



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación de bacterias fijadoras de  
nitrógeno asociadas al tracto digestivo de  
*Dendroctonus* spp.**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN (Tesis)

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA

OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO

P R E S E N T A:

**JAIRO EDER GUERRA CAMACHO**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. CÉSAR HUGO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**



MÉXICO, D. F.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología General, del Departamento de Microbiología, de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. César Hugo Hernández Rodríguez.

**Este trabajo contó con los apoyos de los siguientes proyectos: Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno provenientes de ambientes carentes del elemento, SIP 20121495; El nicho ecológico de bacterias del tracto digestivo de insectos descortezadores y rizosfera de plantas pioneras, SIP 20111068; Diversidad de bacterias y genes del ciclo del nitrógeno en la rizosfera de plantas metalofitas y tracto digestivo de insectos descortezadores, SIP 20100430.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, que siempre me ha apoyado en todas mis metas; por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional. A mi padre que me enseñó el valor del trabajo duro y la perseverancia. A mi madre que me ha enseñado a nunca dejarme vencer por los obstáculos por más difíciles que estos sean. A mis hermanos, que nunca me han dejado solo.

Al Dr. César y al Dr. Jesús (Chucho) por ser mis mentores, amigos y compañeros. Por encaminarme, guiarme y mostrarme lo bello que es el generar conocimientos.

A los sinodales: Dra. Graciela Castro Escarpulli, Dra. Lourdes Villa Tanaca, Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya, por su apoyo y consejos.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, por ser profesores, amigos y confidentes. Y en general a todos mis amigos porque de cada uno de ellos he recibido ayuda, conocimientos y muchos días agradables, por el vínculo que se ha creado, donde todos somos cómplices en la realización de nuestras metas.

Al Dr. Gerardo Zúñiga por proporcionarnos el material biológico necesario para poder realizar este trabajo.

A la Dra. Esperanza Martínez Romero, por permitirnos realizar las pruebas de fijación de nitrógeno en su laboratorio.

# ÍNDICE

Índice de figuras.....	iii
Índice de cuadros.....	iv
RESUMEN.....	v
1.Introducción .....	1
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Fijación de nitrógeno.....	2
1.3 Simbiosis.....	4
1.4 Simbiosis con los insectos.....	4
1.5 Fijación de nitrógeno en insectos.....	5
1.6 Generalidades de <i>Dendroctonus</i> spp.....	6
1.6.1 <i>Dendroctonus valens</i> LeConte.....	8
1.6.2 <i>Dendroctonus rhizophagus</i> Thomas y Bright.....	8
1.6.3 Fijación de nitrógeno en <i>Dendroctonus valens</i> y <i>Dendroctonus rhizophagus</i> .....	9
2.Justificación .....	10
3.Objetivos.....	12
3.1 Objetivo general .....	13
3.2 Objetivos particulares.....	13
4.Métodología.....	14
4.1 Diagrama general de trabajo .....	15
4.2 Colecta de insectos.....	16
4.3 Disección y obtención del tracto digestivo de los insectos.....	16
4.4 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	16
4.5 Aislamiento de bacterias diazótrofes.....	17
4.6 Selección de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	17
4.7 Extracción de DNA genómico.....	17
4.8 Identificación molecular mediante el análisis del gen <i>16S rRNA</i> .....	17
4.9 Amplificación de los genes <i>nif</i> .....	18
4.10 Purificación y secuenciación de los productos de PCR .....	20
4.11 Análisis de las secuencias obtenidas.....	20
4.12 Actividad de la nitrogenasa.....	20
5.Resultados.....	22
5.1 Aislamiento e identificación de bacterias capaces de crecer en medio sin fuente de nitrógeno.....	23
5.1.1 Enriquecimiento de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno.....	23

5.1.2 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno.....	23
5.1.3 Extracción del DNA cromosómico de los aislados bacterianos.....	26
5.1.4 Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> .....	26
5.1.5 Relación filogenética.....	28
5.2 Amplificación y análisis de los genes <i>nifD</i> y <i>nifH</i> .....	31
5.3 Ensayo de reducción de acetileno (ARA).....	32
6.Discusión.....	33
7.Conclusiones.....	38
8.Prospectivas.....	40
9.Bibliografía.....	42

## Índice de Figuras.

<b>Figura 1.</b> Esquema general de trabajo. ....	15
<b>Figura 2.</b> Electroforesis del DNA cromosómico de las bacterias aisladas del canal alimentario de <i>Dendroctonus valens</i> .....	26
<b>Figura 3.</b> Electroforesis del DNA cromosómico de las bacterias aisladas del canal alimentario de <i>Dendroctonus rhizophagus</i> .....	26
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen <i>16S rRNA</i> de las bacterias aisladas del enriquecimiento en medio Bridges modificado de los microorganismos tracto digestivo de <i>D. valens</i> . ....	27
<b>Figura 5.</b> Electroforesis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen <i>16S rRNA</i> de las bacterias aisladas del enriquecimiento en medio Bridges modificado de los microorganismos tracto digestivo de <i>D. rhizophagus</i> . ....	27
<b>Figura 6.</b> Árbol filogenético por Neighbor Joining del gen <i>16S rRNA</i> de los aislados bacterianos del canal alimentario de <i>D. valens</i> y <i>D. rhizophagus</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Electroforesis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen <i>nifD</i> de los diazótrofos aislados de <i>D. rhizophagus</i> .....	31
<b>Figura 8.</b> Actividad de reducción del acetileno de <i>Paenibacillus timonensis</i> (DrH2V 4A), en el medio WATC4.....	32

## Índice de Cuadros.

<b>Cuadro 1</b> Mezcla de reacción de la PCR para la amplificación del gen 16S rRNA. ....	18
<b>Cuadro 2.</b> Condiciones de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA. ....	18
<b>Cuadro 3.</b> Iniciadores empleados para la amplificación de los genes <i>nifD</i> y <i>nifH</i> .....	19
<b>Cuadro 4.</b> Mezcla de reactivos de la PCR para la amplificación de los genes <i>nifD</i> y <i>nifH</i> .....	19
<b>Cuadro 5.</b> Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes <i>nifD</i> y <i>nifH</i> .....	19
<b>Cuadro 6</b> Número de aislados con morfotipos diferentes encontrados en los tractos digestivos de insectos macho y hembra en ambas especies de <i>Dendroctonus</i> . ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Cuadro 7.</b> Morfotipo colonial y microscópico de los posibles diazótrofos del tracto digestivo de <i>D. valens</i> .....	24
<b>Cuadro 8.</b> Morfotipo colonial y microscópico de los posibles diazótrofos del tracto digestivo de <i>D. rhizophagus</i> .....	25
<b>Cuadro 9.</b> Bacterias diazótroficas asociadas al canal alimentario de <i>D. valens</i> .....	28
<b>Cuadro 10.</b> Bacterias diazótroficas asociadas al canal alimentario de <i>D. rhizophagus</i> .....	29
<b>Cuadro 11.</b> Amplificación y análisis del gen <i>nifD</i> amplificado .....	31

## RESUMEN

El papel de los microorganismos del tracto digestivo de insectos es poco conocido. Sin embargo, entre otras funciones, se sabe que pueden ayudar a la digestión de nutrientes. Los escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus*, son de importancia ecológica debido a los daños que como una plaga provocan a los árboles que coloniza. Los escarabajos llevan a cabo la mayoría de su ciclo de vida en el floema de los árboles, un alimento con una muy baja concentración de nitrógeno, por lo que la asimilación de este macroelemento a través de bacterias simbióticas es importante para su desarrollo. La fijación de nitrógeno es un proceso que llevan a cabo exclusivamente los procariotes. En este trabajo se aislaron e identificaron bacterias diazotróficas a partir del tracto digestivo de *Dendroctonus valens* y *Dendroctonus rhizophagus*. Ejemplares de ambos insectos fueron colectados en diferentes localidades, se obtuvo el tracto digestivo y se hicieron cultivos de enriquecimiento en un medio líquido sin fuente de nitrógeno. Después de cuatro pases en el medio, se aislaron varias cepas con morfotipos coloniales diferentes en el mismo medio sólido. Posteriormente, a las cepas se les extrajo el DNA, se amplificó y secuenció el gen *16S rRNA*, lo que permitió la identificación por aproximación filogenética. Asimismo, fragmentos de los genes *nifD* y *nifH* se amplificaron, se secuenciaron y se buscó su similitud filogenética. La prueba de reducción del acetileno se realizó con cultivos de las cepas de 24 h de crecimiento. Se aislaron 21 cepas del tracto digestivo de *Dendroctonus* spp., las cuales se identificaron como *Pseudomonas* sp., *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Paenibacillus timonensis*. Por otro lado, se amplificó el gen *nifD* de *Paenibacillus timonensis* y *Rahnella aquatilis*. El fragmento del gen *nifD* de *P. timonensis* se relacionó filogenéticamente con *Paenibacillus graminis*. *P. timonensis* fue capaz de reducir el acetileno en el medio WATC4 con una capacidad de 6.74 nmoles de etileno/h. En conclusión se aislaron e identificaron 5 especies de bacterias potencialmente diazotróficas a partir del tracto digestivo de *D. valens* y *D. rhizophagus*. Las 5 cepas fueron capaces de crecer en un medio sólido sin fuente de nitrógeno. Los genes *nifD* de *P. timonensis* y *R. aquatilis* fueron amplificados, pero la actividad de reducción del acetileno sólo pudo ser demostrada en *P. timonensis*.



# **1.Introducción**

## 1.1 Generalidades.

Los microorganismos requieren de fuentes de energía, carbono y nitrógeno, entre otras, para vivir y proliferar en su entorno. Este hecho tiene como consecuencia que los microorganismos jueguen un papel activo en el desarrollo de los ciclos biogeoquímicos y flujo de energía. Las actividades metabólicas de los microorganismos movilizan los elementos como el carbono y el nitrógeno, modificando el estado físico de oxidación y la naturaleza orgánica e inorgánica de los elementos que constituyen a los organismos vivos (Russell *et al.*, 2009).

Recientemente ha tomado especial interés elucidar los nichos que ocupan los microorganismos en los ecosistemas y las transformaciones que realizan de los elementos y nutrientes (Colloff *et al.*, 2008).

## 1.2 Fijación de nitrógeno

El nitrógeno constituye aproximadamente el 78% de la composición de gases de la atmósfera de la tierra. Sin embargo, es un recurso limitante para muchos de los organismos del planeta debido a que el nitrógeno asimilable o que puede ser metabolizado es escaso (Mattson, 1980).

