (control positivo); 3-21 ADN de *Azospirillum* spp. (3 Apure, 4 y 5 Guárico, 6-10 Mérida, 11-14 Táchira, 15-17 Trujillo, 18 y 19 Vargas, 20 y 21 Yaracuy); 22 y 23 *Xanthomonas albilineans* (control negativo); 24 Marcador de Peso Molecular 1kb.

El patrón electroforético formado por la amplificación de las secuencias ERIC (ERIC 1R y ERIC 2) en el ADN genómico de *Azospirillum*, resultó en un máximo de 28 bandas con variaciones en el tamaño de aproximadamente 110 a 6.900pb. La muestra del carril 3, correspondiente al estado Apure (Ap181), no mostro amplificación mediante PCR y no fue incluido en los análisis estadísticos.

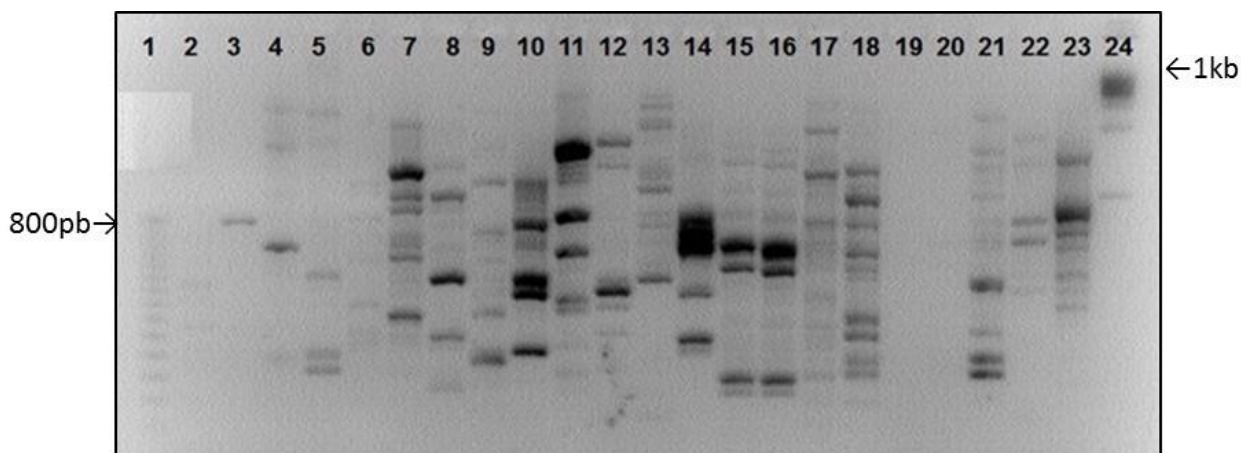


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de *Azospirillum* spp. mediante cebador BOX- A1R. 1 Marcador de Peso Molecular 50pb; 2 *Azospirillum brasilense* México (control positivo); 3-21 ADN de *Azospirillum* spp (3 Apure, 4 y 5 Guárico, 6-10 Mérida, 11-14 Táchira, 15-17 Trujillo, 18 y 19 Vargas, 20 y 21 Yaracuy); 22 y 23 *Xanthomonas albilineans* (control negativo); 24 Marcador de Peso Molecular 1kb.

El patrón electroforético formado por la amplificación de la secuencia BOX-A1R en el ADN genómico de *Azospirillum*, resultó en un máximo de 25 bandas con variaciones en el tamaño de aproximadamente 150 a 8.790pb.

La muestra de los carriles 19 y 20, correspondientes a los estados Vargas (VT44) y Yaracuy (Y92), no mostraron productos de amplificación mediante PCR y no fueron incluidos en los análisis estadísticos.

Para estudiar mejor la diversidad genética de esta bacteria se genotipificaron los aislamientos a través de la amplificación de secuencias repetidas en mosaico del elemento BOX y ERIC en PCR de manera simultánea.

Con la mezcla de los iniciadores ERIC y BOX fue posible la amplificación de un mayor número de fragmentos en las muestras evaluadas.

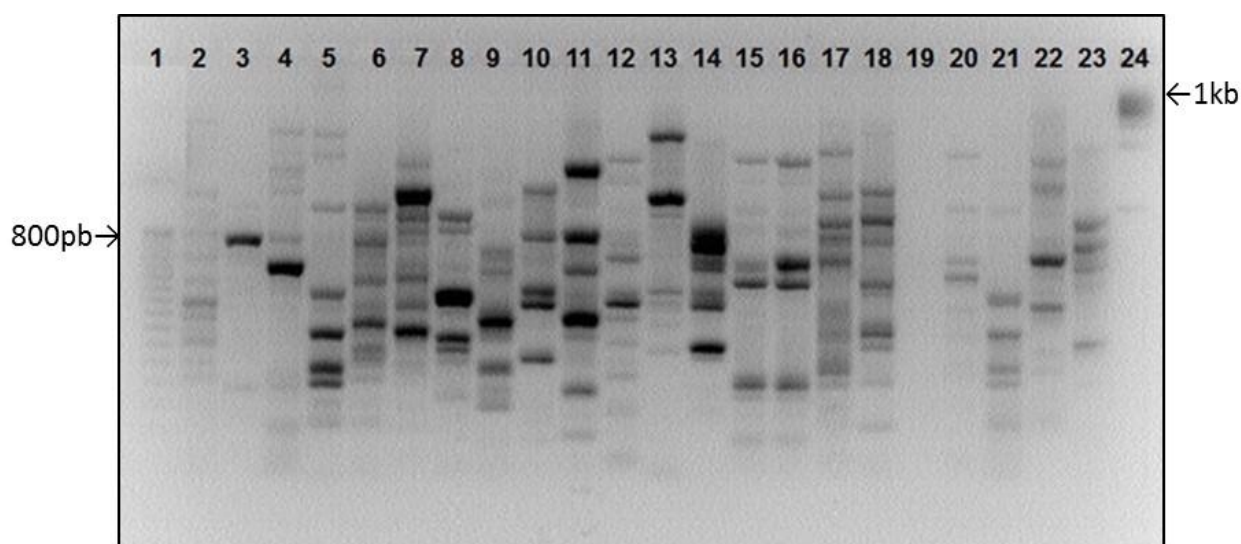


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2% correspondiente a la amplificación por PCR de 20 muestras de *Azospirillum* spp. mediante cebadores ERIC 1R, ERIC 2 y BOX- A1R. 1 Marcador de Peso Molecular 50pb; 2 *Azospirillum brasilense* México (control positivo); 3-21 ADN de *Azospirillum* spp. (3 Apure, 4 y 5 Guárico, 6-10 Mérida, 11-14 Táchira, 15-17 Trujillo, 18 y 19 Vargas, 20 y 21 Yaracuy); 22 y 23 *Xanthomonas albilineans* (control negativo); 24 Marcador de Peso Molecular 1kb.

El patrón electroforético formado por la amplificación de las secuencias ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R en el ADN genómico de *Azospirillum*, resultó en un máximo de 29 bandas con variaciones en el tamaño de aproximadamente 110 a 8.800pb.

La muestra del carril 19, correspondientes al estado Vargas (VT44), no mostró productos de amplificación mediante PCR y no fue incluido en los análisis estadísticos.

Tabla 8. Cebadores utilizados en el estudio y número de bandas polimórficas.

Cebador	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo %
ERIC 1R y ERIC2	28	24	85,71
BOXA1R	25	23	92,00
ERIC 1R, ERIC 2, BOXA1R	29	22	75,86
Total	82	69	

El análisis de los resultados permitió encontrar que en las tres reacciones de PCR, todas presentaron polimorfismo (ver Tabla 8). Se determinó el porcentaje de polimorfismo para los resultados en los geles de agarosa de cada marcador molecular y PCR múltiples. Se generó un total de 82 bandas, de las cuales 69 fueron polimórficas, con un promedio de 27,33 bandas por iniciador y/o combinación.

Se realizó el agrupamiento de los resultados de las amplificaciones por PCR en cada uno de los casos antes mencionados, generando una matriz binaria de ausencia y presencia a partir de las bandas obtenidas mediante el programa Uvitec Essencial V 11.2, y con los datos resultantes se realizó un análisis de conglomerados con el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmeic Average) que se representaron en un dendrograma. Se incluyó el control positivo, *Azospirillum brasilense* México y los controles negativos *X. albilineans* en los análisis.

Los dendrogramas generados con estos datos se ilustran en las Figuras 7, 8 y 9. La numeración de las muestras para los dendrogramas y el Análisis de Coordenadas Principales (ACP) fue el mismo orden presentado en la Tabla 7.

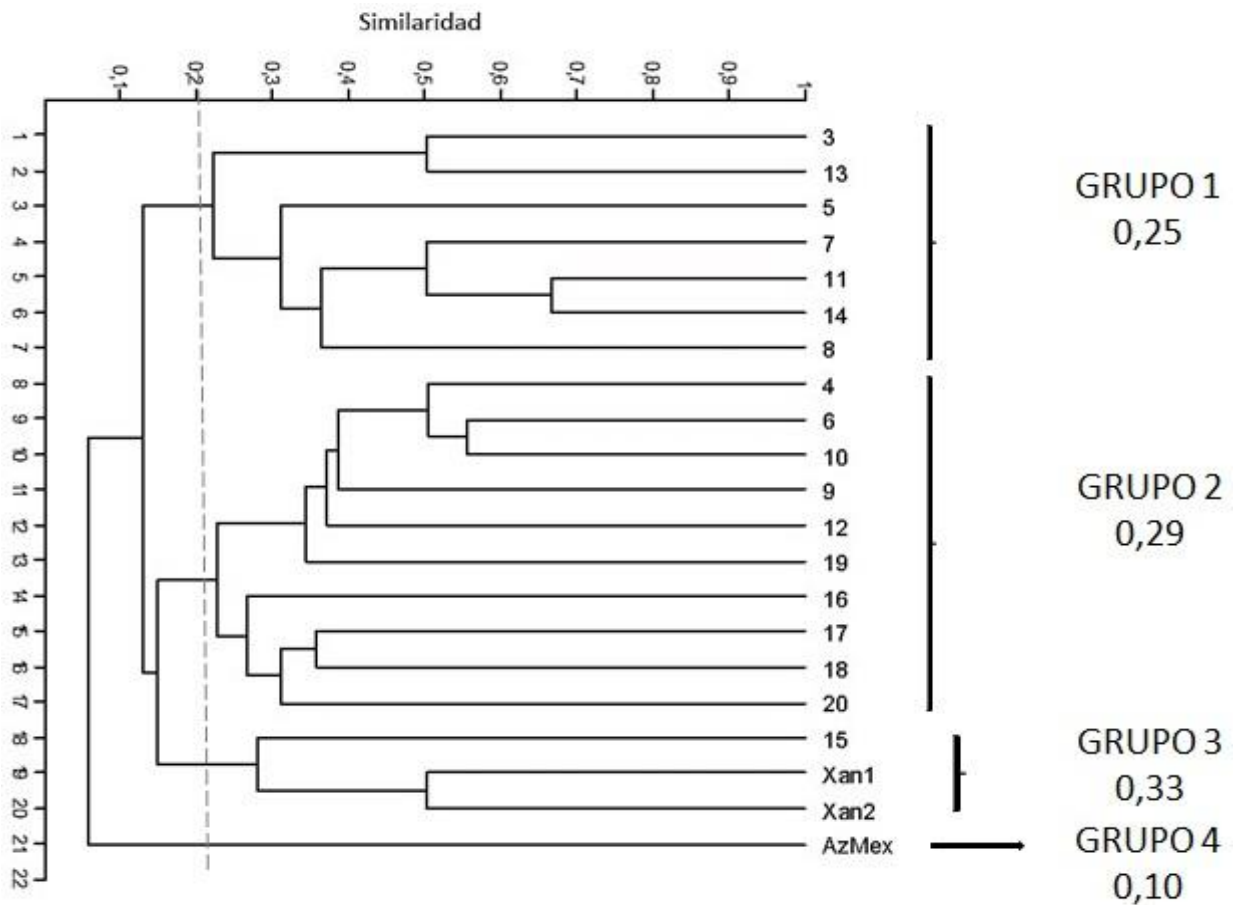


Figura 7. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para los cebadores ERIC. Los números 1, 2, 3 y 4 representan cada una de las ramas principales del árbol determinados por la línea de corte a 0,20.

La comparación de patrones de amplificación por PCR con cebadores ERIC reveló la presencia de cuatro grupos, presentando un índice de similaridad del 20%.

Se pudo observar una gran variabilidad genética entre los aislamientos cuando se relacionan en función de los iniciadores no específicos. Los elementos ERIC son secuencias de DNA extragénicas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las enterobacterias (Vílchez y Alonso, 2009).

En el caso de *Azospirillum*, este género pertenece a la clase Alphaproteobacteria. Sin embargo, según Mamaril y col. (1998) a partir de la información de los cebadores ERIC (ERIC 1R y ERIC 2), es posible la identificación y clasificación de los aislamientos *Azospirillum* para la especie *A. brasilense*. Estos autores recomiendan la utilización de estas secuencias en la identificación rápida de especies bacterianas, su detección y diferenciación en cepas de *Azospirillum*.

El perfil obtenido mediante la PCR de los cebadores ERIC conforman un primer grupo con los aislamientos: Gu157, Me419, Me421, Me422, Ta314, Ta394 y Tru369, un segundo grupo por los aislamientos: Gu162, Me420, Me466, Ta227, Ta316, Tru820, VT7, VT44, Y92 y Y148, un tercer grupo por los aislamientos: Tru374, *Xanthomona* 7 y 8. Por último, el cuarto grupo por el aislado: *A. brasilense* México.

Es importante mencionar que de los cuatro (4) agrupamientos formados en el dendrograma, solo el grupo 1 está conformado, excepto por la muestra de Guárico, por muestras con similitud geográfica, específicamente de la Región de los Andes. Además, según los resultados obtenidos, la muestra de Trujillo (Tru374) se ubicó en un mismo grupo con los controles negativos *X. albilineans*. Cabe destacar que esta fue una de las pocas muestras que presentaron más de una diferencia en las pruebas bioquímicas respecto a los valores de referencia para la identificación del género *Azospirillum* reportado en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984) [ver Tabla 3].

Mediante el uso de cebadores ERIC, el control positivo no conformó ningún grupo con las cepas de Venezuela, obteniendo incluso menor valor de similaridad.

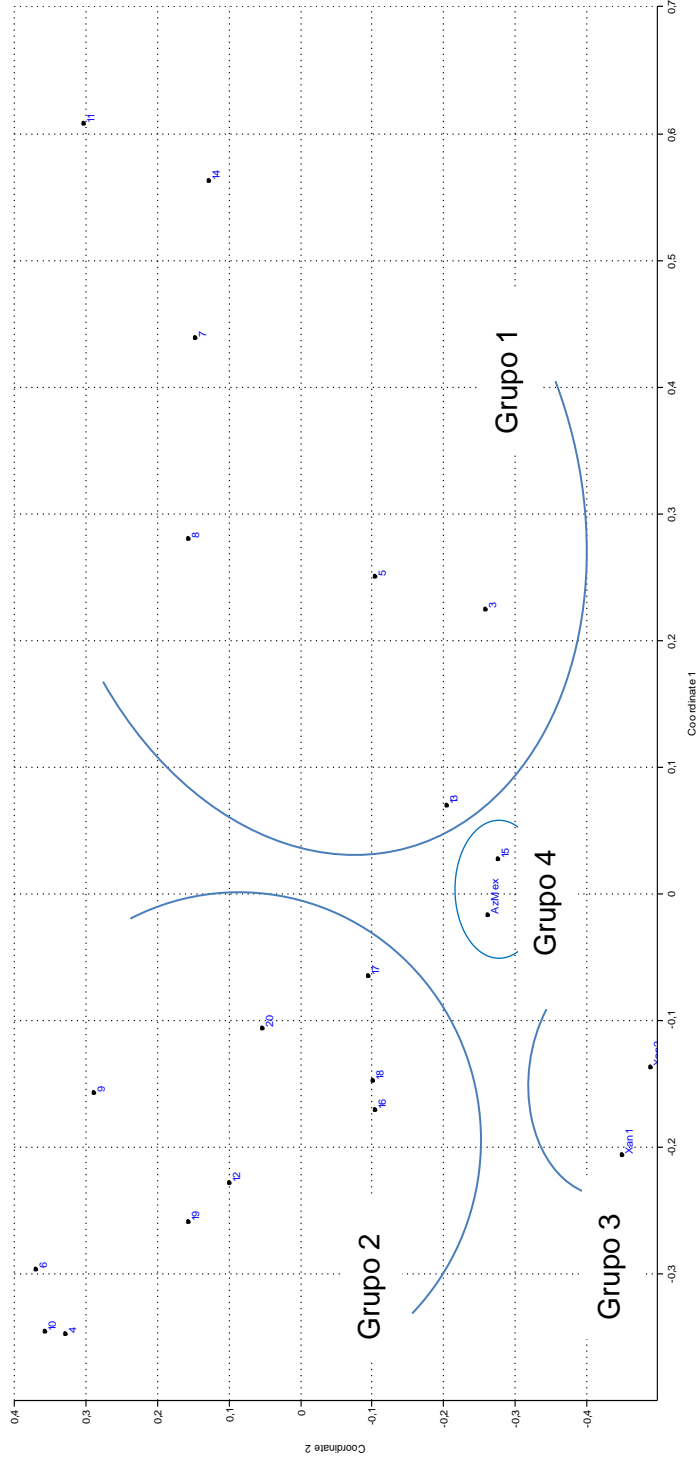


Figura 8. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de *Azospirillum* a partir del Análisis de Coordenadas Principales para los cebadores ERIC.

El análisis permitió determinar la conformación de 4 agrupamientos de las muestras analizadas, representados en el dendograma (Figura 7). Cabe destacar que la muestra 15 (Tru374) en esta representación pareciera presentar mayor similitud genética con el control positivo que con los aislados de *Xanthomona*, a diferencia de lo obtenido en el dendograma, ubicándose junto este en el Grupo 4.

La comparación de patrones de amplificación por PCR con el cebador BOX-A1R reveló la presencia de cuatro grupos, presentando un índice de similitud del 20%.

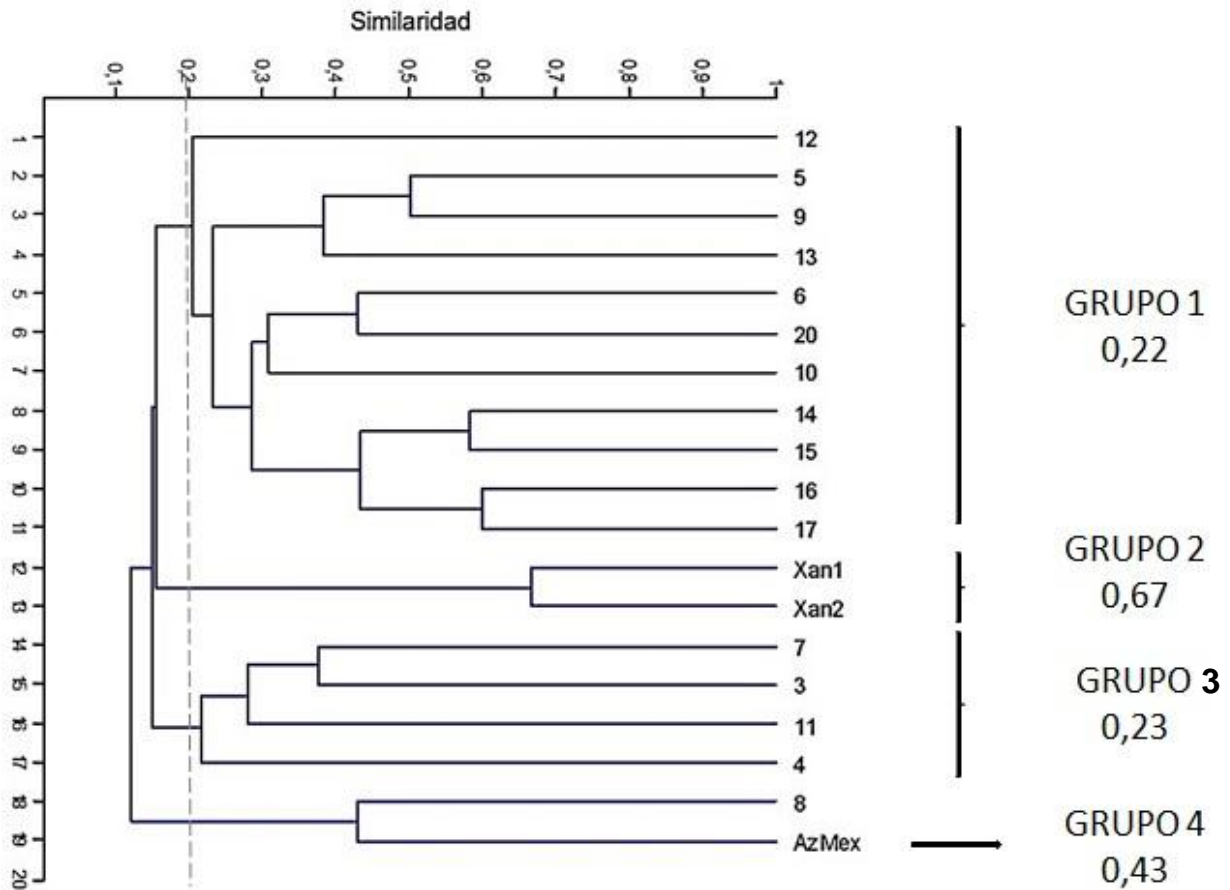


Figura 9. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para el cebador BOX-A1R. Los números 1, 2, 3 y 4 representan cada una de las ramas principales del árbol determinados por la línea de corte a 0,20.

El perfil obtenido mediante la PCR con el cebador BOX-A1R conforman un primer grupo con los aislamientos: Me419, Me420, Me466, Ta227, Ta316, Ta394, Tru369, Tru374, Tru820, VT7 y Y148, un segundo grupo por los aislamientos: *Xanthomona* 7 y 8, un tercer grupo por los aislamientos: Gu157, Gu162, Me421 y Ta314. Por último, el cuarto grupo por los aislados: Me422 y *A. brasilense* México.

Couillerot (2009) logró distinguir molecularmente 26 cepas de *Azospirillum* mediante el uso de cebadores BOX y ERIC. El autor recomienda para la identificación de *A. brasilense* utilizar iniciadores BOX por su mayor especificidad, al compararlo con los cebadores ERIC.

De los cuatro (4) grupos formados en el dendrograma, el grupo 2 está conformado solamente con los controles negativos *X. albilineans*. En el grupo 3, las muestras agrupadas presentaron mayor diferencia en las pruebas bioquímicas respecto a los valores de referencia para la identificación del género *Azospirillum* reportado en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984) [ver Tabla 3]. Además, según los resultados obtenidos, la muestra de Mérida (Me422) se ubicó en un mismo grupo con *Azospirillum brasilense* México; cabe destacar que esta muestra presentó resultado negativo para la prueba de la Ureasa, y según Staley y col., (1984) esta prueba es universalmente positivo para el género *Azospirillum*.

Según MacFaddin (2003), cada género microbiano posee pruebas bioquímicas específicas para diferenciar especies de otros microorganismos. Dichas pruebas no fueron realizadas en esta investigación, debido a que la identificación preliminar de las cepas proporcionadas por el Laboratorio Bolívar Conservacionista las ubicaba dentro del género *Azospirillum*.