La fijación del nitrógeno atmosférico molecular ( $N_2$ ) es el proceso biogeoquímico que permite la reducción de este elemento para formar amonio ( $NH_3$ ). Varios procesos abióticos pueden producirlo, pero la fijación biológica es más relevante por la magnitud del aporte de amonio a la biosfera (Coty, 1967).

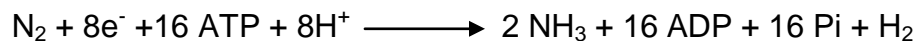
La fijación biológica de nitrógeno es una reacción catalizada por el complejo enzimático de la nitrogenasa, el cual consta de dos componentes, la dinitrogenasa y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa, también denominada proteína hierro-molibdeno, es un heterotetrámero  $\alpha_2\beta_2$ , donde la subunidad  $\alpha$  es codificada por el gen *nifD* y la subunidad  $\beta$  es el producto del gen *nifK*. La subunidad  $\alpha$  contiene el sitio activo donde se lleva a cabo la reducción del nitrógeno, el cual se conoce como cofactor Fe - Mo. La dinitrogenasa reductasa es un homodímero  $\gamma_2$  que está codificado por el gen *nifH* unido entre las subunidades. La proteína

dinitrogenasa reductasa se encarga de transferir electrones a la dinitrogenasa (Igarashi y Seefeldt, 2003).

Hasta el momento, tres sistemas de nitrogenasa diferentes se han descrito: *Nif*, *Vnf* y *Anf*. Posiblemente, un cuarto sistema de nitrogenasa insensible al O<sub>2</sub> haya sido descrito en *Streptomyces thermoautotrophicus*, aunque la reacción catalizada por esta enzima es similar a las nitrogenasas previamente caracterizadas, la enzima es más eficiente dado que requiere cuatro veces menos ATP que las nitrogenasas convencionales (Ribbe *et al.*, 1997). Las nitrogenasas “convencionales” tienen molibdeno en el centro Fe - S y son codificadas por los genes *nif*, mientras que las nitrogenasas “alternativas” codificadas por los genes *vnf* y *anf* tienen vanadio, o hierro respectivamente, y su síntesis se induce en condiciones de baja disponibilidad de molibdeno (Fallik *et al.*, 1991).

La presencia de nitrogenasas alternativas sugiere una ventaja competitiva debido a que en los nichos ecológicos se excluyen a microorganismos que carecen de nitrogenasas Mo independientes (Betancourt *et al.*, 2008).

El requerimiento energético en el proceso de fijación de nitrógeno es muy elevado, por tanto, la síntesis y actividad de la nitrogenasa está altamente regulada, es decir se expresa sólo cuando no existe nitrógeno orgánico o inorgánico asimilables en el medio.



La nitrogenasa tiene una especificidad baja por su sustrato y es sensible al oxígeno. La regulación transcripcional de las nitrogenasas ocurre en respuesta al nitrógeno disponible. Como se menciona antes, esta actividad, costosa en términos energéticos, sólo ocurre cuando la fuente de nitrógeno asimilable, como el amonio, los nitratos o los aminoácidos, es escasa. Claramente, los microorganismos diazotróficos mantienen una clara ventaja competitiva y adaptativa en ambientes limitados de nitrógeno.

La presencia de oxígeno es la principal limitante para la fijación de nitrógeno, no obstante algunos microorganismos fijadores tienen adaptaciones morfológicas y fisiológicas, o viven en hábitats protegidos con moderados o bajos potenciales de óxido-reducción, o han establecido endosimbiosis con otros organismos que los protegen del oxígeno aunque el huésped viva en un entorno aerobio (Zehr *et al.*, 2003).

### **1.3 Simbiosis**

Actualmente, existe la tendencia a considerar que el patrimonio genético de un organismo es la suma de su propio genoma más el de sus simbioses. Ningún organismo es capaz de sobrevivir sin sus simbioses, de hecho se considera que hay muchos más genes en los microsimbioses que en el organismo que los alberga. Por estos motivos, recientemente se han hecho esfuerzos por entender las contribuciones que a la simbiosis ofrecen los simbioses microbianos de plantas y animales (Russell *et al.*, 2009).

Las relaciones entre organismos de distintas especies o simbiosis, tienen implicaciones importantes en su historia evolutiva y pueden conferir ventajas en la adaptación a un ambiente determinado y en la competitividad. Dentro de estas relaciones definidas con base a que los participantes mantienen una vida juntos, pueden reconocerse diversas consecuencias de beneficio-daño como producto de la propia interacción (Odum, 1988). Desde esta perspectiva, los animales pueden ser vistos como comunidades complejas compuestas de un tipo celular eucariótico multicelular y un arreglo de especies microbianas (Ruby y McFall-Ngai, 1999).

### **1.4 Simbiosis con los insectos**

Algunos insectos han cultivado una relación íntima con microorganismos mutualistas desde las primeras etapas de aparición del grupo taxonómico y se estableció debido a que estos insectos viven con dietas consideradas subóptimas, debido a que su fuente primaria de nutrientes es pobre en muchos requerimientos básicos, especialmente la fuente de nitrógeno y vitaminas, y a que la fuente de

carbono es de difícil asimilación, lo cual se puede ver reflejado en la gran y variada comunidad microbiana que habita en su intestino (Dillon y Dillon, 2004).

Los microorganismos contribuyen al desarrollo y supervivencia de los insectos, en ambientes hostiles suplementando nutrientes escasos en la fuente de alimento. Además, pueden contribuir al metabolismo e inactivación de toxinas y a la protección contra los enemigos naturales de los insectos (Geib *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2008).

Los microorganismos simbióticos son ubicuos en el cuerpo de los insectos, algunos de ellos poseen una distribución restringida a órganos especializados, mientras que otros se localizan en una gran variedad de tejidos (Nardi *et al.*, 2002). El intestino de los insectos ofrece un ambiente en el cual los microorganismos simbióticos establecen poblaciones estables y adquieren sustratos que les proveen energía, contribuyen en la reproducción, digestión, nutrición y producción de feromonas para los insectos (Ishikawa, 2003; Brand *et al.*, 1975; Buchner, 1965; Campbell, 1989).

### **1.5 Fijación de nitrógeno en insectos**

El nitrógeno es el elemento de mayor demanda para los organismos al poseer un papel central en todos los procesos metabólicos, la estructura celular y la síntesis de proteínas; además, constituye aproximadamente el 12% del peso seco de una célula. La disponibilidad del nitrógeno combinado es un factor limitante para la producción primaria en los ecosistemas debido a que se encuentra muy diluido en el agua o escasea en el suelo (Mattson 1980).

La amplificación de los genes *nifD* y *nifH*, los ensayos de reducción de acetileno, la incorporación de N<sup>15</sup> a las proteínas de los insectos, entre otras técnicas, se utilizan para poner en evidencia la participación de los procariotes en el enriquecimiento de la dieta de los insectos con compuestos nitrogenados (Kuranouchi *et al.*, 2006; Pinto-Tomas *et al.*, 2009).

La participación de los microorganismos en la fijación de nitrógeno en beneficio de sus simbioses se demostró en diferentes linajes de insectos. En las termitas *Reticulitermes speratus* se reportaron cepas fijadoras de nitrógeno de las especies *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans* y *Desulfovibrio* spp. (Benemann, 1973; Breznak *et al.*, 1973, Noda *et al.*, 1999, Ohkuma *et al.*, 1999), así como en la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*, donde se describió la presencia de *Klebsiella* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. y *Pectobacterium* spp. (Behar *et al.*, 2005).

También, en *Dendroctonus terebrans* se identificó fenotípicamente la bacteria fijadora de nitrógeno *Enterobacter agglomerans* (actualmente *Pantoea agglomerans*) (Bridges *et al.*, 1981).

### **1.6 Generalidades de *Dendroctonus* spp.**

El orden Coleóptera agrupa más de 300,000 especies de escarabajos, integradas en aproximadamente 150 familias. La familia Curculionidae; es la más basal y diversa dentro del orden, en ella destaca la subfamilia Scolytinae integrada por 185 géneros, siendo uno de los más importantes el género *Dendroctonus* (Wood, 1982).

En particular, los insectos del género *Dendroctonus* (Coleoptera: Scolytinae) se alimentan del floema de las coníferas. Este tejido es un sustrato rico en celulosa y carbohidratos solubles, pero con una escasa presencia de nitrógeno asimilable (Thornber *et al.*, 1961; Warren *et al.*, 2002).

Las especies de *Dendroctonus* atacan e infestan coníferas (*Pinaceae*) de los géneros *Larix*, *Picea*, *Pinus*, y *Pseudotsuga*. Las especies dentro del género se pueden identificar por la especie del hospedero al que atacan, sus características morfológicas y su distribución geográfica (Capinera *et al.*, 2008). Entre los caracteres morfológicos internos y externos empleados destacan: los órganos genitales externos de los machos, el color del cuerpo de los adultos maduros, características de antenas y pronoto, así como las vestiduras del declive elitral. La

especie más pequeña dentro de este género es *Dendroctonus frontalis* y el más grande es *Dendroctonus valens* (Capinera *et. al.*, 2008).

En México se encuentran 11 especies de este género, algunas de las cuales pueden, bajo determinadas circunstancias, convertirse en las plagas que más afectan económica y ecológicamente a los bosques del noroeste de América (Cibrían *et al.*, 2000).

El ciclo de vida del género *Dendroctonus* consta de tres fases: colonización, producción de descendencia y dispersión.

Los escarabajos *Dendroctonus* son monógamos y pasan la mayoría de su ciclo de vida en un hábitat críptico debajo de la corteza, específicamente en el floema. Solamente durante un breve periodo están fuera del árbol, esto es mientras se trasladan de un árbol a otro. La mayoría de las especies de este género son capaces de matar al árbol que hospedan en una sola generación. También muchas de las especies son capaces de matar a árboles grandes y vigorosos, aunque algunas especies llamadas secundarias, colonizan árboles recientemente caídos o tocones. Después de atacar su nuevo hospedero, ocurre el apareamiento debajo de la corteza y se empieza a formar una nueva galería donde se depositan los huevos. Los huevos son establecidos en grupos o de forma individual a lo largo de las paredes de la galería. Las galerías de los huevos pueden ser en forma vertical o sinuosas y las larvas que se generan se alimentan del floema de los árboles, individualmente o en agrupaciones. La transformación a pupa tiene lugar en nichos dentro del floema o en la corteza exterior del árbol hospedero. Tras el surgimiento de los adultos, el escarabajo migra o se dispersa a un nuevo árbol hospedero y el ciclo comienza de nuevo (Capinera *et. al.*, 2008).