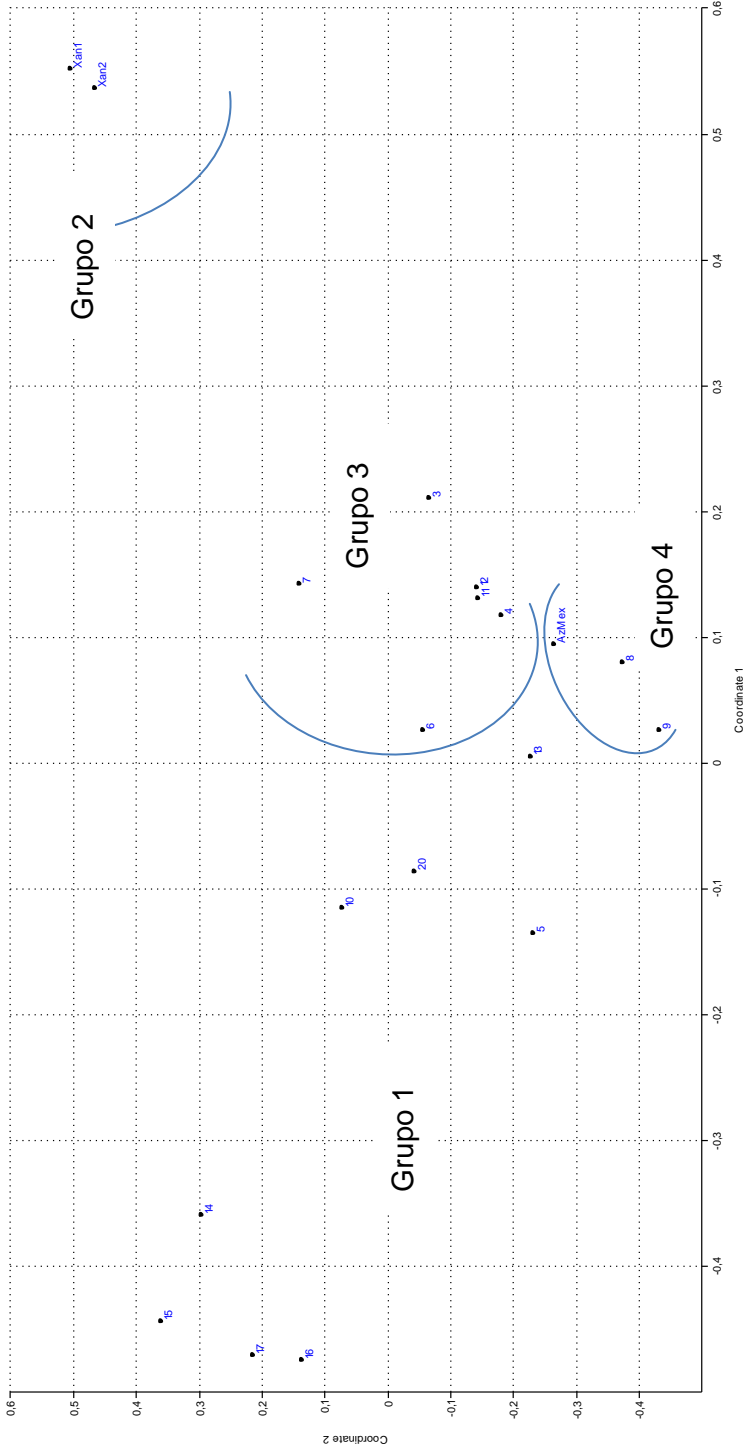


Figura 10. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de *Azospirillum a* partir del Análisis de Coordenadas Principales para el cebador BOX-A1R.

El análisis permitió determinar la conformación de 4 agrupamientos de las muestras analizadas, representados en el dendograma (Figura 9). Cabe destacar que la muestra 12 (Ta316) en esta representación pareciera presentar mayor similitud genética con las muestras del grupo 3, a diferencia de lo obtenido en el dendograma, ubicándose en este grupo.

Por último, la comparación de patrones de amplificación por PCR con los cebadores ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R reveló la presencia de cinco grupos, presentando un índice de similaridad del 20%.

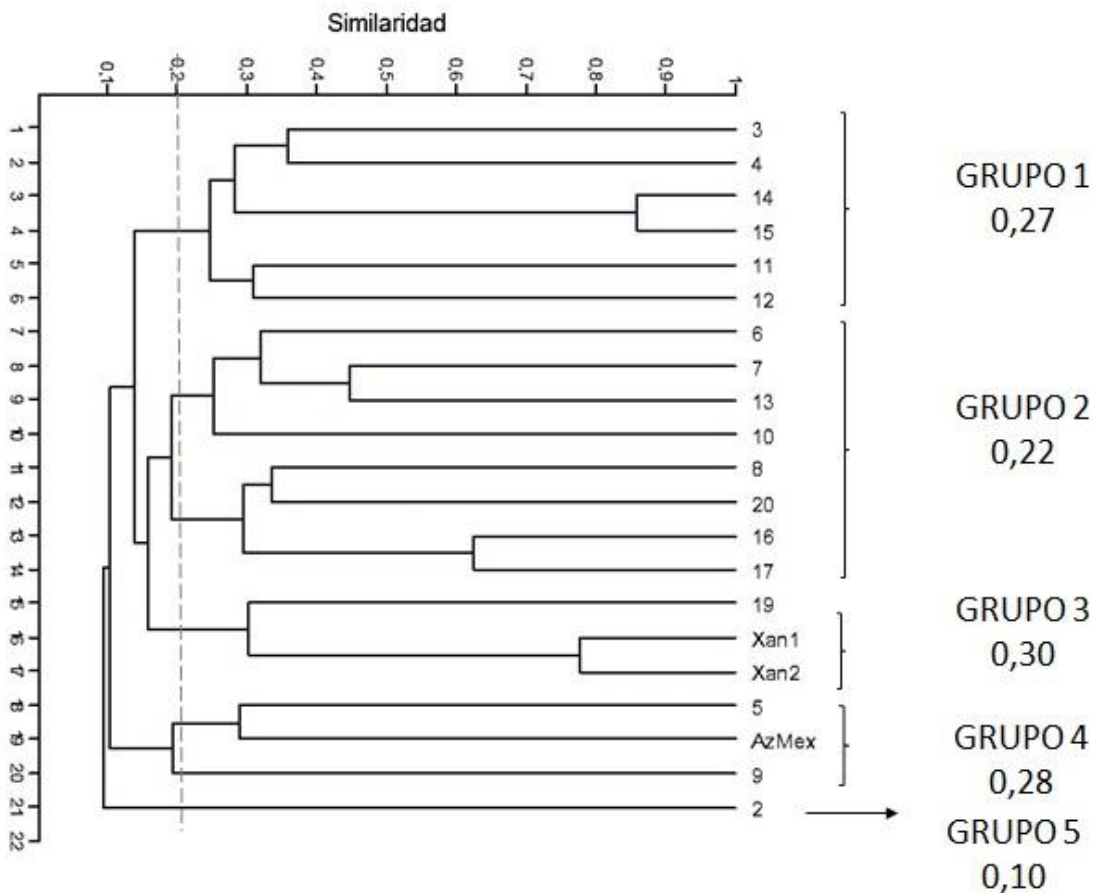


Figura 11. Dendrograma obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA utilizando el coeficiente DICE para los cebadores ERIC y BOX. Los números 1, 2, 3, 4 y 5 representan cada una de las ramas principales del árbol determinados por la línea de corte a 0,10.

El perfil obtenido mediante la PCR de los cebadores ERIC y BOX conforman un primer grupo con los aislamientos: Gu157, Gu162, Ta314, Ta316, Tru369 y Tru374, un segundo grupo por los aislamientos: Me420, Me421, Me422, Ta227, Ta394, Tru820, VT7 y Y148, un tercer grupo por los aislamientos: Y92, *Xanthomona* 7 y 8,

un cuarto grupo por los aislamientos: Me419, Me466 y *Azospirillum brasilense* México, y por último el quinto grupo por el aislado: Ap181.

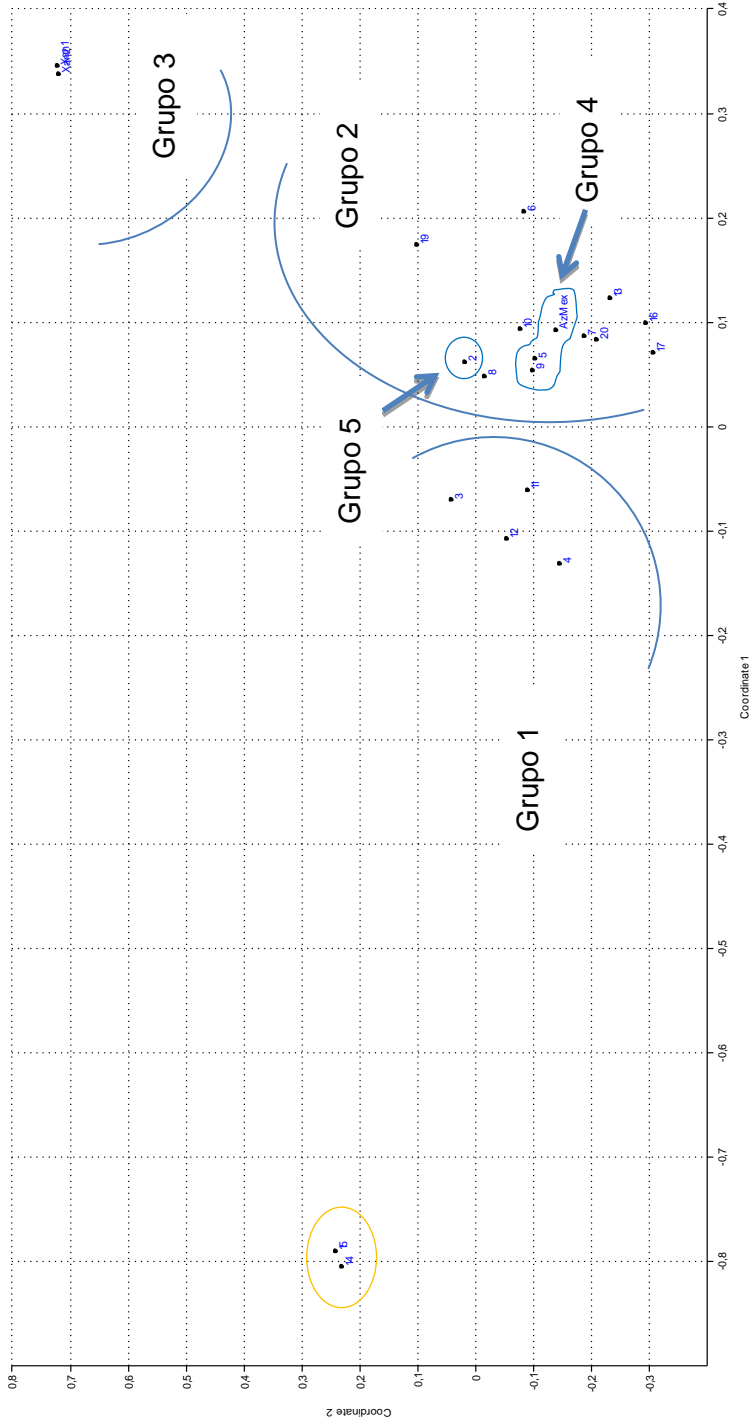


Figura 12. Representación gráfica de la distribución de los genotipos amplificados de *Azospirillum* a partir del Análisis de Coordenadas Principales para los cebadores ERIC y BOX.

El análisis permitió determinar la conformación de 5 agrupamientos de las muestras analizadas, representados en el dendograma (Figura 11).

Cabe destacar que las muestras 14 y 15 (Tru369 y Tru374) en esta representación parecieran conformar un grupo aparte del resto de las cepas (identificadas en la Figura 12 con el color amarillo), y la muestra 19 (Y92) presenta mayor similitud genética con las muestras del grupo 2, a diferencia de lo obtenido en el dendograma, ubicándose en este grupo. Esto pareciera ocurrir también en el caso de la muestra 2 (Ap181).