El tracto digestivo de *Dendroctonus* consiste en estomodeo, mesenterón y proctodeo. El mesenterón se divide en dos regiones: la anterior que es corta, ancha y ovoide, y la posterior que es larga y estrecha; el proctodeo es largo, estrecho y termina en el ano. Todas estas regiones se encuentran claramente diferenciadas morfológica e histológicamente (Díaz *et al.*, 1998 y 2003).

La duración del ciclo de vida de este género es variable y dependerá de la especie, latitud, elevación y el microclima de la región. Especies que se encuentran en el sur pueden tener hasta siete generaciones por año, mientras que las especies que se encuentran al Norte requieren más de tres años para completar una sola generación (Capinera *et al.*, 2008).

#### **1.6.1 *Dendroctonus valens* LeConte**

El escarabajo rojo de trementina, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), se encuentra a través de Norte y Centroamérica. Es un descortezador secundario con una amplia distribución geográfica, que va desde Norteamérica (Canadá) hasta Centroamérica (Honduras). Habita en los tocones y la porción basal de los árboles y puede presentar hasta dos generaciones por año. Los adultos de esta especie tienen un cuerpo cilíndrico, de color rojo claro a oscuro, miden de 5.7 a 10 mm de longitud, con una media de 7.3 mm. En cuanto a su árbol hospedero, se le considera una especie generalista, ya que parasita a más de 40 especies del género *Pinus* (Cibrián *et al.*, 2000; Symonds y Elgar, 2004).

Esta especie es un parásito, que vive principalmente en los árboles vivos, sin causar mortalidad. Se trata de vez en cuando de una plaga secundaria, matando a los árboles infestados por otros escarabajos descortezadores o dañados por el fuego. Recientemente, esta especie fue importada a China desde América del Norte (Cognato *et al.*, 2005) y está causando graves daños a bosques de *Pinus tabuliformis*. (Miao *et al.*, 2001; Yan 2005)

#### **1.6.2 *Dendroctonus rhizophagus* Thomas y Bright**

Es un descortezador generalista, primario y endémico de México. Se caracteriza por colonizar al renuevo de varias especies de *Pinus* siendo la especie más afectada *Pinus engelmannii* con un porcentaje de ataque del 44% (Salinas-Moreno *et al.*, 2010). Los escarabajos adultos de esta especie poseen un cuerpo cilíndrico, de color rojo oscuro, con la cabeza y el pronoto más oscuro, miden de 6 a 8.2 mm,



con una media de 7.1 mm. Tiene una distribución restringida al Norte de México, principalmente en los estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (Thomas y Bright, 1970; Cibrián *et al.*, 2000).

### **1.6.3 Fijación de nitrógeno en *Dendroctonus valens* y *Dendroctonus rhizophagus***

En recientes trabajos se ha logrado demostrar la fijación de nitrógeno en larvas vivas e insectos adultos de *Dendroctonus valens*, mientras que no se encontró esta actividad en larvas e insectos adultos muertos. También se logró amplificar un fragmento del gen *nifD* bacteriano a partir de DNA metagenómico en las diferentes regiones intestinales del insecto. *Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea cedenensis* y *P. dispersa* fueron aisladas en un medio libre de nitrógeno. Aunque se observó claramente un crecimiento visible de estas bacterias, no se pudo demostrar su actividad de la nitrogenasa *in vitro* (Morales-Jiménez *et al.*, 2009).

Asimismo, *Raoultella terrigena*, una bacteria diazótropa se aisló del intestino de *Dendroctonus rhizophagus* y *D. valens*, además exhibió una alta actividad de reducción de acetileno *in vitro* con diferentes fuentes de carbono, y sus genes *nifH* y *nifD* fueron secuenciados y relacionados filogenéticamente con los ortólogos de *Klebsiella pneumoniae* (Morales-Jiménez *et al.*, 2013).

## **2. Justificación**

Los insectos del género *Dendroctonus* son un conjunto de especies descortezadoras de importancia ecológica y económica, debido a los daños provocados a los árboles que coloniza, lo que tiene como consecuencia obvia la disminución de la superficie forestal, ya que los árboles infestados no crecen adecuadamente y mueren. Estos insectos se alimentan del floema del árbol, encontrándose bajo cierto estrés provocado por la baja disponibilidad de nutrientes, sin embargo mantienen una asociación con microorganismos simbióticos los cuales le ayudan a la obtención de estos nutrientes mediante la descomposición de compuestos de difícil degradación.

Por otro lado, la disponibilidad de nitrógeno combinado es también un factor limitante para la supervivencia de los insectos, por lo que la asimilación a través de bacterias es de importancia para su desarrollo, considerando la fijación de nitrógeno atmosférico como un proceso que proveen de este elemento disponible al escarabajo. Existen varios trabajos que describen a las bacterias asociadas a este insecto, sin embargo son escasos los análisis del papel específico que juegan en esta simbiosis.

Por estos motivos, consideramos relevante explorar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico de la microbiota asociada al canal alimentario de dos especies del género *Dendroctonus* de importancia en México.

# 3.Objetivos

### **3.1 Objetivo general**

Identificar a las bacterias potencialmente implicadas en el proceso de fijación de nitrógeno del tracto digestivo de *Dendroctonus valens* y *Dendroctonus rhizophagus*.

### **3.2 Objetivos particulares**

- Aislar microorganismos capaces de crecer en un medio de cultivo sin fuente de nitrógeno, a partir del tracto digestivo de *Dendroctonus valens* y *Dendroctonus rhizophagus*.
- Identificar a las bacterias aisladas mediante la secuencia de sus genes *16S rRNA*.
- Explorar por métodos moleculares el potencial de fijación de nitrógeno de las bacterias cultivables.

# 4. Metodología

#### 4.1 Diagrama general de trabajo

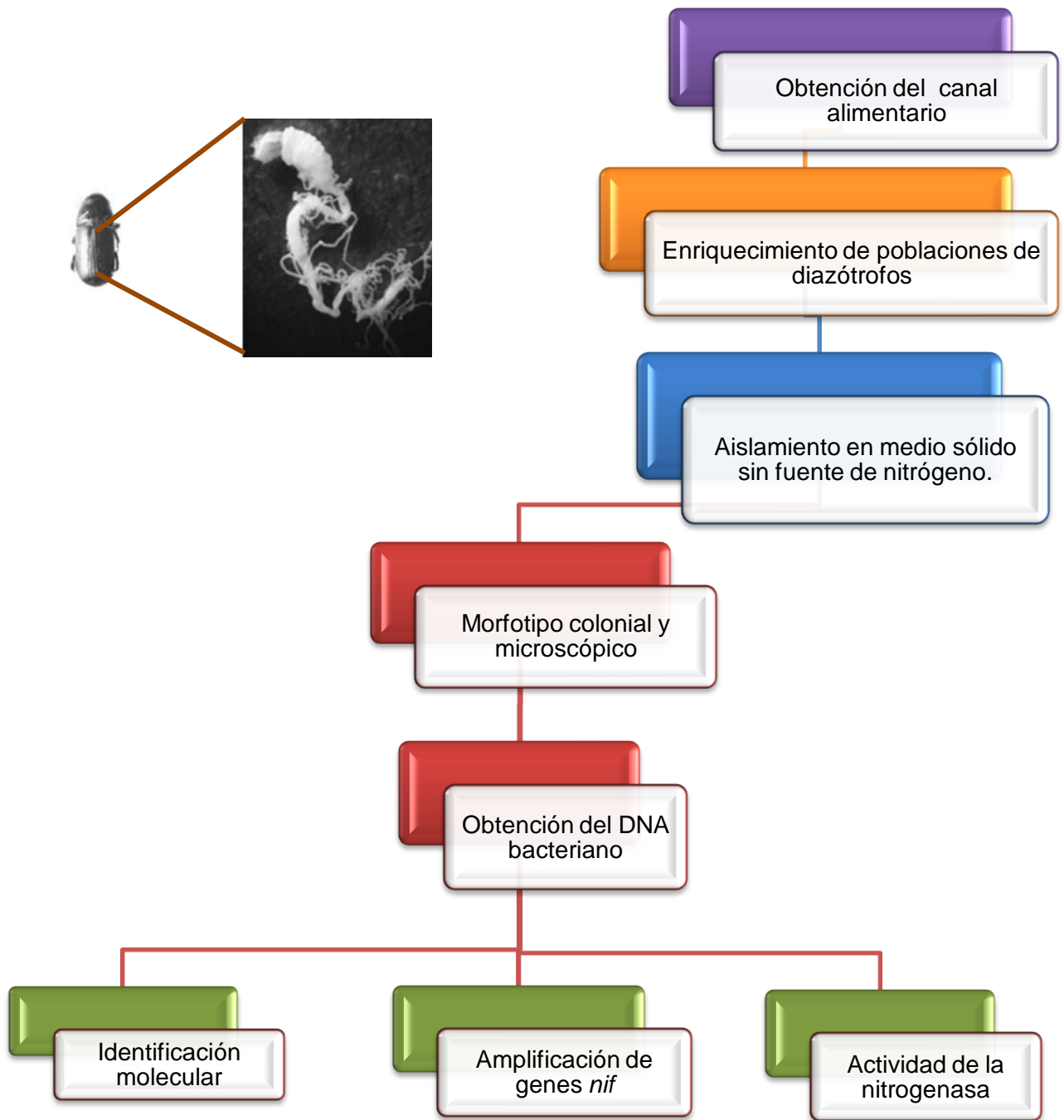


Figura 1. Esquema general de trabajo.

## **4.2 Colecta de insectos**

Los insectos que se utilizaron en este trabajo fueron donados por el Dr. Gerardo Zúñiga, quien nos proporcionó ejemplares de insectos macho y hembra de los géneros *Dendroctonus valens* y *Dendroctonus rhizophagus* provenientes de bosques de pinos del Estado de México y Durango. Los escarabajos se extrajeron de las galerías formadas en el floema de árboles infestados y se colocaron en recipientes de plástico, con papel húmedo, debidamente etiquetados para transportarlos a 4 °C al laboratorio.

## **4.3 Disección y obtención del tracto digestivo de los insectos**

Una vez llegados al laboratorio, los escarabajos se desinfestaron superficialmente con etanol al 70% y se lavaron con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas. Posteriormente, se colocaron en una caja Petri con solución salina al 0.85% y se realizó la disección quitando los élitros y las alas, se cortó la parte abdominal y se extrajo el tubo digestivo separándolo del cuerpo grasoso.

## **4.4 Enriquecimiento de poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno**

Los tubos digestivos completos de cada insecto, se pasaron a microtubos estériles con 1 mL de agua destilada, donde se maceraron suavemente con ayuda de un pistilo. Para el enriquecimiento de las bacterias diazótroficas, un tubo con cada tracto digestivo se inoculó en tubos con 10 mL de medio líquido de Bridges modificado. Este medio tiene la siguiente composición por litro:  $K_2HPO_4$  (6.3 g),  $NaH_2PO_4$  (1.9 g),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.1 g),  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  (0.008 g),  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.008 g), tioglicolato de sodio (0.5 g), extracto de levadura (0.2 g) y glucosa (10 g) (Bridges, 1981). Los tubos inoculados se incubaron a 28 °C y sin agitación. El crecimiento microbiano se consideró como turbiedad en el medio de cultivo, lo cual requirió en promedio 14 días. Posterior a esto, se realizaron 4 transferencias repetidas en el mismo medio de cultivo líquido, mismas que fueron incubadas aproximadamente 14 días a 28 °C.



#### **4.5 Aislamiento de bacterias diazótroficas**

A partir de los tubos de la cuarta transferencia, se sembraron diluciones del último tubo en medio sólido de Bridges modificado (sin fuente de nitrógeno) y se incubaron entre 5 y 7 días a 28 °C hasta la aparición de colonias visibles. Los cultivos se axenizaron y de cada morfotipo diferente, se describió la morfología colonial y microscópica. Las cepas se conservaron en glicerol al 25% a -70 °C.

#### **4.6 Selección de las posibles bacterias fijadoras de nitrógeno**

Con el propósito de confirmar que los aislamientos recuperados a partir de los enriquecimientos eran capaces de crecer en ausencia de nitrógeno combinado, se realizó la inoculación de cada una de las colonias seleccionadas en el mismo medio líquido libre de N<sub>2</sub> quitando el extracto de levadura de su composición. Se consideraron posibles bacterias fijadoras de nitrógeno aquellas que crecieron después del tercer pase en medio líquido.

#### **4.7 Extracción de DNA genómico**

Se obtuvo el DNA genómico de cada uno de los aislados mediante la técnica descrita por Hoffman y Winston (1987) modificada.

#### **4.8 Identificación molecular mediante el análisis del gen *16S rRNA***

La amplificación del gen 16S rRNA, se realizó utilizando los iniciadores: Derecho 8 (5'-GCG GAT CCG CGG CCG CTG CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') y Reverso 1492 (5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') descritos previamente (Relman, 1993), que amplifican un fragmento aproximado de 1500 pb. La mezcla de reactivos y las condiciones de reacción se muestran en los cuadros 1 y 2 respectivamente.

**Cuadro 1.** Mezcla de reacción de la PCR para la amplificación del gen *16S rRNA*.

Reactivo	Concentración final
DNA	10-100 ng
Regulador	1 X
Oligonucleótidos	3 pM
dNTP's	0.2 mM
Polimerasa	1 U
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
Agua	Hasta 25 µL

**Cuadro 2.** Condiciones de la PCR para la amplificación de un fragmento del gen *16S rRNA*.

Condiciones	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	7	1
Desnaturalización	94	1	
Alineamiento	55	1	35
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	1

Los amplicones se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.9 Amplificación de los genes *nif*

Para la amplificación de los genes *nifH* se utilizaron un conjunto de iniciadores previamente descritos para diversos grupos microbianos, así como un par de iniciadores dirigidos a la secuencia del gen *nifD*, documentados en el cuadro 3, con la mezcla de reacción indicada en el cuadro 4, y bajo las condiciones descritas en el cuadro 5 (Navarro-Noya *et al.*, 2012).

**Cuadro 3.** Iniciadores empleados para la amplificación de los genes *nifD* y *nifH*

Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Fragmento esperado (pb)	Tm (°C)	Referencia
<b>nifHEntero-F</b>	ACACCATTATGGAGATGG	655	63	Navarro-Noya <i>et al.</i> , 2012
<b>nifHEntero-R</b>	GATGCCGAACTCCATCAG			
<b>nifHAzo-F</b>	GACTCCACCCGCCTGATCCT	567	60	
<b>nifHAzo-R</b>	GATCGTATTCGATCACGGTCAT			
<b>nifHRFZ-F</b>	TYGGCAAGTCCACCACC	431	55	
<b>nifHRFZ-R</b>	GCGCCATCATCTCRCCGGA			
<b>nifD-F</b>	CGCGGCTGCGCCTAYGCMGG	1147	64	
<b>nifD-R</b>	GARTGCATCTGRCCGAAMGG			

**Cuadro 4.** Mezcla de reactivos de la PCR para la amplificación de los genes *nifD* y *nifH*

Reactivo	Concentración final
<b>DNA</b>	10-100 ng
<b>Regulador</b>	1 X
<b>Oligonucleótidos</b>	1 pM
<b>dNTP's</b>	0.2 mM
<b>Polimerasa</b>	1 U
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	3 mM
<b>Agua</b>	Hasta 25 µL

**Cuadro 5.** Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes *nifD* y *nifH*

Condiciones	Temp.	Tiempo (min)	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C	7	1
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	1	35
<b>Alineamiento</b>	55-64 °C	1	35
<b>Extensión</b>	72 °C	2.5	35
<b>Extensión final</b>	72 °C	7	1

#### **4.10 Purificación y secuenciación de los productos de PCR**

Los productos de PCR amplificados se purificaron utilizando el kit de reactivos comerciales “DNA Clean & Concentrator<sup>TM</sup>” (Zymo Research), y se comprobó la pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La secuenciación se realizó de manera automatizada, en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems). Esto fue realizado por la Dra. Laura Márquez del Instituto de Biología de la UNAM.

#### **4.11 Análisis de las secuencias obtenidas**

Las secuencias obtenidas se compararon con la librería no redundante del GenBank mediante una búsqueda tipo BLAST (Altschul *et al.*, 1997). El mismo procedimiento se llevó a cabo para conocer la relación filogenética para los genes *nifD* y *nifH*. Una colección de secuencias taxonómicamente relacionadas fueron obtenidas de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Homepagell (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>). Las secuencias de DNA fueron alineadas usando CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997), editadas y confirmadas visualmente en BIOEDIT (Hall, 1999). El programa MODELTEST 3.06 (Posada y Crandall, 1998) fue usado para seleccionar el modelo apropiado de evolución de secuencias.

#### **4.12 Actividad de la nitrogenasa**

La fijación de nitrógeno *in vitro* de las bacterias aisladas se evaluó con ensayos de reducción de acetileno. Los aislados se crecieron en el medio WAT4C el cuál se inoculó con cada uno de los posibles diazótrofos. La cepa 6A3 de *Klebsiella variicola* se usó como testigo positivo y un medio sin inóculo como testigo negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Después de 24 h de incubación a 28 °C se enriqueció con acetileno la atmósfera de los tubos a una concentración final de 1% por reemplazo de un volumen idéntico de aire. La formación de etileno por la actividad de la nitrogenasa se midió por cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama (Varian 3300 Gas

Chromatograph). La cantidad de etileno formado se expresó en nanomoles de etileno ( $C_2H_4$ ) por hora por cultivo.

# 5.Resultados

## 5.1 Aislamiento e identificación de bacterias capaces de crecer en medio sin fuente de nitrógeno

### 5.1.1 Enriquecimiento de las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno

Para obtener a los diazótrofos heterótrofos aerobios se realizaron cultivos de enriquecimiento, inoculando el tracto digestivo de insectos macho y hembra en medio libre de nitrógeno, lo que permitió obtener 34 aislados (cuadro 6).

**Cuadro 6.** Número de aislados con morfotipos diferentes encontrados en los tractos digestivos de insectos macho y hembra en ambas especies de *Dendroctonus*.

<b>Especie</b>	<b>Sexo</b>	<b>Número de aislados</b>
<i>Dendroctonus rizophagus</i>	Macho	10
	Hembra	9
<i>Dendroctonus valens</i>	Macho	8
	Hembra	7
	<b>Total</b>	<b>34</b>

### 5.1.2 Selección de posibles bacterias fijadoras de nitrógeno

Los 34 aislados se sembraron en medio líquido libre de fuente de nitrógeno, de las cuales sólo 21 fueron capaces de crecer después de 3 pases (cuadros 7 y 8).

**Cuadro 7.** Morfotipo colonial y microscópico de los posibles diazótrofos del tracto digestivo de *D. valens*

<b>Cepa*</b>	<b>Morfotipos coloniales**</b>	<b>Morfotipos microscópicos</b>
<b>DvMJ1 1B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 2 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 1Ba</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 2 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 2A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 2B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 4A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 4B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1.5 mm de diámetro.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvMJ1 6B</b>	Redonda, irregular, blanca, brillante, traslúcida, umbonada, de 1 mm de diámetro.	Bacilos Gram negativos
<b>DvHJ1 1A</b>	Redonda, borde entero, incolora, brillante, traslúcida, umbonada, de 2 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos Gram negativos
<b>DvHJ1 1B</b>	Redonda, borde entero, incolora, brillante, traslúcida, umbonada, de 2 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos Gram negativos
<b>DvHJ1 2A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvHJ1 2B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DvHJ1 5B</b>	Redonda, borde entero, incolora, brillante, traslúcida, convexa, de 1 mm de diámetro.	Bacilos Gram negativos
<b>DvHJ1 6A</b>	Redonda, borde irregular, blanca, brillante, traslúcida, umbonada, de 1 mm de diámetro.	Bacilos Gram negativos

\*Claves de los códigos de las cepas: Dv, *D. valens*; H, hembra; M, macho.

\*\*Morfotipos coloniales apreciados en placas de medio Bridges modificado sin fuente de nitrógeno después de 5 días de incubación a 30 °C.