La amplificación por PCR de las muestras evaluadas definió grupos más diversos al emplear la mezcla de cebadores ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R. El polimorfismo generado posiblemente depende de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias dentro del genoma (Vílchez y Alonso, 2009). En el caso de la PCR con la mezcla de cebadores, fue dónde amplificó un mayor número de bandas (ver Figura 6).

Esta técnica resultó sencilla, no depende del uso de enzimas de restricción, ni de técnicas electroforéticas especiales, fue rápida, de relativo bajo costo y fácil de analizar; todo lo cual la coloca en una posición privilegiada a la hora de seleccionar una técnica de tipificación genética (Vílchez y Alonso, 2009)

MacFaddin (2003) reporta que los géneros con procedencia edáfica poseen metabolismos similares, ya que provienen de un mismo hábitat y similares condiciones ambientales. Las cepas identificadas mediante pruebas bioquímicas y molecularmente son de procedencia edáfica siendo posiblemente la razón por la cual, aunque presenten variaciones respecto al control positivo para el género *A.*

brasiliense, poseen dicho grado de similitud con este e incluso con los controles negativos.

Motsara y col. (1995) asegura que en cultivos como arroz, maíz, trigo y caña de azúcar, *Azospirillum* puede incrementar el rendimiento entre el 15 y el 30%, y ha permitido ahorrar entre 50 y 100% del fertilizante nitrogenado (Carrera, 2012).

La obtención del rendimiento de los cultivos es considerada comercialmente muy valiosa para la agricultura moderna, siempre y cuando estos resultados sean consistentes. Según Carrera (2012) la información disponible de aplicación en campo de *Azospirillum* aún es considerada como insuficiente como para comercializarlo como biofertilizante a gran escala. Sin embargo, por ahora solo existen preparados comerciales de *Azospirillum* disponibles en el mercado y se han reportado muy pocos resultados negativos o nulos por efecto de la inoculación.

El coeficiente de Dice es el único que posee significado biológico, ya que expresa la probabilidad de que una banda en un individuo esté también en otro, cuantificada como la relación de número de bandas coincidentes (entre dos individuos) a número total de bandas (número medio de bandas en un individuo). Cuanto menor sea la distancia genética entre accesiones más alta será esa probabilidad (González, 2001). En cuanto al coeficiente de similitud de Jaccard, no presenta ventaja sobre otros coeficientes, sin embargo es uno de los coeficientes más empleados (González, 2001). Por esta razón su cálculo permite poder contrastar resultados con trabajos precedentes realizados por otros autores.

El análisis de cluster realizado para las muestras de *Azospirillum*, utilizando los cebadores ERIC y BOX, sugiere que ninguna de las muestras evaluadas en este trabajo presentó igualdad de patrones entre ellas ni con los controles (todas mostraron polimorfismo), por el análisis de los geles de amplificación es posible evidenciar que hay diferencias en los genotipos evaluados (Figuras 4, 5 y 6). Además, las pruebas bioquímicas realizadas sólo permitieron la identificación hasta el género *Azospirillum*, y las pruebas moleculares se emplearon utilizando como patrón de referencia la especie *A. brasilense*; al obtener las diferencias antes mencionadas, puede sugerirse que las bacterias evaluadas pertenecen al género *Azospirillum*, pero no es posible determinar, con las pruebas realizadas, si corresponden a la especie de interés (*Azospirillum brasilense*), para la emisión de los certificados por el INSAI, promisorios para la producción de bioinsumos, a base de microorganismos nativos con potencial de biofertilizar.

Los resultados del presente estudio mostraron que los polimorfismos encontrados posiblemente puedan tener relación con el tipo de suelo y las condiciones edafoclimáticas de las cepas en estudio, por lo menos en los siete estados evaluados, donde las condiciones de clima, relieve y vegetación varían considerablemente entre ellos. De igual modo, no fue posible determinar si las diferencias genotípicas tenían alguna relación con la localidad donde se tomaron las muestras o el tipo de cultivo (maíz o caña de azúcar) que estas colonizaban, puesto que dicha información no fue suministrada por el INSAI para este trabajo de grado.

Finalmente, es importante notar que los estudios sobre diversidad genética son una valiosa herramienta para conocer la estructura de las comunidades microbianas, para hacer un uso más eficiente del recurso suelo y para evaluar el impacto de la actividad humana sobre las poblaciones microbianas, ya que la agricultura moderna con el uso intensivo de agroquímicos es una potencial modificadora de la diversidad microbiana del suelo.

7 CONCLUSIONES

- La caracterizar molecularmente las cepas de *Azospirillum* de Venezuela mediante cebadores ERIC y BOX no permitió identificar una cepa con igual patrón de bandas de amplificación por PCR al control *Azospirillum brasilense* de México, información que requiere el INSAI como elemento para la formulación de biofertilizantes.
- La amplificación por PCR de elementos repetitivos (rep-PCR) en este estudio permitió la genotipificación de las bacterias del género de *Azospirillum* spp., mediante cebadores ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R, generando bandas polimórficas y detectando alta variabilidad genética entre las cepas. Además fue más preciso al utilizar la PCR multiplex con la combinación ERIC y BOX.
- El polimorfismo evaluado de los patrones de bandas amplificadas por PCR fue altamente polimórfico, comprobando la efectividad de los marcadores utilizados en la caracterización molecular.
- Se logró obtener los índices de similaridad genética y realizar los agrupamientos, a partir de los índices de similaridad de Jaccard entre los aislados de *Azospirillum* spp.
- Aunque las relaciones entre las cepas evaluadas en el estudio dependen del agrupamiento formado en el análisis, estos no fueron concluyentes. Mediante el análisis de agrupamiento UPGMA se conformaron cuatro agrupamientos para los cebadores ERIC (ERIC 1R y ERIC 2) e igualmente en el caso de la secuencia BOX-A1R. En la amplificación de las secuencias ERIC 1R, ERIC 2 y BOX-A1R, se conformaron 5 grupos. En el Análisis de Coordenadas

Principales estos agrupamientos mostraron diferencias en algunas muestras a pesar de ser otra expresión gráfica de una misma matriz de datos.

- No fue posible determinar si las diferencias genotípicas que presentaban las cepas tenían alguna relación con la localidad donde se tomaron las muestras o el tipo de cultivo (maíz o caña de azúcar) que éstas colonizaban.
- Se sugiere al el Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) de Venezuela, secuenciar al menos un aislado de cada estado y comparar su secuencia con la base de datos Genbank, con la finalidad de contrastar esa información con las cepas de Venezuela para *Azospirillum* spp., verificar si es de la especie de interés para el (INSAI), y ser utilizado en su proyecto de producción de biofertilizantes.
- Es necesario obtener la información del lugar de las cepas, ubicación geográfica por sistema de posicionamiento global (GPS) y del cultivo de la zona (maíz y/o caña de azúcar) donde fueron colectadas las muestras, para integrar los resultados moleculares con la información de los aislados.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Altier, N., Beyhaut, E., Dalla-Rizza, M., Rivas, F. 2012. Plataforma de bioinsumos de uso agrícola en base a microorganismos benéficos. Revista INIA. **29**: 47-50.
2. Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. Vol.I, Greene. Publishing Associates and Wiley- Interscience, New York.
3. Azofeita-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agro. Mesoamericana*. **17(2)**: 221-242.
4. Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C., Mendoza G. 2010. Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*. **1**: 213-224.
5. Bashan, Y. y Levanony, H. 1987. Horizontal and vertical movement of *Azospirillum brasilense* Cd in the soil and along the rhizosphere of wheat and weeds in controlled and field environments. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3473-3480.
6. Bastidas, L., Rea, R., De Sousa, O., Briceño, R., Hernández, E. 2009. POTENCIAL AZUCARERO Y PANELERO DE CINCO CULTIVARES DE CAÑA DE AZÚCAR EN EL VALLE DE SANTA CRUZ DE BUCARAL, ESTADO FALCÓN, VENEZUELA. *Agronomía Trop.* **59(2)**: 137-148.
7. Becerra-De Armas, E., Lugo-Ruiz, I., Martínez, R., Pineda-Ruiz, E., Viñas, Y. 2014. Uso del biofertilizante *Azospirillum* como fuente alternativa para la fertilización nitrogenada de la caña de azúcar. *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, **48(3)**: 49-53.
8. Caballero-Mellado, J. 2001. El género *Azospirillum*. Programa de Ecología Molecular y Microbiana. Centro de Investigaciones sobre Fijación de Nitrógeno. UNAM. México. pp 22.
9. Carrera, A. 2012. Caracterización bioquímica, molecular y funcional del banco de cepas de *Azospirillum* spp. Del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la sierra ecuatoriana. Trabajo de Grado para el Título de Ingeniera en Biotecnología de la Escuela Politécnica del Ejército, Quito-Ecuador. 135 p.
10. Cassán, S., García I. 2008. *Azospirillum* sp.: Cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asoc. Argentina de Microbiología. Primera edición. Buenos Aires, Argentina.
11. Castellanos, F., Valecillos, M. 2011. Diseño de módulo de lombricultura (servicio y soporte para elaboración de Biofertilizante sólido). Tesis de Técnico Superior Agrícola. Universidad de Los Andes, Trujillo. Trujillo, Venezuela.
12. Cello, F., Bevivino, A., Chiarini, L., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S., Dalmastrì, C. 1997. Biodiversity of a Burkholderia cepacia population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied Environmental Microbiology* **63**: 4485-4493.
13. D. Espinosa-Victoria, Hernández-Flores, L., López-Reyes, L. 2006. Diversidad genética de *Azospirillum brasilense* en suelos cultivados con maíz con labranza

- convencional y de conservación. Terra Latinoamericana. Volumen **24(2)**: 245-223.
14. de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y. 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R. y Alarcon, A. Editorial Trillas, Mexico. pp. 170-224
 15. Desjardins, P., Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. J. Vis. Exp. (45), e2565, doi: 10.3791/2565.
 16. Dobereiner, J., Marriel, I., Nery, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*. Canadian Journal of Microbiology. **22**: 1464-1473.
 17. Falkow, S., Dworkin, M., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E. 2006. The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Alpha and Beta Subclasses. Editorial Springer. Tercera edición, Vol. 5, New York, E.U.A.
 18. FAO. (1989). Estrategias en Materia de Fertilizantes. En FAO, Fomento de Tierras y Agua. Roma: Colección FAO.
 19. FAO. 2002. Los fertilizantes y su uso. Asociación internacional de la Industria de los Fertilizantes, IFA.
 20. Fernández, A., García, C., Sáez, J., Valdezate, S. 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología. Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) **37**.
 21. Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, Brasil.
 22. González-Andrés, F., Pita Villamil, J.M. 2001. Conservación y Caracterización de Recursos Fitogenéticos. Publicaciones I.N.E.A.
 23. Gupta, R. 2000. The phylogeny of proteobacteria: Relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. FEMS MICROBIOLOGY Reviews. **24**: 367-402.
 24. Hammer, D., Harper, D. and Ryan, P. 2001. PAST: Palaeontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontología Electronica 4(1): 9 pp.
 25. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. 1994. Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 39-56pp.
 26. Krieg, N. y Döbereiner, J. 1984. Genus Azospirillum Tarrand, Krieg and Dobereiner 1979. En: Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. Volumen 1. Editado por Noel Krieg y John Holt. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 94-104pp.
 27. Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D., Pandey, B. 2009. Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. Plant Omics Journalls. **2(4)**:141-162
 28. Leal, A. 2009. Innovación para la producción de biofertilizantes líquidos (*Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium*) y Consorcio Microbiano (Bacterias Fototróficas, Bacterias ácido lácticas y levaduras) promotores del crecimiento vegetal. Instituto Nacional