**Cuadro 8.** Morfotipo colonial y microscópico de los posibles diazótrofos del tracto digestivo de *D. rhizophagus*

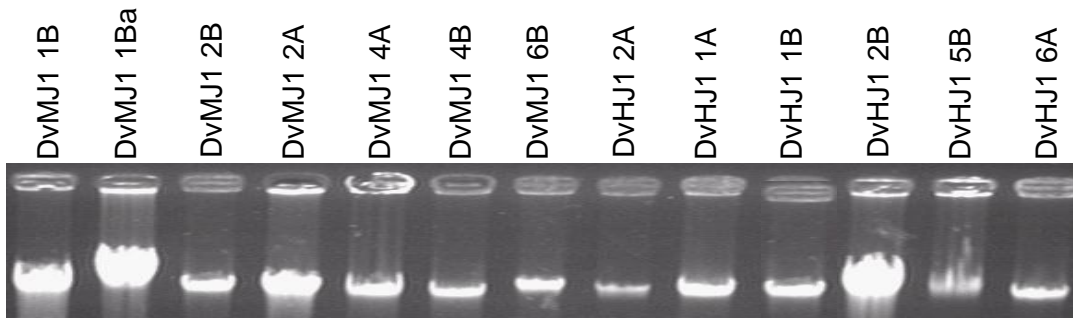
<b>Cepa*</b>	<b>Morfotipos coloniales**</b>	<b>Morfotipos microscópicos</b>
<b>DrM5V 1A</b>	Redonda, borde irregular, blanca, brillante, translúcida, cerebriforme, de 2 mm de diámetro.	Bacilos Gram negativos
<b>DrM5V 1B</b>	Redonda, borde irregular, blanca, brillante, translúcida, cerebriforme, de 2 mm de diámetro.	Bacilos Gram negativos
<b>DrM5V 2A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, translúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DrM5V 2B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, translúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DrM5V 3A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, translúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, con producción de polisacárido.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DrH2V 1A</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, translúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DrH2V 1B</b>	Redonda, borde entero, blanca, brillante, translúcida, convexa, de 1 mm de diámetro, mucoide.	Bacilos cortos Gram negativos
<b>DrH2V 4A</b>	Redonda, borde entero, incolora, brillante, translúcida, >1 mm de diámetro	Bacilos largos Gram positivos esporulados

\*Claves de los códigos de las cepas: Dr, *D. rhizophagus*; H, hembra; M, macho.

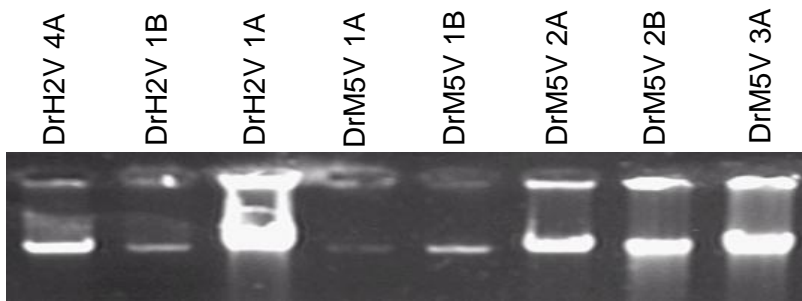
\*\* Morfotipos coloniales apreciados en placas de medio Bridges modificado sin fuente de nitrógeno después de 5 días de incubación a 30 °C.

### 5.1.3 Extracción del DNA cromosómico de los aislados bacterianos

En la figura 2 y 3 se puede observar una banda intensa de aproximadamente 20 Kb que corresponde al DNA total de los aislados del canal alimentario de *D. valens* y *D. rhizophagus*.



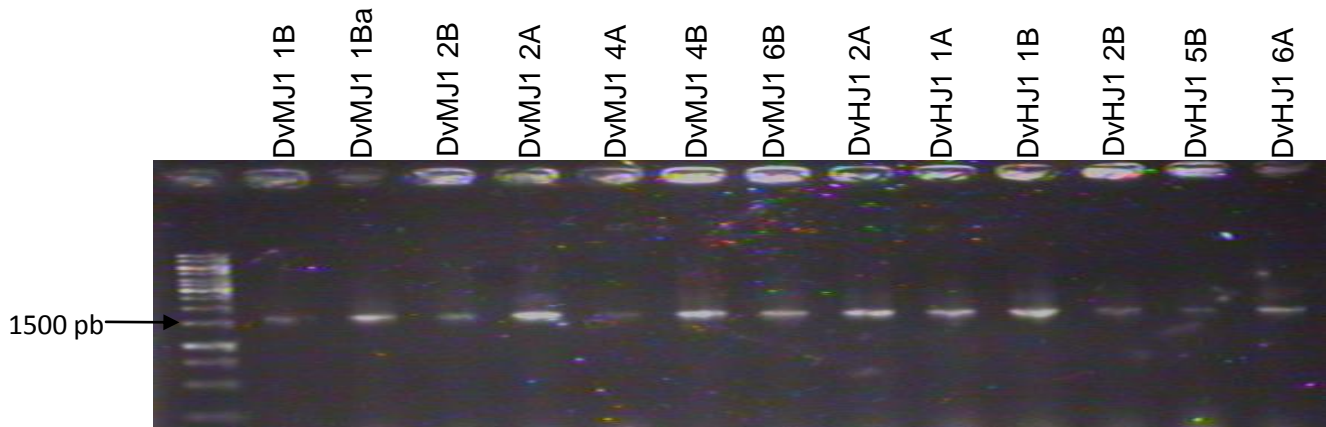
**Figura 2** Electroforesis del DNA cromosómico de las bacterias aisladas del canal alimentario de *Dendroctonus valens*.



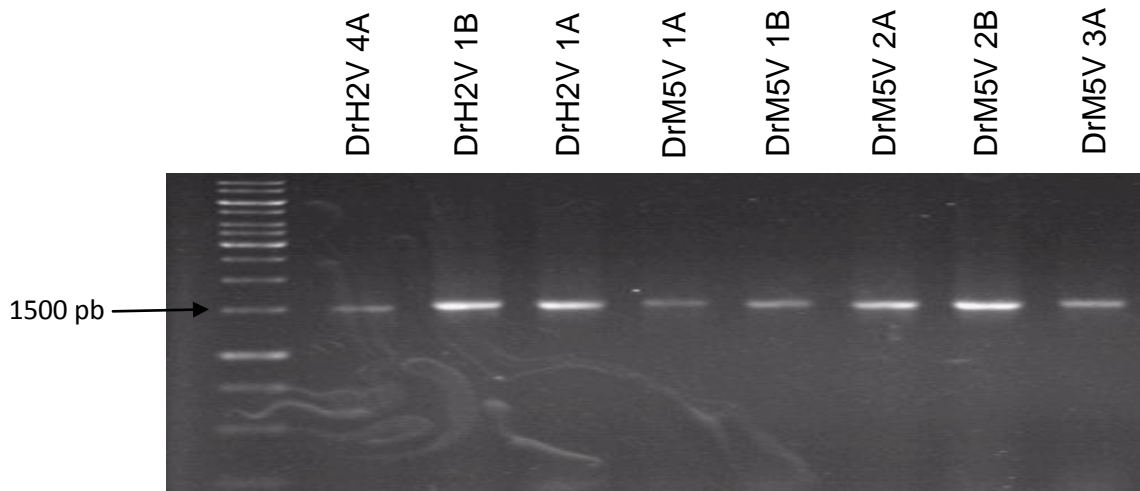
**Figura 3** Electroforesis del DNA cromosómico de las bacterias aisladas del canal alimentario de *Dendroctonus rhizophagus*.

### 5.1.4 Amplificación del gen 16S rRNA

El DNA de cada aislado se usó como molde para la amplificación del gen 16S rRNA. En la figura 4 y 5 se aprecian los amplicones que mostraron una talla aproximada esperada de 1500 pb.



**Figura 4.** Electroforésis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen 16S rRNA de las bacterias aisladas del enriquecimiento en medio Bridges modificado de los microorganismos tracto digestivo de *D. valens*. Carril 1, marcador de talla molecular DNA 1 Kb; carriles 2-9, los amplicones de diferentes cepas.



**Figura 5.** Electroforésis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen 16S rRNA de las bacterias aisladas del enriquecimiento en medio Bridges modificado de los microorganismos tracto digestivo de *D. rhizophagus*. Carril 1, marcador de talla molecular DNA 1 Kb; carriles 2-9, los amplicones de diferentes cepas

### 5.1.5 Relación filogenética

A partir de las secuencias de los genes ribosomales de los aislados del canal alimentario de *Dendroctonus*, se identificaron los siguientes géneros bacterianos: *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans* y *Paenibacillus timonensis*. En los cuadros 9 y 10, se muestra el porcentaje de identidad con la secuencia más próxima en el GenBank a las secuencias de los aislados.

**Cuadro 9.** Bacterias diazótropas asociadas al canal alimentario de *D. valens*.

Cepa	Grupo microbiano	Porcentaje de similitud (%)*
DvMJ1 1B	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
DvMJ1 1Ba	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
DvMJ1 2B	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
DvMJ1 2A	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
DvMJ1 4A	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
DvMJ1 4B	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
DvMJ1 6B	<i>Pseudomonas</i> sp.	98
DvHJ1 1A	<i>Pantoea agglomerans</i>	99
DvHJ1 1B	<i>Pantoea agglomerans</i>	99
DvHJ1 2A	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
DvHJ1 2B	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
DvHJ1 5B	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	96
DvHJ1 6A	<i>Pseudomonas</i> sp.	98

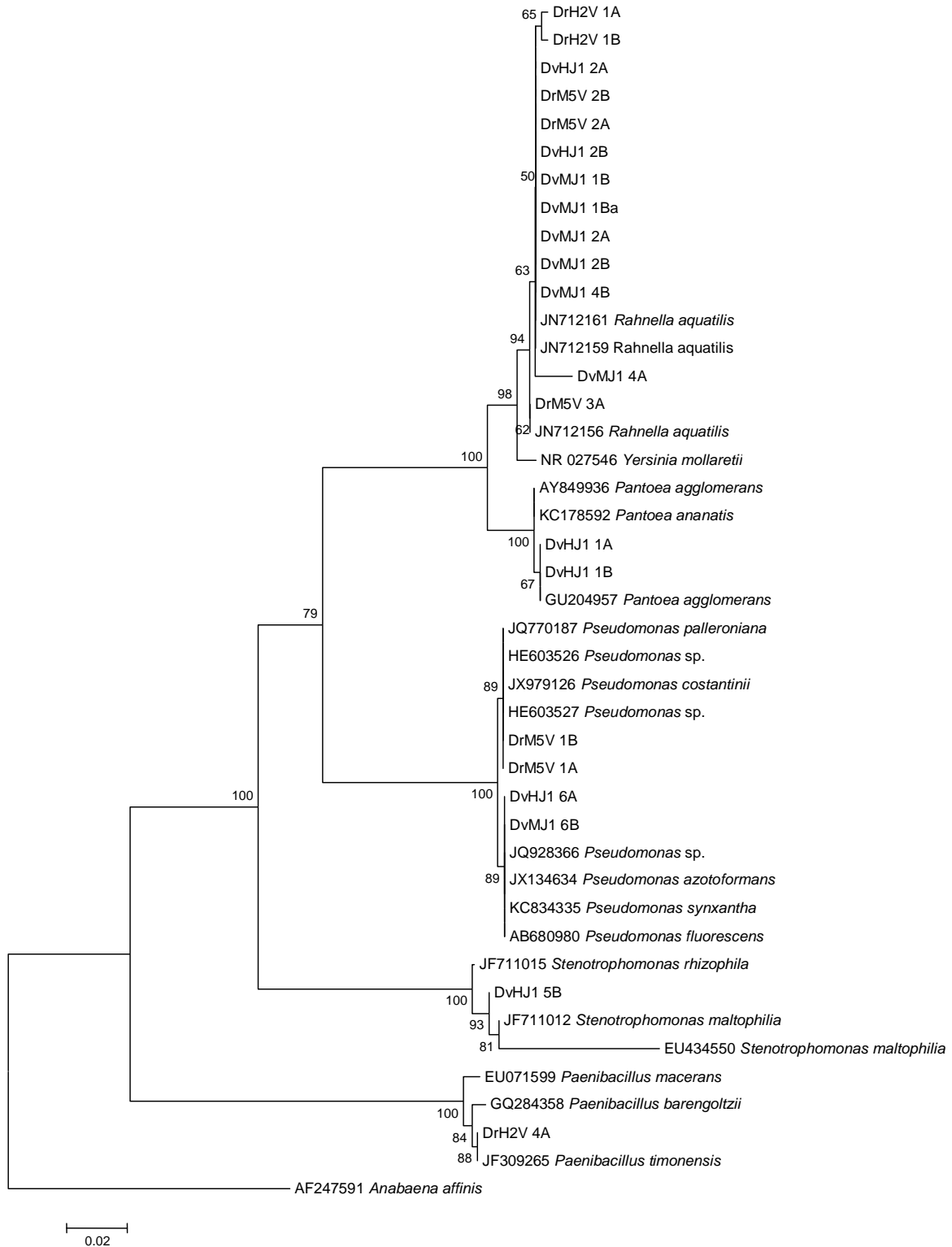
\* El porcentaje de similitud se obtuvo considerando el número de sustituciones nucleotídicas entre las secuencias analizadas dividida entre el total de pares de bases comparadas X 100.

**Cuadro 10.** Bacterias diazótroficas asociadas al canal alimentario de *D. rhizophagus*.

<b>Cepa</b>	<b>Grupo microbiano</b>	<b>Porcentaje de similitud (%)*</b>
<b>DrM5V 1A</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	98
<b>DrM5V 1B</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.	99
<b>DrM5V 2A</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	99
<b>DrM5V 2B</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
<b>DrM5V 3A</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
<b>DrH2V 1A</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	98
<b>DrH2V 1B</b>	<i>Rahnella aquatilis</i>	97
<b>DrH2V 4A</b>	<i>Paenibacillus timonensis</i>	99

\* El porcentaje de similitud se obtuvo considerando el número de sustituciones nucleotídicas entre las secuencias analizadas dividida entre el total de pares de bases comparadas X 100.

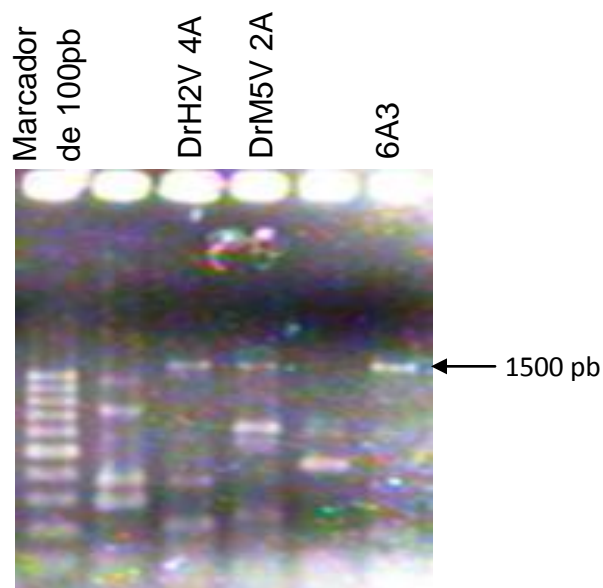
Así mismo en la figura 6 se muestra la topología del árbol obtenido por Neighbor Joining del gen *16S rRNA* de los aislados bacterianos del canal alimentario de *D. valens* y *D. rhizophagus*.



**Figura 6.** Árbol filogenético por Neighbor Joining del gen *16S rRNA* de los aislados bacterianos del canal alimentario de *D. valens* y *D. rhizophagus*. Se seleccionó el modelo de Jukes-Cantor para la búsqueda del árbol. En los nodos se muestran los valores de bootstrap  $\geq 50\%$ . La barra representa el 2% de cambios entre las secuencias. La secuencia del gen *16S rRNA* de *Anabaena affinis* se usó como grupo externo.

## 5.2 Amplificación y análisis de los genes *nifD* y *nifH*

Las cepas de *Paenibacillus timonensis* (DrH2V 4A) y *Rahnella aquatilis* (DrM5V 2A) han sido los únicos aislados a los que se les ha podido identificar el gen canónico *nifD* que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la molibdenoferroproteína dinitrogenasa. La amplificación del gen se muestra en la figura 6.



**Figura 7.** Electroforésis en agarosa al 1% de los amplificados por PCR del gen *nifD* de los diazótrofos aislados de *D. rhizophagus*. *Paenibacillus timonensis* (DrH2V 4A) y *Rahnella aquatilis* (DrM5V 2A) utilizando a *Klebsiella variicola* (6A3) como testigo positivo.

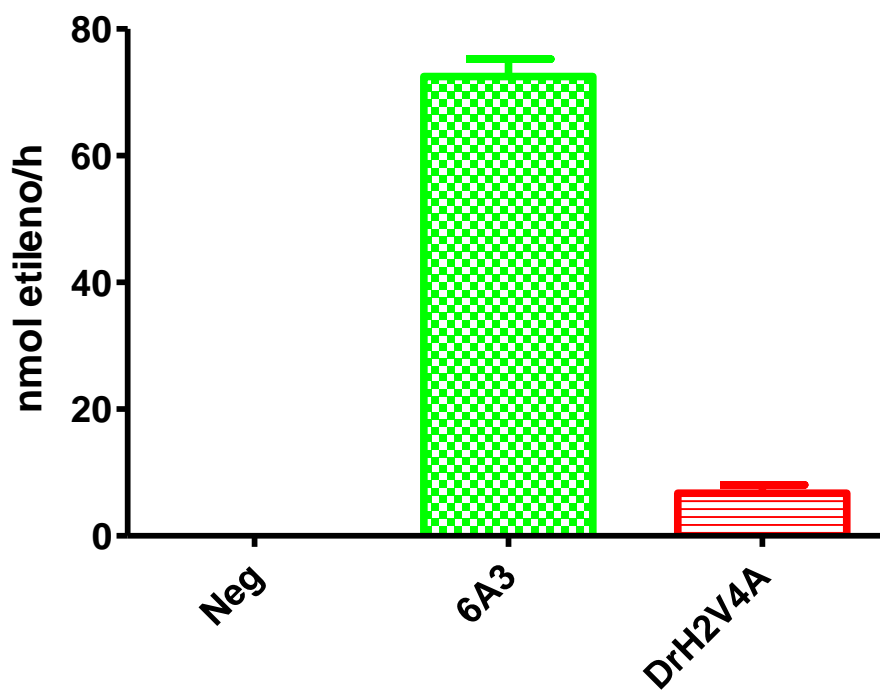
Hasta este momento, sólo se tiene secuenciado el fragmento del gen *nifD* de *P. timonensis*. Su secuencia se relacionó con el gen ortólogo de *Paenibacillus graminis* como se observa en el cuadro 11.

**Cuadro 11.** Amplificación y análisis del gen *nifD* amplificado

Cepa	Género identificado	Gen amplificado	Relación filogenética	Porcentaje de similitud (%)
DrH2V 4A	<i>Paenibacillus timonensis</i>	<i>nifD</i>	<i>Paenibacillus graminis</i>	97

### 5.3 Ensayo de reducción de acetileno (ARA).

La cepa *Paenibacillus timonensis* (DrH2V 4A) fue capaz de reducir el acetileno a etileno cuando creció en un medio de cultivo con diversos carbohidratos con una capacidad de 6.74 nmoles de etileno/hora. Este resultado se comparó con la tasa de reducción del acetileno de *K. variicola*, especie que se utilizó como testigo positivo (figura 8).



**Figura 8.** Actividad de reducción del acetileno de *Paenibacillus timonensis* (DrH2V 4A), en el medio WATC4.



# 6. Discusión

Se ha demostrado que los insectos pueden adaptarse y diversificar sus hábitos para poder ocupar casi cualquier ecosistema en la biosfera. Una de las adaptaciones que ha ayudado a los insectos para colonizar la tierra es la simbiosis que mantienen con microorganismos que habitan fuera y dentro de su cuerpo (Buchner, 1965; Ishikawa, 2003).

La asociación insecto-bacteria puede tener implicaciones importantes en la capacidad reproductiva de los insectos, sus interacciones en la comunidad y la especiación en los nichos ecológicos en los cuales estos se desarrollan (Adams, *et al.*, 2010). Por ejemplo, el metagenoma del intestino de termitas es más rico en la diversidad de genes de fijación de nitrógeno que el del saltamontes, presuntamente debido a la adaptación de la termita a un sustrato rico en celulosa, pero pobre en nitrógeno asimilable (Shi *et al.*, 2013). También en *Reticulitermes chinensis* (Snyder), se encontró por métodos independientes del cultivo que había una notable diversidad de genes *nifH* estrechamente relacionados con clostridios, espiroquetas, proteobacterias, bacteroides y arqueas metanogénicas (Du *et al.*, 2012).

Los escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus* han formado una simbiosis parasitaria exitosa con los miembros de la familia Pinaceae. Por otro lado, poco se sabe acerca de la diversidad, fisiología y ecología de los microorganismos asociados al tracto digestivo de los escarabajos que se desarrollan dentro de la madera y la corteza de los árboles (Brand *et al.*, 1975; Bridges, 1981; Bridges *et al.*, 1984; Delalibera *et al.*, 2005; Moore 1972a, b; Vasanthakumar *et al.*, 2006).