- de Investigaciones Agrícolas del Estado Anzoátegui. MPPAT [Consulta: 05 Junio 2015].
29. López, M., Martínez, R., Brossard, M., Toro, M. 2010. Capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de cepas nativas de agroecosistemas venezolanos. *Agronomía Tropical* **60(4)**: 355-361.
 30. López, M., Rodríguez, B., Bolívar, A. 2009. Estrategias del Estado venezolano para consolidar el uso de biofertilizantes en la agricultura. Simposio sobre biofertilizantes, riesgos y ventajas. XVIII Congreso Venezolano de la Ciencia del Suelo. Santa Bárbara del Zulia, del 09 al 13 de marzo de 2009.
 31. Lupski, J.R. y Weinstock, G.M. 1992. Short, Interspersed Repetitive DNA Sequences in Prokaryotic Genomes. *Journal of Bacteriology* **174(14)**: 4525-4529.
 32. MacFaddin, J. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3era edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires, Argentina.
 33. Mamaril, J. and Trinidad, L. 1998. Use of rep-PCR to fingerprint the genome of *Azospirillum* spp. *Molecular Microbial Ecology of the soil*. 155-160. Hardarson, G. and Broughton, W. (eds). Kluwer Academic Publishers.
 34. Marcano, M., García, M., Caraballo, L. 2003. Nota Técnica: Prueba comparativa de variedades de caña de azúcar en el noreste del estado Monagas, Venezuela. *Bioagro*. **15(3)**: 221-225.
 35. Mendoza, D., Arbeláez, H., Bravo, N. 2010. Prácticas del laboratorio de Biología Molecular: su aplicación en genética básica. Colección lecciones escuela de medicina y ciencias de la salud. Editorial Universidad del Rosario. Primera edición. Bogotá, Colombia.
 36. Morales, K. 2003. Evaluación y caracterización morfológica y molecular por microsatélites de genotipos de maíz (*Zea mays* L.) de altura, INIAP, PICHINCHA, ECUADOR, 2002. Tesis de grado para el título de Doctora en Biología. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Fiolofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Biología y Química. 114p.
 37. Motsara, M., Battacharya, P., Srivastava, B. 1995. Biofertilizer Thechnology, Marketing and Usage. Fertilizer Development and Consultation Organization. New Delhi, India. 1-58pp.
 38. Mullis, K. 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*: 65- 65.
 39. Pállas, V., Escobar, C., Rodríguez Palenzuela, P., Marcos, J. 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Ediciones Mundi-Prensa. Primera edición, Madrid, España.
 40. Pérez, J. 2014. Uso de los fertilizantes y su impacto en la producción agrícola. Trabajo de Grado para el Título de Magister en Ciencias - Geomorfología y Suelos de la Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias. Medellín, Colombia. 105 p.
 41. Placencia, E., Cárdenas, Y., López-Cánovas, L. Riverón, A. 2011. Sistema Automatizado para Simular la Electroforesis de Campo Pulsante y Almacenar los Pulsotipos Virtuales del Genoma Bacteriano. IFMBE. V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB. Vol. 33.


42. Quantity One. 2000. User Guide for Version 4.2.1 Windows and Macintosh. Bio-Rad Laboratories.
43. Rada, A. y Taboada, G. 1998. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. BIOFARBO. Vol. VI: 63-68.
44. Rangel-Lucio, J., Rodríguez, M., Ferrera, R., Castellanos-Ramos, J., Ramírez, R., Alvarado, E. 2011. AFINIDAD Y EFECTO DE *Azospirillum* sp. EN MAÍZ. AGRONOMÍA MESOAMERICANA **22(2)**: 269-279.
45. Rincones, L. 2008. Detección y caracterización molecular de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* y *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* variedad *fuscans*, patógenos en frijol (*phaseolus* sp. L) mediante análisis de secuencias consenso intergénicas repetidas enterobacteriales (ERIC) y secuencias en mosaico del elemento box (BOX). 3er Premio Colegio Nacional de Bacteriología a la investigación. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Bogotá, Colombia.
46. Rivera, D. 2008. Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. Tesis de Ingeniero en Producción Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula de Santander. San José de Cúcuta, Colombia. 76p.
47. Sánchez, T. 2011. DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Xanthomonas albilineans* (ASHBY) DOWSON EN VARIETADES COMERCIALES DE CAÑA DE AZÚCAR *Saccharum* spp., EN VENEZUELA. Trabajo de Grado para el Título de Doctorado en Ciencias Agrícolas de la Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela. 129 p.
48. Segovia, V. y Alfaro, Y. 2009. El maíz: un rubro estratégico para la soberanía agroalimentaria de los venezolanos. *Agronomía Trop.* **59(3)**: 237-247.
49. Segovia, V. y Alfaro, Y. 2009. El maíz: un rubro estratégico para la soberanía agroalimentaria de los venezolanos. *Agronomía Trop.* **9**: 3.
50. Serna-Cock, L., Arias-García, C., Valencia-Hernandez, L. 2011. BIOFERTILIZACIÓN, UNA ALTERNATIVA AL USO DE FERTILIZANTES QUÍMICOS EN CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum*). *Revista Alimentos Hoy*, **20(24)**: 69-82.
51. Sevilla, M., Burris, R.H., Gunapala, N., Kennedy, C. 2001. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif₋ mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 358-366.
52. Sturz, A., Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*. **15(2)**: 183–190.
53. Tapia, C. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. del CATIE. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. pp.157.
54. Telléz, S., Bustos, M., Velázquez, G. 2007. Aprovechamiento Biotecnológico de Productos Agropecuarios I. Plaza y Valdes editores. Primera edición, Madrid, España.

55. Toro, M., Bazó, I., López, M. 2008. Micorrizas arbusculares y bacterias promotoras de crecimiento vegetal, biofertilizantes nativos de sistemas agrícolas bajo manejo conservacionista. *Agronomía Tropical* **58(3)**: 215-221.
56. Vicente De, M.; C. López; T. Fulton. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI).
57. Vílchez, G. y Alonso, G. 2009. Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* **29**:6-12.
58. Vital López, L., Cruz Hernández, M., Fernández, S., Mendoza, A. 2015. Diversidad bacteriana en maíz convencional y genéticamente modificado. *International Journal of experimental Botany ΦYTON* **84**: 233-243.
59. Wilches, A. 2004. Roma, Italia. Formato Digital. Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura. Universidad Rafael Landívar. Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Serie técnica No. 15. 25p. Guatemala.
60. Zérega, L., R. Rea, A. Díaz, P. Guerrero y T. Hernández. 2001. Caracterización agroecológica y su relación con la interacción genotipo ambiente en un ensayo final de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) en Venezuela. INIA - Yaracuy. Yaritagua. Venezuela. 13 p.

Consultas en línea:

1. *Azospirillum brasilense*. Disponible [en línea]: <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zdrs0160.jpg> [Consulta: 23 Mayo 2015].
2. Couillerot, O. 2009. Compatibilité des bactéries phytobénéfiques *Azospirillum* et *Pseudomonas* dans la rhizosphère. *Agricultural sciences*. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. French. [en línea]: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00876883/document> [Consulta: 29 Mayo 2015].
3. FEDEAGRO. En el Año 2015 se Acentuó Significativamente la Recesión Agrícola: La producción por rubro en el año 2015. [en línea]: <http://www.fedeagro.org/detalle3.asp?id=2375> [Consulta: 05 Octubre 2015].

9 ANEXOS

CIB 
Centro de Investigación en
Biotecnología Agrícola
"Dra. Dora Micheletti de Zerpa"

Maracay, mayo 02 2016

Señores
Unidad de Ética de la Ciencia y la Tecnología
Facultad de Ciencias
UCV

Asunto: Aval Bioético de la Institución. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, UCV

Quien suscribe **Dr. Antonio José Díaz Pérez, C.I. 8.614.066**, Director del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, de la Universidad Central de Venezuela, por medio de la presente **AVALA** desde el punto de vista Bioético el Trabajo de Grado del estudiante de la Facultad de Ciencias-UCV **Br. Jesús Alejandro Pino Calzadilla**, Cédula de Identidad **18.915.434**, intitulado: "**Caracterización molecular de cepas de Azospirillum spp. de Venezuela aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz (Zea mays L.) y caña de azúcar (Saccharum officinarum L.) mediante cebadores ERIC y BOX A1R**".

Además, de informar que el Trabajo de Grado forma parte de la alianza estratégica entre el Instituto Nacional de Salud Integral (INSAI) del Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras y la Facultad de Agronomía, UCV; en el área de caracterización molecular de microorganismos del Proyecto: Producción de biofertilizantes, biocontroladores y bioestimulantes, para una agricultura sustentable (2014-2018).

De esta forma, el mencionado Trabajo de Grado es un área de investigación interdisciplinaria e interinstitucional, bajo las responsabilidades: Ing. Agr (a). Yosleidy Guevara e Ing. Agr. Yader

Facultad de Agronomía – UCV – Av. Universidad – Maracay – Edo Aragua – Apartado 4579 – Telefax: 02



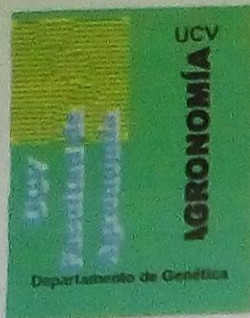
**Centro de Investigación en
Biotecnología Agrícola
"Dra. Dora Micheletti de Zerpa"**

Salazar, del INSAI, y los Doctores Catalina Ramis y Angulo Luis (Facultad
de Agronomía, UCV)

Atentamente,

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

Dr. Antonio J. Díaz
**Director del Centro de Investigaciones
En Biotecnología Agrícola**



Abril, 21 2016

Ciudadano
Br. Jesús Alejandro Pino Calzadilla
Estudiante de la Facultad de Ciencias
Universidad Central de Venezuela

El Consejo Técnico del Instituto y Departamento de Genética **AVALA** el **CONSENTIMIENTO** para que realice su Trabajo Especial de Grado, titulado: **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Azospirillum* spp. DE VENEZUELA AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE CULTIVOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) Y CAÑA DE AZÚCAR (*Saccharum officinarum* L.) MEDIANTE CEBADORES ERIC Y BOX AIR"**, Tutoriado por el Dr. Luis Angulo, personal Docente y de Investigación del Instituto y departamento de Genética.

Sin más a que hacer referencia,

Se despide,

Atentamente,


Dra. ROSALÍA VELASQUEZ
Directora y Jefa del Departamento
De Genética, Facultad de Agronomía
Universidad Central de Venezuela



Centro de Investigación en
Biotecnología Agrícola
"Dra. Dora Micheletti de Zerpa"

Quien suscribe Dr. Antonio José Díaz Pérez, C.I. 8.614.066, Director del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola, Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, le informa al estudiante de la Facultad de Ciencias de la UCV, Br. Jesús Alejandro Pino Calzadilla, Cédula de Identidad 18.915.434, que puede realizar su Trabajo de Grado intitulado: "Caracterización molecular de cepas de *Azospirillum* spp. de Venezuela aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante cebadores ERIC y BOX A1R", bajo la Tutoría del Dr. Luis Angulo, C.I. 10.345.070. en anexo se le hace entrega del Protocolo de Bioseguridad del Laboratorio de Genética Molecular y el Protocolo de Extracción del ADN para microorganismos.

Consentimiento de continuar con la ejecución de sus actividades de investigación, que se expide a solicitud de la parte interesada en la ciudad de Maracay a los 20 días del mes de Abril del 2016.

CENTRO DE INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

Dr. Antonio J. Díaz P.
Director del CIBA



Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola

Realizado por: Dr. Luis Angulo-Graterol

Manual de Bioseguridad

Código: 001

Seguridad en las actividades del Laboratorio de Genética Molecular

Fecha de emisión:
Noviembre 2012

Página: 1/5

1.- Objetivo y Alcance

Este procedimiento establece el conjunto de normas o medidas preventivas, cuyo objetivo es mantener el control de los riesgos procedentes de agentes biológicos, físicos o químicos, para la previsión de impactos nocivos frente a los riesgos de las actividades en el laboratorio y asegurar el desarrollo de los procedimientos, con la finalidad de mantener la seguridad personal, de visitantes y del ambiente.