En este estudio se aislaron bacterias del tracto digestivo de insectos macho y hembra del género *Dendroctonus* con la capacidad de crecer en un medio sin fuente de nitrógeno. Del insecto *Dendroctonus vales* se aislaron 13 morfotipos coloniales diferentes mientras que de *D. rhizophagus* se aislaron 8, la mayoría de los morfotipos fueron similares a las de enterobacterias, está ampliamente demostrado que el grupo de las enterobacterias se asocia con la capacidad de fijación de nitrógeno en el canal alimentario de varios insectos (Bridges, 1981;

Pinto-Tomás *et al.*, 2009; Potrikus y Breznak, 1977; Prabhakar *et al.*, 2009). Todos los aislados fueron identificados por la secuencia del gen 16S *rRNA*.

Particularmente en este estudio se encontraron bacterias identificadas como *Pseudomonas* sp., *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans* y *Stenotrophomonas maltophilia* de *D. valens* y *Pseudomonas* sp., *Rahnella aquatilis* y *Paenibacillus timonensis* de *D. rhizophagus*. También se demostró la presencia de los genes *nifD* en *R. aquatilis* y *P. timonensis*, además en esta última se detectó la reducción de acetileno *in vitro*.

En el caso del tracto digestivo de *D. valens* se han encontrado a *Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea cedenensis* y *P. dispersa* con crecimiento visible en un medio libre de nitrógeno (Morales-Jiménez *et al.*, 2009). Mientras que de *D. rhizophagus* sólo se ha demostrado la presencia de *Roultella terrigena* como diazótrofo presente en el tracto digestivo. Y sólo a ésta última le fue demostrada la actividad de la nitrogenasa (Morales-Jiménez *et al.*, 2013).

El género *Pseudomonas* ya ha sido encontrado dentro del canal alimentario de estas y otras especies de *Dendroctonus* como *D. frontalis* y *D. micans* (Morales-Jiménez *et al.*, 2012 y 2013; Yilmaz *et al.*, 2006; Vasanthakumar *et al.*, 2006). No son frecuentes los reportes de especies de *Pseudomonas* diazótroficas (Young, 1992). De hecho, muchos de los reportes de supuestas cepas de este género con capacidad para fijar nitrógeno fueron posteriormente reasignadas taxonómicamente a otros géneros dentro de las  $\alpha$  y  $\beta$  Proteobacterias (Chan *et al.*, 1994). Sin embargo, actualmente, se ha reconocido que *Pseudomonas azotifigens*, *P. stutzeri* y *P. diazotrophicus* son capaces de fijar nitrógeno *in vitro* (Chan *et al.*, 1994; Desnoues *et al.*, 2003; Hatayama *et al.*, 2005; Watanabe *et al.* 1987), aunque esta última especie posiblemente será en el futuro reclasificada en otro género (Taylor *et al.*, 1993).

En el presente trabajo, las cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas no pudieron ser identificadas hasta el nivel de especie y posiblemente las pruebas de reducción de acetileno resultaron negativas debido a que las especies de *Pseudomonas*

diazotróficas descritas hasta este momento realizan la actividad en condiciones microaerofílicas (Desnoues *et al.*, 2003; Hatayama *et al.*, 2005), mientras que nuestros ensayos no se realizaron en estas condiciones.

*Rahnella aquatilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pantoea agglomerans* (antes *Enterobacter agglomerans*) aisladas del intestino de *Dendroctonus* spp. en este estudio, se han reportado previamente como bacterias capaces de fijar nitrógeno (Berge *et al.*, 1991; Bridges, 1983; Park *et al.*, 2005) y, por su elevada población, podrían ser los principales responsables de la actividad de la nitrogenasa detectada en insectos completos de *D. valens* (Morales-Jiménez *et al.*, 2009). También de *D. terebrans* y *D. frontalis* se aislaron varias cepas de *P. agglomerans* que fueron capaces de reducir el acetileno *in vitro* (Bridges, 1981).

*R. aquatilis* fue la bacteria más frecuentemente aislada y aparentemente más abundante en el tracto digestivo de *D. valens* y *D. rhizophagus* (Morales-Jiménez *et al.*, 2009 y 2012).

Por su parte, el género *Stenotrophomonas* se ha reportado en *D. valens*, *D. rhizophagus* y *D. frontalis*, entre otros insectos (Delalibera *et al.*, 2007; Morales-Jiménez, *et al.*, 2009 y 2012; Vasanthakumar *et al.*, 2007), por lo que la presencia de este género bacteriano hace suponer que juegan un papel importante en el intestino de los insectos.

De las 128 especies descritas del género *Paenibacillus*, la capacidad de fijar nitrógeno de manera libre se ha encontrado en 23 de ellas. Estas bacterias se han encontrado asociados a la rizósfera y como endófitos de plantas cultivables, silvestres y coníferas. La presencia de los genes *nif*, específicamente *nifH*, se ha detectado en la mayoría de la especies diazotróficas (Ding *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2007; Ma y Chen, 2008). Sin embargo, ningún trabajo previo a éste ha descrito a *P. timonensis* asociado al tubo digestivo de un insecto descortezador, ni como bacteria diazotrófica. En este trabajo, se demostró con la presencia del gen *nifD*, que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la dinitrogenasa, y la capacidad para reducir el acetileno, que esta bacteria es capaz de fijar nitrógeno

atmosférico. La originalidad de este hallazgo, obliga a repetir el aislamiento de esta bacteria a partir del tracto digestivo de los descortezadores y a revisar su perfil fisiológico para confirmar su identidad.

La comparación de las secuencias de DNA del gen de la dinitrogenasa de la cepa con secuencias de la base de datos reveló que son muy similares a los genes de la molibdoferrodoxina nitrogenasa (*nifD*) de *Paenibacillus graminis* reportado como diazótrofo (Navarro-Noya *et al.*, 2012).

Podría ser que en la simbiosis con el insecto, *P. timonensis* juegue un papel secundario en la fijación de nitrógeno debido a que su población no parece ser muy elevada y a que mostró *in vitro* una baja actividad de la nitrogenasa comparada con *K. variicola*, aunque este argumento puede ser endeble si con experimentos posteriores se encuentran condiciones más apropiadas para esta actividad.

Los trabajos hasta ahora publicados que describen las bacterias del tracto digestivo de miembros del género *Dendroctonus* concluyen que existe una moderada diversidad en ese hábitat (Morales-Jiménez *et al.*, 2009 y 2012; Trombetta, 2005; Broderick *et al.*, 2004). Esto y las bacterias que corresponden a la fracción no cultivable (aún) podría explicar la limitada diversidad de diazótrofos encontrada en este trabajo.

# 7. Conclusiones

- ④ Se aislaron e identificaron 5 posibles bacterias diazotróficas que incluyen cepas de *Pseudomonas* sp., *Rahnella aquatilis*, *Pantoea agglomerans*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Paenibacillus timonensis* a partir del tracto digestivo de *Dendroctonus* spp. capaces de crecer en un medio sin fuente de nitrógeno.
  
- ④ *Paenibacillus timonensis* y *R. aquatilis* albergan al gen *nifD* que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la molibdenoferroproteína dinitrogenasa, el gen *nifD* de *P. timonensis* esta filogenéticamente emparentado con el gen ortólogo de *Paenibacillus graminis*.
  
- ④ *Paenibacillus timonensis* fue capaz de reducir el acetileno en el medio WATC4 con una capacidad de 6.74 nmoles de etileno/h.
  
- ④ Con base a la presencia del gen *nifD* y a la capacidad de reducir el acetileno podemos decir que la cepa DrH2V 4A emparentada con *Paenibacillus timonensis* es un diazótrofo.

# 8. Prospectivas



- Estudiar la expresión *in situ* de los genes de fijación de nitrógeno de las especies diazotróficas cultivables más abundantes del canal alimentario de *Dendroctonus* spp.
  
- Determinar la diversidad filogenética de los genes de fijación de nitrógeno de la comunidad bacteriana asociada al tracto digestivo de *D. valens*.
  
- Realizar las pruebas de reducción de acetileno con las cepas utilizando diversas fuentes de carbono, incluyendo azúcares diferentes de la glucosa o ácidos orgánicos; medios con diferentes potenciales de óxido-reducción; y la incorporación de  $^{15}\text{N}$  para revelar o confirmar la capacidad de fijar.
  
- Realizar la construcción de librerías del gen *nifD* obtenido a partir del DNA metagenómico de *Dendroctonus* spp.

# 9. Bibliografía

Adams AS, Adams SM, Currie CR, Gillette NE, Raffa KF. 2010. Geographic variation in bacterial communities associated with the red turpentine beetle (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol* 39:406-414

Altschul, SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucl Acids Res* 25:3389-3402

Behar A, Yuval B, Jurkevitch E. 2005. Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Mol Ecol* 14:2637-2643.

Benemann JR. 1973. Nitrogen fixation in termites. *Science* 181:164-165.

Berge O, Heulin T, Achouak W, Richard C, Bally R, Balandreau J. 1991. *Rahnella aquatilis*, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize. *Can J Microbiol* 37:195–203.

Betancourt DA, Loveless TM, Brown JW, Bishop PE. 2008. Characterization of diazotrophs containing Mo-independent nitrogenases, isolated from diverse natural environments. *Appl Environ Microbiol*; 74:3471-3480.

Brand, JM, Bracke JW, Markovetz AJ, Wood DL, Browne LE. 1975. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. *Nature* 254:136-137.

Breznak JA, Brill WJ, Mertins JW, Coppel HC. 1973. Nitrogen fixation in termites. *Nature* 244:577-580.

Breznak JA, Mertins JW, Coppel HC. 1974. Nitrogen fixation and methane production in wood-eating cockroach, *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Orthoptera: Blattidae). *Univ. Wis. For. Res. Notes* 184, Madison, WI.

Bridges JR. 1981. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles, *Microb Ecol* 7:131-137.

Bridges JR, Marler JE, McSparrin BH. 1984. A quantitative study of the yeasts and bacteria associated with laboratory-reared *Dendroctonus frontalis* Zimm. (Coleoptera: Scolytidae). J Appl Entomol 97:261-267.

Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. Appl. Environ. Microbiol. 70: 293–300.

Buchner, P. 1965. Endosymbionts of animals with plant microorganisms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Campbell, BC. 1989. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. En E. Bernays (ed.), Insect-plant interactions. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Capinera J. 2008. Encyclopedia of Entomology. 2nd. Edition. Ed. Springer. Pp 379-381.

Chan, YK, Barraquio WL, Knowles R. 1994. N<sub>2</sub>-fixing pseudomonads and related soil bacteria. FEMS Microbiol Rev 13:95-118.