2.- Responsabilidades

El personal del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) será el responsable del cumplimiento de los procedimientos, así como la supervisión de pasantes provenientes de instituciones de educación secundaria y superior (pre y postgrado), para la ejecución de los pasos establecidos en el mismo, en las actividades de docencia e investigación.

3.- Posibles riesgos

Se entiende como 'riesgo' la posibilidad de que un trabajador sufra un determinado daño derivado de la exposición a agentes de distinta naturaleza. La Biología Molecular utiliza agentes potencialmente mutagénicos, entre ellos: Agentes intercalantes (bromuro de etidio), agentes aquirantes y carcinógenos, radiación UV, solventes de extracción y purificación, antibióticos, fagos, entre otros. Por ello la importancia de trabajar en el laboratorio implementando y respetando las Normas de Prevención y Seguridad Biológica, utilizando los reactivos, insumos y equipos adecuadamente.

En el laboratorio es necesario minimizar la exposición a agentes potencialmente peligrosos, en cualquiera de las etapas o procesamientos intermedios de la purificación o de las técnicas de estudios del ADN. De ahí la importancia de trabajar concentradamente, seguir el diseño, los protocolos adecuadamente y cumplir con la bioseguridad. Además, de no subestimar el riesgo del cualquier producto químico.

4.- Normas de Prevención Universales

- **NO INGERIR** alimentos ni bebidas durante la permanencia en el laboratorio, ni

guardarlos en los congeladores y neveras destinados a material propio del laboratorio.

- **NO FUMAR.**

- Es **IMPORTANTE** conocer:

- Sólo se permite la entrada al laboratorio del personal autorizado.
- Retirase anillos, pulseras y otras joyas.
- Utilizar calzado adecuado, **NO USAR SANDALIAS** u otro tipo de calzado que deje el pie al descubierto. Es recomendable utilizar pantalones largos y, en general, vestimenta que evite que las sustancias que puedan caer se introduzcan dentro del calzado o entren en contacto con la piel de las piernas o pies.
- Sólo realice actividades con **AUTORIZACIÓN PREVIA** y **BAJO SUPERVISIÓN**.
- Los agentes, sustancias y productos peligrosos que existen en el laboratorio.
- Metodología de trabajo en el laboratorio.
- Los **RIESGOS** asociados a cada actividad.
- Medidas a realizar en caso de emergencia. Solicite **INFORMACIÓN** Primeros Auxilios en caso de accidente.
- Utilizar **SIEMPRE** el equipo de protección adecuado, comenzando por utilizar ropa limpia y prendas de protecciones limpias.
- Uso de la **BATA CERRADA A BOTONES** es **OBLIGATORIO**.
- Si realiza algún descanso, hacerlo siempre fuera de la zona o área de trabajo.
- **NUNCA** coloque en contacto con boca, piel y ojos las sustancias químicas, microorganismos o cualquier material de laboratorio.
- Tenga **EXTREMA** higiene personal, no se deje ropa contaminada por algún químico.
- Es conveniente **DOCUMENTAR** todas las actividades que realice en el laboratorio y las incidencias (**cuaderno de laboratorio**).
- Si tiene algún **MALESTAR** (dolo de cabeza, náuseas, mareos, vómito, etc.) que experimente luego de haber manipulado alguna sustancia o incluso después de dos a tres semanas de la manipulación, **ACUDIR** inmediatamente al médico.
- **EVITE** hablar durante el proceso de extracción de ADN y PCR. **NO TOCAR** con los guantes su cabello, superficies, la ropa, teléfonos, puertas, etc. **NO** retirarse del laboratorio con los guantes.
- Si tiene el cabello largo utilice un gorro para evitar el contacto con el material de trabajo.
- Mantenga el área de trabajo limpia y ordenada, **EVITE** colocar libros y material de escrito en el área de trabajo.
- Si se trabaja con material de riesgo, **NUNCA** debe estar una persona sola en el laboratorio.
- **NUNCA** utilice recipientes de laboratorio para contener bebidas o alimentos

ni coloque productos químicos en recipientes de productos alimenticios.

- No recibir visitas ni realizar reuniones en el laboratorio.
- El trabajo o la visita a un laboratorio puede suponer un riesgo para las **MUJERES EMBARAZADAS** y las **personas inmunodeprimidas**. Se debe informar de los riesgos que supone la actividad concreta que se realiza en el laboratorio.

- En el Laboratorio de Genética Molecular del CIBA, cada etapa de estudio del ADN se encuentra separada: Recepción de la muestra; Preparación de soluciones; Lavado y autoclave; Extracción del ADN; Cuantificación y calidad del ADN (Gel de Agarosa); PCR; Analizador de imágenes, y análisis de los resultados (generalmente se realiza fuera del laboratorio).

Esto con la finalidad de evitar la contaminación de las muestras y de cada ambiente de trabajo. Cada etapa se realiza en espacios físicos separados, para evitar contaminación interna con los productos generados de cada fase.

- Cada sala tiene su propio material (pipetas, papel absorbente, tubos, soluciones, bidones de agua destilada, entre otros), los cuales no son intercambiables bajo ningún concepto. **El material que se utiliza para extracción de ADN; Geles de agarosa; PCR, NO se emplea para ninguna otra área.**
- El laboratorio tiene su organización referente a la distribución, instalaciones de aparatos y equipos y procedimientos de trabajo, para el mantenimiento preventivo y minimizar los riesgos.
- Cada personal del laboratorio (técnico, investigador, docente, pasante, asistente) debe tener los elementos de protección personal (bata, lentes de seguridad, guantes, máscara anti gases, etc.), que el responsable del laboratorio considere necesario. **Estos elementos son de USO exclusivo del laboratorio y NO pueden ser retirados del mismo.**
- La preparación o mezcla de soluciones de trabajo (stock) de agentes mutagénicos y carcinógenos volátiles, como el bromuro de etidio debe hacerse con una máscara protectora de vapores, en su área específica. Utilice la campana de extracción de gases al trabajar con sustancias volátiles y/o tóxicas, para capturar los humos y vapores de la manipulación de productos químicos. Las campanas de gases son un medio de protección colectiva y no deben utilizarse para almacenar productos.
- El uso de guantes es **OBLIGATORIO** para la preparación y manipulación de cualquier solución nociva o potencialmente peligrosa. Se recomienda utilizar **DOBLE GUANTE** cuando se manipulen geles que fueron tratados con agentes intercalantes o soluciones de las mismas, por su capacidad de penetración cutánea.
- **Lavarse CORRECTAMENTE** las manos luego de manipular cualquier solución nociva o peligrosa, luego retirar los guantes, disponerlos en el contenedor respectivo, y lavarse las manos y antebrazos con suficiente agua y jabón antiséptico.
- Comprobar el etiquetado de los reactivos y soluciones de trabajo, así como etiquetar correctamente las soluciones de trabajo (Fecha, concentración, datos de la persona que lo preparó). Es importante no reutilizar envases para otros productos ni sobreponer etiquetas.

Campo Experimental Facultad de Agronomía, Instituto de Genética, CIBA – UCV – Av. Universidad – Maracay – Estado Aragua.
Apartado 4579. (0243) 5507265
DISEÑO Dr. Luis R. Angulo-Graterol

- **NO UTILICE** un equipo sin conocer bien su funcionamiento. Al finalizar de utilizar un equipo, **DESENCUFAR** el aparato, limpiar los materiales y equipos ordenadamente y colocar los reactivos en el estante de **REACTIVOS EN USO**.
- Informar inmediatamente la avería o mal funcionamiento de un equipo al supervisor, personal técnico o jefe del laboratorio y evite su utilización hasta completar su reparación.
- Mantenga las llaves de agua cerradas.
- Si necesita desplazarse por el laboratorio debe hacerlo con precaución, sin interrumpir a los que están trabajando.
- El material de trabajo debe transportarse con seguridad, utilizando bandejas o carritos. Nunca se debe utilizar el cuaderno de laboratorio como una bandeja. No se deben mover reactivos o soluciones en recipientes sin tapar.
- **NO COLOQUE** restos de un químico nuevamente en su envase.
- Los residuos y la basura del laboratorio deben ser colocados en sus contenedores respectivos (solicite información al responsable de cada área para la disposición de los residuos y desechos generados de sus actividades en cada área del laboratorio).
- Desechar el material de vidrio roto o fisuras (previamente limpiarlo) en su contenedor apropiado.
- Dejar siempre **LIMPIA** el área de trabajo y lave el material de vidriería o plástico utilizado.

5.- Manejo de los Desechos

- Los criterios utilizados para el traslado interno, almacenamiento primario, transporte interno, almacenamiento final, transporte externo, tratamiento y disposición final, se basan en las Normas y Técnicas para la clasificación y manejo de desechos, incorporados en los Trabajos de Grado Salazar (2007), Calderón (2007), Juárez (2008) y Nieto (2010).

6.- Medidas en caso de accidentes

- Derrames de sólidos: Recogerlo por aspiración. Líquidos: Colocar material absorbente y disponerlo en recipientes adecuados para su eliminación como residuos. **VERIFIQUE** siempre la **FICHA TÉCNICA DE SEGURIDAD** correspondiente.
- Mantener la calma, evaluar la situación, protegerse y estar fuera de la zona de riesgo, avisar a los bomberos universitarios.
- El laboratorio cuenta con una ducha ubicada en la zona central de sus instalaciones.

7.- Bibliografía

- Calderón, N. 2007. Propuesta de manejo de desechos químicos del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

Campo Experimental Facultad de Agronomía, Instituto de Genética, CIBA – UCV – Av. Universidad – Maracay – Estado Aragua.
Apartado 4579. (0243) 5507265
DISEÑO Dr. Luis R. Angulo-Graterol

Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Maracay, Venezuela. Presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 110pp.

- Juárez, G. 2008. Propuesta de manejo de desechos químicos generados en los análisis de isoenzimas en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola de la Facultad de Agronomía. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 100pp.
- Nieto, S. 2010. Validación de una propuesta para la gestión de desechos químicos generados en los estudios de isoenzimas en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 72pp.
- Salazar, J. 2007. Evaluación de la aplicabilidad de la gestión de desechos químicos en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 105pp.

CIBA



Centro de Investigación en
Biotecnología Agrícola
"Dra. Dora Micheletti de Zerpa"

Maracay, mayo 02 2016

Señores
Unidad de Ética de la Ciencia y la Tecnología
Facultad de Ciencias
UCV

Asunto: Estimación de Bioniego Ambiental del Trabajo de Grado del ciudadano Br. Jesús Alejandro Pino Calzadilla.

Quien suscribe **Dr. Antonio José Díaz Pérez, C.I. 8.614.066, Director** del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA), Facultad de Agronomía, de la Universidad Central de Venezuela, por medio de la presente informa sobre los posibles riesgos ambientales del Trabajo de Grado del estudiante de la Facultad de Ciencias-UCV **Br. Jesús Alejandro Pino Calzadilla, Cédula de Identidad 18.915.434**, intitulado: "Caracterización molecular de cepas de *Azospirillum* spp. de Venezuela aisladas de la rizósfera de cultivos de maíz (*Zea mays* L.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) mediante cebadores ERIC y BOX A1R".

En la extracción, calidad y cuantificación del ADN, mediante electroforesis en gel de agarosa se utilizan soluciones tóxicas y agentes intercalantes, como Cloroformo: Butano (49:1) y bromuro de etidio. El Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del CIBA cuenta con un equipo técnico que realiza los pasos para el traslado interno, almacenamiento primario, transporte interno, almacenamiento final; transporte externo, tratamiento y disposición final, de esas y otras soluciones, basado en las Normas y Técnicas para la clasificación y manejo de desechos, incorporados en los Trabajos de Grado Salazar (2007), Calderón (2007), Juárez (2008) y Nieto (2010).



La extracción del ADN se realiza en campana de extracción de gases y la verificación de la calidad y concentración del ADN se realiza en un área específica del laboratorio. En el LGM cada etapa de estudio del ADN se encuentra separada: Recepción de la muestra; Preparación de soluciones; Lavado y autoclave; Extracción del ADN; Cuantificación y calidad del ADN (Gel de Agarosa); PCR; Analizador de imágenes, y análisis de los resultados (generalmente se realiza fuera del laboratorio).

Cada etapa se realiza en espacios físicos separados, para evitar contaminación interna con los productos generados de cada fase y se dispone de los insumos generados hasta su disposición final.

Además, posee autoclave para descontaminar las cápsulas de Petri que contienen los medios sólidos y las bacterias; las lancetas, puntas y otros insumos empleados en la extracción del ADN.

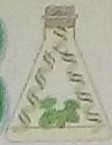
Se dispone de un almacenamiento temporal de los desechos generados en los estudios de caracterización molecular, ubicado fuera del laboratorio y alejado de las instalaciones del Centro de investigación.

Atentamente,



Dr. Antonio J. Díaz
Director del Centro de Investigaciones
En Biotecnología Agrícola

CIB



Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola
Realizado por: Dr. Luis Angulo-Graterol

Riesgos Biológicos

Código: 012

Fecha de
emisión:
Mayo 2015

**Procedimientos al
trabajar con
Microorganismos**

Página: ¼

1. INTRODUCCIÓN

La estimación de los riesgos en el LGM al trabajar con tejido vegetal o agentes biológicos es la base para una gestión activa de seguridad y la salud en el trabajo y el entorno (Ambiente). Esto fundamentado en la Constitución de la República Bolivariana de Venezuela (artículos 86 y 97); Ley Orgánica de Prevención, Condición y Medio Ambiente (artículos 70 y 96), Ley sobre Sustancia, Materiales y Desechos Peligrosos (artículo 9 numeral 22), y el reglamento de Condiciones de Higiene y Seguridad (artículos 493 al 494).

2.- SEGURIDAD

En el caso de los cultivos y microorganismos (cultivos celulares) que se utilizan en el laboratorio para extracción del ADN y técnicas de amplificación PCR no representan un riesgo a la salud humana ni al ambiente, porque no presentan características de patogenicidad, virulencia, contagiosidad y poder de invasión. Además, en el laboratorio se realizan los procedimientos descritos en el Manual de Bioseguridad para el tratamiento de los insumos y materiales en las actividades de extracción del ADN, para minimizar los posibles riesgos en el personal y el ambiente.

3.- ESTIMACIÓN DE POSIBLES RIESGOS

Para la estimación de posibles riesgos se realiza un procedimiento preventivo del desempeño de las personas que realizan algún tipo de investigación en el LGM y si cumplen con los protocolos de bioseguridad, en el manejo de los desechos generados en las actividades del laboratorio. Esto con la finalidad de detectar y corregir las deficiencias que puedan causar un impacto en el ambiente. Además, involucra la optimización y ejecución de todos los procesos del laboratorio, siguiendo las metodologías estandarizadas, para minimizar el riesgo ambiental. Basados en la correcta deposición y eliminado final de las sustancias generadas en los análisis moleculares, para minimizar el daño, nivel o grado de severidad de las actividades, siguiendo los protocolos del laboratorio, en las fuentes (dispositivo, equipo, instalación, infraestructura, métodos de trabajo o procedimiento) utilizados en los análisis moleculares, que eviten peligro físico, químico o biológico.

4.- METODOLOGÍA

Pasos en la estimación de Bioriesgo

1. Observación del comportamiento en el área de trabajo del personal
2. Inspecciones de las áreas del laboratorio, equipos y funcionamiento en general
3. Verificación de los controles de seguridad

En el laboratorio está un cuaderno de registro de las actividades realizadas por todo el personal que se desempeña en el mismo, para realizar anotaciones de rutina y observaciones del funcionamiento y registro anecdótico: Nombre y apellido, fecha, hora de inicio y de culminación de sus actividades de permanencia en el laboratorio y actividad realizada; además de registrar cualquier eventualidad presentada durante su permanencia en el laboratorio. El personal del laboratorio valora el riesgo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valoración de riesgo en las actividades del laboratorio y su acción preventiva

Riesgo	Acción y Temporización
Trivial (T)	No se requiere acción específica
Tolerable (TO)	No se necesita mejorar la acción preventiva, pero se requiere mejorar la eficacia en las medidas de control
Moderado (M)	Se deben hacer esfuerzos para disminuir el riesgo en un periodo determinado y mejorar las medidas de control
Importante (I)	No debe comenzarse el trabajo hasta que se haya disminuido el riesgo o si el riesgo se inicia durante una actividad, es importante disminuir el riesgo
Intolerable (IN)	No debe comenzar ni continuar el trabajo hasta que se reduzca el riesgo y prohibirse el trabajo

Cuadro 2. Clasificación de los riesgos biológicos

Grupo	Posible riesgo
1	Poca probabilidad de causar enfermedad al hombre
2	Agentes patógenos que pueden ocasionar enfermedad al hombre, supone un peligro para los trabajadores y se propague
3	Agente patógeno que pueden ser causa de enfermedad grave en el hombre, suponen riesgo a los trabajadores y propagación colectiva si no se cuenta con las medidas profilácticas y terapéuticas eficaces
4	Agentes patógenos que causen una enfermedad y supongan un serio peligro a los trabajadores, con alta probabilidad que se propague a la colectividad y no existe ni profilaxis ni tratamiento eficaz

En el Laboratorio de Genética Molecular los riesgos son del grupo 1.

5.- MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD AMBIENTAL

En el Laboratorio de Genética Molecular se realizan las siguientes medidas:

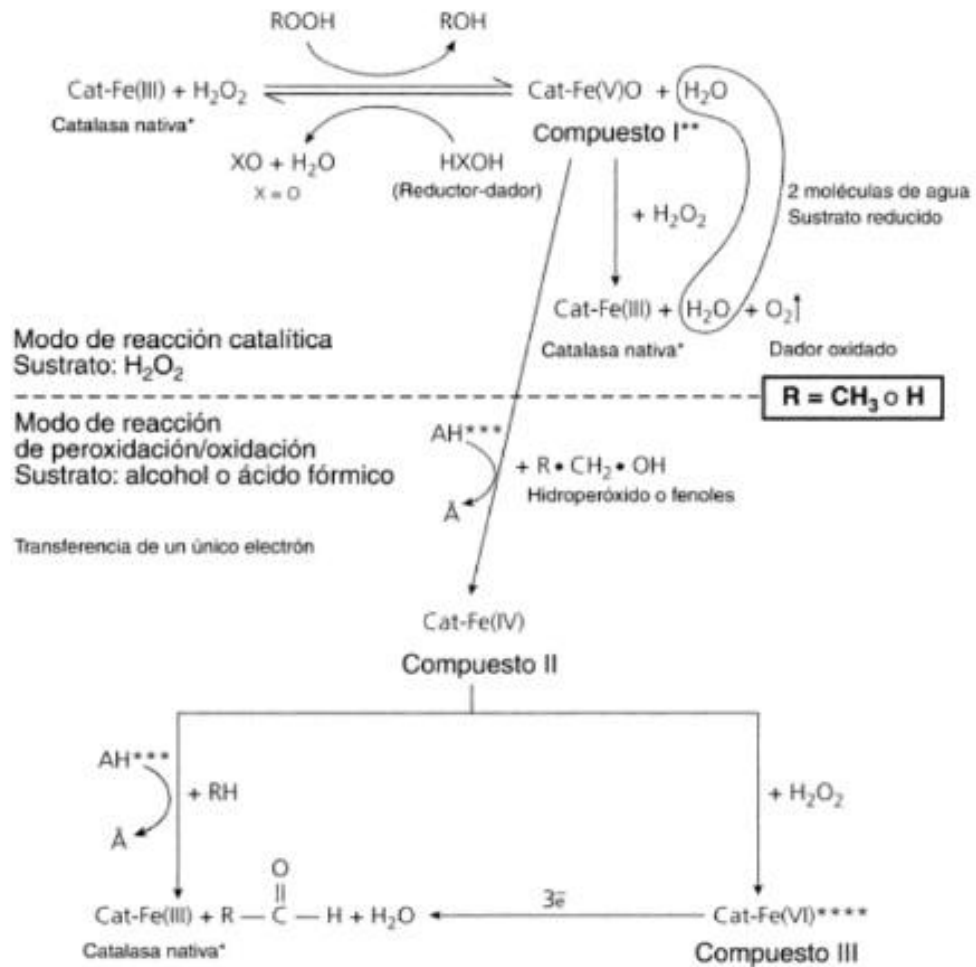
- Capacitación y sensibilización del personal
- Medidas rigurosas higiénicas del personal
- Recorrido a los usuarios por todas las áreas del laboratorio, explicación de los riesgos, medidas de seguridad, control y aplicación de las técnicas de bioseguridad
- Medidas de limpieza de las áreas del laboratorio, desinfección y gestión de los residuos generados
- Período de aclimatación de las sustancias peligrosas
- Deposición final de los desechos

6.- BIBLIOGRAFÍA

- Calderón, N. 2007. Propuesta de manejo de desechos químicos del Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Maracay, Venezuela. Presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 110pp.
- Juárez, G. 2008. Propuesta de manejo de desechos químicos generados en los análisis de isoenzimas en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola de la Facultad de Agronomía. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 100pp.
- Nieto, S. 2010. Validación de una propuesta para la gestión de desechos químicos generados en los estudios de isoenzimas en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 72pp.
- Salazar, J. 2007. Evaluación de la aplicabilidad de la gestión de desechos químicos en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola. Trabajo de Grado para optar al Título de Ingeniero Agrónomo, presentado ante la Universidad central de Venezuela, Facultad de Agronomía. 105pp.

catabolismo del H_2O_2 (reacción catalítica) o en la oxidación peroxidativa de pequeños sustratos como el alcohol etílico, alcohol metílico o el mercurio elemental (Hg^0) (Holt y col. 1994).

Reacciones catalíticas y de peroxidación



- * Ferricatalasa – estado de oxidación del FE - pH neutro
- ** Inestable – intermediario común en la reducción de los peróxidos
- *** Dador de electrones – reductor
- **** Derivado tetra-peróxido – estado ferril (estado ferro-oxi) (52)

Figura B. Reacción Catalítica y de Peroxidación de la catalasa. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

2. Prueba de Citocromo Oxidasa

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones (hidrógeno) al oxígeno, con la formación de agua (MacFaddin, 2003).

El sistema citocromo se encuentra en microorganismos aerobios o microaerófilos y anaerobios facultativos, de modo que la prueba de la oxidasa es importante para identificar a los microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba tiene su mayor utilidad para diferenciar colonias sospechosas de pertenecer a alguna de las *Enterobacteriaceae* (todas negativas) de otros géneros como *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Campylobacter* y *Pasteurella* (todas positivas) (MacFaddin, 2003).

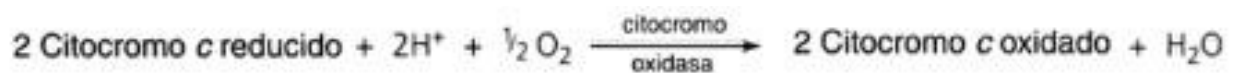


Figura C. Reacción Citocromo oxidasa. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

La prueba del citocromo oxidasa utiliza el dihidrocloruro de *p*-fenilendiamina, que sustituye al oxígeno como aceptador artificial de electrones. En estado reducido el colorante es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromo oxidasa y de hidrógeno atmosférico la *p*-fenilendiamina se oxida y se forma azul de indofenol (MacFaddin, 2003).