Cibrían DT, Mendez JT, Campos R, Yates HO, Flores JE. 2000. Insectos forestales de México. Universidad Autónoma de Chapingo.

Cognato AI, Sun JH, Anducho MA, Owen D. 2005. Genetic variation and origin of red turpentine beetles (*Dendroctonus valens* LeConte) introduced to the People's Republic of China. Agric Forest Entomol 7:87-94

Colloff MJ, Wakelin SA, Gomez D, Rogers SL. 2008. Detection of nitrogen cycle genes in soils for measuring the effects of changes in land use and management. Soil Biol Biochem. 40:1637-1645.

Coty VF. 1967. Atmospheric nitrogen fixation by hydrocarbon-oxidizing bacteria. Biotechnol Bioeng 9:25–32.

Delalibera, I, Handelsman J, Raffa KF. 2005. Contrasts in cellulolytic activities of gut microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera:

Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). *Environ Entomol* 34:541-547.

Desnoues N, Lin M, Guo X, Ma L, Carreño-Lopez R & Elmerich C. 2003. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology* 149:2251-2262.

Díaz E, Arciniega O, Sánchez L, Cisneros R, Zúñiga G. 2003. Anatomical and histological comparison of the alimentary canal of *Dendroctonus micans*, *D. ponderosae*, *D. pseudotsugae pseudotsugae*, *D. rufipennis*, and *D. terebrans*. (Coleoptera: Scolitydae). *Ann Entomol Soc Am* 96:144-152.

Díaz E, Cisneros R, Zúñiga G, Uria-Galicia E. 1998. Comparative anatomical and histological study of the alimentary canal of *Dendroctonus parallelocolis*, *D. rhizophagus*, and *D. valens* (Coleoptera: Scolytidae). *Annals of the Ann Entomol Soc Am* 91:479-487.

Dillon, R. J. y V. M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49:71-92.

Ding Y, Wang J, Chen S. 2005. Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. *J Appl Microbiol* 99:1271-1281.

Du X, Li X, Wang Y, Peng J, Hong H, Yang H. 2012. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the intestinal tract of *Reticulitermes chinensis* (Snyder). *Curr Microbiol* 65:547-551

Fallik E, Chan Y, Robson R. 1991. Detection of alternative nitrogenases in aerobic gram-negative nitrogen-fixing bacteria. *J Bacteriol* 173:365-371.

Geib SM, Filley TR, Hatcher PG, Hoover K, Carlson JE, Jimenez-Gasco MM, Nakagawa-Izumi A, Sleighter RL, Tien M. 2008. Lignin degradation in wood-feeding insects. *Proc Nat Acad Sci* 105:12932-12937.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95–98.

Hatayama K, Kawai S, Shoun H, Ueda Y, Nakamura A. 2005. *Pseudomonas azotifigens* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium isolated from a compost pile. *International J Sys Evol Microbiol* 55:1539-1544.

Hoffman CS, Winston F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57:267-272.

Hong YY, Ma YC, Zhou YG, Gao F, Liu HC, Chen SF. 2009. *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. *Int J Syst Evol Micr.* 59:2656-2661.

Igarashi RY, Seefeldt L. 2003. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 38:351-384.

Ishikawa, H. 2003. Insect symbiosis: An introduction. En *Insect symbiosis*. K Bourtzis, & TA Miller. CRS Press. Pp 1-21.

Kuranouchi, T, Nakamura T, Shimamura S, Kolima H, Goka K, Okabe K Mochizuki A. 2006. Nitrogen fixation in the stag beetle, *Dorcus (Macrodorcus) rectus* (Motschulsky) (Col., Lucanidae). *J. Appl. Entomol.* 130: 471-472.

Mattson WJ. 1980. Herbivore in relation to plant nitrogen content. *Annu Rev Ecol Syst* 11:119-161.

Ma Y, Zhang J, Chen S. 2007. *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *Int J Syst Evol Micr.* 57:873-877.

Ma YC, Chen SF. 2008. *Paenibacillus forsythia* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *Int J Syst Evol Micr.* 58:319-323.

Miao ZW, Chou WM, Huo FY, Wang XL, Fang JX, Zhao MM. (2001). Biology of *Dendroctonus valens* in Shanxi Province. *Shanxi For Sci Tech* 23:34–37

Moore GE. 1972 (a). Microflora from the alimentary tract of healthy southern pine beetles, *Dendroctonus frontalis* (Scolytidae), and their possible relationship to pathogenicity. J. Invertebr. Pathol. 19:72–75.

Moore GE. 1972 (b). Pathogenicity of ten strains of bacteria to larvae of the southern pine beetle (*Dendroctonus frontalis*). J. Invertebr. Pathol. 20:41–45

Morales-Jiménez J. 2007. Comunidad bacteriana y fijación de nitrógeno asociadas al tracto digestivo de *Dendroctonus valens* LeConte Curculionidae: Scolytinae. Tesis de Maestría. ENCB-IPN.

Morales-Jiménez J, Zúñiga G, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. 2009. Bacterial community and nitrogen fixation in the red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Microbial Ecology 58:879-891.

Morales-Jiménez J, Vera-Ponce de Leon A, García-Domínguez A, Martínez-Romero E, Zúñiga G, Hernández-Rodríguez C. 2013. Nitrogen-Fixing and uricolytic bacteria associated with the gut of *Dendroctonus rhizophagus* and *Dendroctonus valens* (Curculionidae: Scolytinae). Microbial Ecology (en prensa).

Nardi, JB, Mackie RI, Dawson JO. 2002. Could microbial symbionts of arthropod guts contribute significantly to nitrogen fixation in terrestrial ecosystems? J. Insect Physiol. 48:751-763.

Navarro-Noya Y, Hernández-Mendoza E, Morales-Jiménez J, Jan-Roblero J, Romero E, Hernández-Rodríguez C. 2012. Appl Soil Ecol 62:52-60.

Noda S, Ohkuma M, Usami R, Horikoshi K, Kudo T. 1999. Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. Appl Environ Microbiol 65:4935-4942.

Odum HT. 1988. Self-organization, transformity, and information. Science 242:1132-1139.

Ohkuma, M, Noda S, Kudo T. 1999. Phylogenetic diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic microbial community in the gut of diverse termites. *Appl Environ Microbiol* 65:4926-4934.

Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res* 160:127-33.

Pinto-Tomás AA, Anderson MA, Suen G, Stevenson DM, Chu FS, Cleland WW, Weimer PJ, Currie CR. 2009. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants. *Science* 326:1120–1123.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817–818.

Potrikus CJ, Breznak JA. 1977. Nitrogen-fixing *Enterobacter agglomerans* isolated from guts of wood-eating termites. *Appl Environ Microbiol* 33:392-399.

Prabhakar C, Sood P, Kapoor V, Kanwar S, Mehta P, Sharma P. 2009. Molecular and biochemical characterization of three bacterial symbionts of fruit fly, *Bactrocera tau* (Tephritidae: Diptera). *J Gen Appl Microbiol* 55:479-487.

Relman DA. 1993. Universal bacterial 16S rRNA amplification and sequencing. En American Society of Microbiology (ed) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Nueva York. pp 489-495

Ribbe M, Gadkari D, Meyer O. 1997. N<sub>2</sub> fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N<sub>2</sub> reduction to the oxidation of superoxide produced from O<sub>2</sub> by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem* 272:26627-26633.

Ruby EG, McFall-Ngai MJ. 1999. Oxygen-utilizing reactions an symbiotic colonization of the squid light organ by *Vibrio fischeri*. *Trends Microbiol*. 7:414



Rusell JA, Moreau CS, Goldman-Huertasa B, Fujiwaraa M, Lohmana J, Piercea NE. 2009. Bacterial gut symbionts are tightly linked with the evolution of herbivory in ants. *Proc Nat Acad Sci* 106:21236-21241.

Salinas-Moreno Y, Vargas CF, Zuñiga G, Ager A, Hayes JL. 2010. Atlas de distribución geográfica de los descortezadores del género *Dendroctonus* (Cuculionidae: Scolytinae) en México. Instituto Politécnico Nacional- Comisión Nacional Forestal (IPN-CONAFOR). México. pp. 90.

Shi W, Xie S, Chen X, Sun S, Zhou X, Liu L, Gao P, Kyrpides NC, No EG, Yuan JS. 2013. Comparative genomic analysis of the endosymbionts of hervivorous insects reveals eco-enviromental adaptations: biothecnology applications. *PLoS Genet* 9:100313

Scott JJ, Oh DC, Yuceer MC, Klepzig KD, Clardy J, Currie CR. 2008. Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322:63.

Symonds MRE, y Elgar MA. 2004. The mode of pheromone evolution: evidence from bark beetles. *Biol Sc* 271:839-846.

Taylor CJ, Carrick BJ, Galbraith L& Wilkinson SG. 1993. Polar lipids of '*Pseudomonas diazotrophicus*'. *FEMS Microbiol Lett* 106: 65–69.

Thomas J.B., Bright D.E. 1970. A new species of *Dendroctonus* (Coleoptera:Scolytidae) from Mexico. *Can Entomol* 102:479-483.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876–4882.

Thornber JP, Northcote DH. 1961. Changes in the chemical composition of a cambial cell during its differentiation into xylem and phloem tissue in trees. *Biochem J* 81:449-455.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antim. Agents and Chemoth.* 49: 2474–2478.

Vasanthakumar A, Delalibera I, Handelsman J, Klepzig KD, Schloss PD, Raffa KF. 2006. Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environ Entomol* 35:1710-1717.

Warren JM, Lee Allen H, Booker FL. 2002. Mineral nutrition, resin flow and phloem phytochemistry in *loblolly pine*. *Tree Physiol* 19:655–663.

Watanabe I, So R, Ladha JK, Katayama-Fujimura Y, Kuraishi H. 1987. A new nitrogen-fixing species of pseudomonad: *Pseudomonas diazotrophicus* sp. nov. isolated from the root of wetland rice. *Can J Microbiol* 33:670-678.

Wood SL. 1982. The bark and ambrosia beetle of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae). A taxonomic monograph. Great Basin Naturalist Memoirs, Number 6, Brigham Young University.

Yan Z, Sun J, Don O, Zhang Z. 2005. The red turpentine beetle, *Dendroctonus valens* LeConte (Scolytidae): an exotic invasive pest of pine in China. *Biodiv Conserv* 14:1735-1760.

Yilmaz H, Sezen K, Kati H, Demirbağ Z. 2006. The first study on the bacterial flora of the European spruce bark beetle, *Dendroctonus micans* (Coleoptera: Scolytidae). *Biologia* 61:679-686.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5: 539–554.