3. Tinción de Gram

Esta tinción desarrollada por el doctor Christian Gram en 1884, es hoy la más utilizada en microbiología y bacteriología, y permite de acuerdo a la estructura y grosor de la pared bacteriana, agrupar las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas. Las Gram positivas poseen una capa gruesa de peptidoglicán y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más pequeña de peptidoglicán y poseen membrana externa (Rodríguez y col., 2005).

Existen variaciones de esta técnica, pero en términos generales, la tinción Gram involucra varios pasos (Rodríguez y col., 2005):

1. Tinción inicial. Las células se tiñen con cristal violeta.
2. Mordente. Adición de yoduro (lugol) para formar un complejo cristal violeta-yoduro.
3. Decoloración. Adición de un solvente no polar, el cual actúa lavando el complejo cristal violeta-yoduro de las células Gram negativas. De esta manera las Bacterias Gram positivas continúan moradas y las Gram negativas quedan incoloras.
4. Contratinción. Tinción con safranina o fucsina, de manera que las bacterias Gram negativas, que se habían decolorado, se tiñen de rosado a fucsia según el colorante empleado; en tanto, las bacterias Gram positivas no se afectan con la contratinción y permanecen moradas.

4. Hidrólisis de la gelatina

Determina la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina. Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en la célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero debe ser catabolizada en componentes más pequeños. Las enzimas exocelulares de tipo proteolítico, gelatinasas, son excretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas (MacFaddin, 2003).

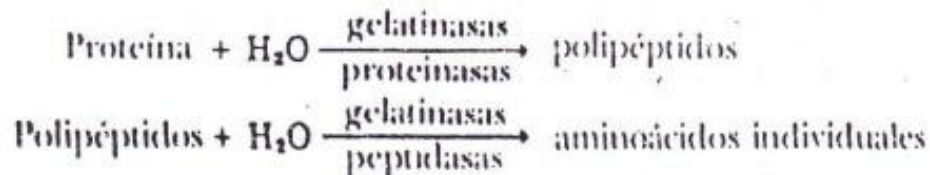


Figura D. Reacción general de la licuefacción de la gelatina. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

El catabolismo de las proteínas por las gelatinasas es un proceso en dos etapas, y el resultado final da una mezcla de aminoácidos individuales (MacFaddin, 2003).

5. Prueba de Ureasa

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa (MacFaddin, 2003).

El sustrato urea es una diamida del ácido carbónico. Todas las amidas (RCO-NH_2) son rápidamente hidrolizadas; la hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima

específica, la ureasa, para dar dos moléculas de amoníaco. En solución la urea se hidroliza, dando carbonato de amonio como producto final (MacFaddin, 2003).

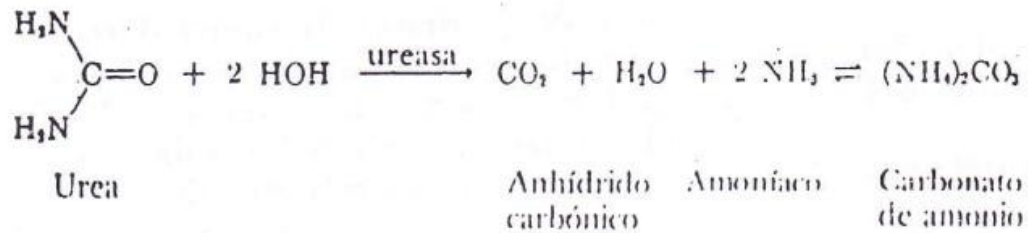


Figura E. Reacción general de la ureasa. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

La urea es una importante enzima microbiana vinculada con la descomposición de los compuestos orgánicos. La ureasa es considerada una enzima constitutiva dado que es sintetizada por ciertas bacterias sin tener en cuenta la presencia o ausencia del sustrato, la urea (MacFaddin, 2003).

La urea se clasifica como una amidasa, catalizando la hidrólisis de las amidas: enzimas que son capaces de romper por hidrólisis el enlace entre el nitrógeno y el carbono (MacFaddin, 2003).

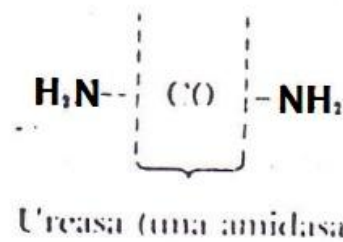


Figura F. Estructura de la Ureasa (amidasa). Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

6. Reducción de Nitratos

La reducción de nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-) y en gas nitrógeno (N_2) tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato (MacFaddin, 2003).

Figura G. Reducción del nitrato en nitrito Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

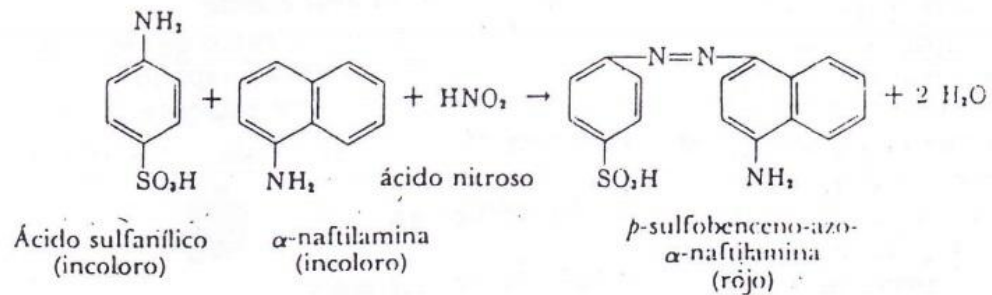
Sin embargo, las posibilidades del producto final de reducción de nitratos son muchas: nitrito (NO_2^-), amoníaco (NH_3), nitrógeno molecular (N_2), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), o hidroxilamina (R-NHOH). El producto final de la reducción que se forme depende de la especie bacteriana (MacFaddin, 2003).

La reducción del nitrato en gas nitrógeno u oxido ferroso se denomina desnitrificación. El nitrato sirve como aceptor de electrones; por cada molécula de nitrato reducido se aceptan cinco electrones (MacFaddin, 2003).

Figura H. Reducción del nitrato en nitrógeno molecular. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

La reducción se manifiesta por la presencia de un producto final catabólico o la ausencia de nitrato en el medio donde se encuentre la bacteria (MacFaddin, 2003).

Reacción de la fase 1 ¹⁹



Reacción de la fase 2 ¹²

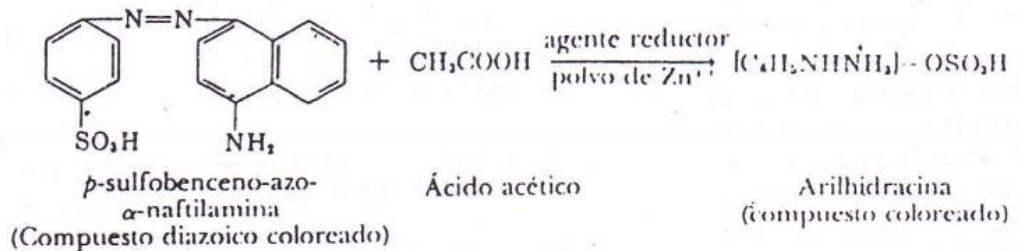


Figura I. Química de la reducción del nitrato. Tomado de: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (MacFaddin, 2003).

7. Prueba de la Motilidad

Determina si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente entre los bacilos (bacterias en forma de bastoncillos); sin embargo, algunas formas de cocos son móviles (MacFaddin, 2003).

Las bacterias móviles pueden contener un solo flagelo o muchos; además su localización varía con la especie bacteriana y condiciones de cultivo. A veces las bacterias con motilidad producen variantes no móviles que parecen ser estables y raramente se revierten en formas móviles (MacFaddin, 2003).

Resultados para el género *Azospirillum*:

Las bacterias del género *Azospirillum* según la novena edición del Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática (Holt y col. 1994) son fijadoras de nitrógeno o diazótrofos, forma Gram-negativas.

En *Azospirillum* la actividad de la catalasa va de fuerte a indetectable (Staley y col., 1984). Según el resumen de las características morfológicas y metabólicas para la identificación de *Azospirillum* spp. reportado en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática por Krieg y Döbereiner (1984), el resultado difiere entre las cepas y especies de *Azospirillum*, siendo este positivo para *A. brasilense*. Así mismo, las siguientes pruebas son universalmente negativo para el género *Azospirillum*: El almidón y la hidrólisis de gelatina (Staley y col., 1984).

Bajo tensiones altas y bajas de oxígeno, citocromos membranosos c, b y a-a3, y un citocromo C soluble fueron identificados como compuestos de la cadena respiratoria en *Azospirillum* como en otros aerobios (Okon, 1994). Según Chapple (1998) *Azospirillum* presenta capacidad bacteriana de metabolizar $2H_2-GA_{12}$ a una forma giberélica con actividad biológica, parte del metabolismo de Giberilinas en la bacteria estaría regulado por monooxigenasas dependientes del citocromo.

Staley y col. (1984), según Tarrand, Krieg y Dobereiner (1979), reportan en el Manual Bergey's de Bacteriología Sistemática para las bacterias del genero *Azospirillum* movilidad en medio líquido por un solo flagelo polar; en medios sólidos a 30°C también pueden formarse numerosos flagelos lateral de longitud de onda más corta.

Azospirillum es conocido para convertir el nitrato en nitrito en condiciones aeróbicas asimilatorias o anaeróbicas disimilatorias, o vía respiratoria (Staley y col., 1984). La asimilación de nitrato se produce a través de nitrato y nitrato reductasas de asimilación con la producción de iones de amonio, aeróbicamente/microaeróbicamente sin acumulación de nitrito extracelular; en contraparte la reducción de nitrato o desnitrificación se produce a través de nitrato periplásmico o nitrito reductasa, óxido nítrico o la reductasa de óxido nitroso, con N₂ como producto final (Cassán y col., 2015).

La prueba Ureasa es universalmente positivo para el género *Azospirillum* (Staley y col., 1984). La degradación del compuesto urea, disponible en forma de materia orgánica o en la orina de algunos animales, obtiene como producto amoníaco (Carrera, 2012). El amoníaco es un elemento precursor en el ciclo del nitrógeno para la formación de productos como amonio y nitrato, que son fácilmente absorbidos por las plantas y aprovechados en su crecimiento; Las cepas de *Azospirillum* podrían aportar, indirectamente, a la promoción del crecimiento vegetal, dependiendo de la urea residual presente en los suelos (Carrera, 2012).

REFERENCIAS

1. Carrera, A. 2012. Caracterización Bioquímica, Molecular y Funcional del Banco de cepa de *Azospirillum* spp. del INIAP aisladas de la rizósfera del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) de la Sierra Ecuatoriana. Trabajo de Grado para el Título de Ingeniero en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí, Ecuador. 136 p.
2. Cassán, F., Okon, Y., Creus, C. 2015. Handbook for *Azospirillum*. Technical Issues and Protocols. Springer International. Switzerland.
3. Chapple C. 1998. Molecular-Genetic Analysis of Plant Cytochrome P450 monooxygenases. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49**: 311-343.

4. Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J., Williams, S. 1994. *Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology*. Novena edición. Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 39-56pp
5. MacFaddin, J. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3era edición. Editorial medica panamericana. Buenos Aires, Argentina.
6. Staley, J., Boone, D., De Vos, P., Garrity, G., Goodfellow, M., Krieg, N., Rainey, F., y col. 1984. *Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology*. Volumen 2: The Proteobacteria (Parte C, The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). Editado por Don Brenner, Noel Krieg y James Staley (2005). Baltimore, USA. 94-104pp.
7. Okon, Y. 1994. *AZOSPIRILLUM/PLANT ASSOCIATIONS*. CRC Press, Inc. United States of America. 167p.
8. Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., García, J. 2005. *Bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica. p. 63.