



UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
DIVISIÓN BIBLIOTECA DUARDO COTE LAMUS  
RESUMEN TRABAJO DE GRADO



**AUTOR:**

**NOMBRES:** ANDREA DEL PILAR **APELLIDOS:** CONTRERAS MARCIALES

**FACULTAD:** CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

**PLAN DE ESTUDIOS:** INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

**DIRECTOR:**

**NOMBRES:** LEIDY DIANA **APELLIDOS:** ARDILA LEAL

**TÍTULO DE LA TESIS:** IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DETECCIÓN DEL GEN *nifH* EN 12 CEPAS CONSERVADAS EN EL BANCO DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA APLICADA UFPS

**RESUMEN**

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) son un grupo heterogéneo de bacterias que pueden mejorar el crecimiento de las plantas, uno de los procesos más importantes de estos microorganismos es la fijación biológica de nitrógeno. Actualmente, las técnicas de biología molecular permiten identificar estas bacterias y evaluar su potencial diazótrofo. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S, 12 bacterias reconocidas fisiológicamente como PGPRs y detectar por medio de PCR la presencia del gen *nifH*, mediante la evaluación de 5 grupos de cebadores: *nifH19F/nifH3*, *Nh21F/nifH3*, *F1/nifH-r*, *PolF/PolR* y *nifH-g1-f/nifH-g1-r*. Se encontró que las 12 bacterias pertenecen al género *Pseudomonas*, se ubicaron dentro de las especies *P. putida* (RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138, RZH143 y RZH144), *P. aeruginosa* (RZH141 y RZH142), *P. montelli* (RZH137), *P. taiwanensis* (RZH140) y *P. alcaligenes* (RZH139). Además, 5 de ellas amplificaron bandas que pueden ser indicadas como representativas para el gen *nifH*, con 4 de los 5 grupos de cebadores, mientras que en las otras 7 se observó la amplificación de bandas con sólo uno de los grupos de cebadores evaluados. En conclusión, se evidencia el potencial diazótrofo de estas *Pseudomonas*, siendo candidatas para el desarrollo de productos biológicos en la mejora de cultivos.

Palabras clave: Organismos diazótrofos, nitrogenasa, *Pseudomonas*, PGPR, PCR

**CARACTERÍSTICAS:**

PÁGINAS: 104 PLANOS:     ILUSTRACIONES:     CD ROOM: 1

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DETECCIÓN DEL GEN *nifH* EN 12 CEPAS  
CONSERVADAS EN EL BANCO DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
APLICADA UFPS

ANDREA DEL PILAR CONTRERAS MARCIALES

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DETECCIÓN DEL GEN *nifH* EN 12 CEPAS  
CONSERVADAS EN EL BANCO DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
APLICADA UFPS

ANDREA DEL PILAR CONTRERAS MARCIALES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Ingeniero Biotecnológico

Director:

LEIDY DIANA ARDILA LEAL

M.Sc. Biotecnología

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE  
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA  
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016



ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 27 DE ABRIL DE 2016

HORA: 02:00 P.M.

LUGAR: SALA N°03 EDIFICIO CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DETECCIÓN DEL GEN *nifH* en 12 CEPAS CONSERVADAS EN BANCO DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA APLICADA UFPS"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADO: LILIANA YANET SUAREZ  
MAYRA CONTRERAS  
ALBERTO SARMIENTO CASTRO

DIRECTOR: LEIDY DIANA ARDILA LEAL

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
ANDREA DEL PILAR CONTRERAS MARCIALES	1610688	4.0

OBSERVACIONES:  
APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS:

Liliana Yanet Suarez Mayra Contreras Alberto Sarmiento Castro

Vó.Bó. Coordinador Comité Curricular Leidy Diana Ardila Leal

## Resumen

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) son un grupo heterogéneo de bacterias que pueden mejorar el crecimiento de las plantas, uno de los procesos más importantes de estos microorganismos es la fijación biológica de nitrógeno. Actualmente, las técnicas de biología molecular permiten identificar estas bacterias y evaluar su potencial diazótrofo. El objetivo de esta investigación fue identificar molecularmente mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S, 12 bacterias reconocidas fisiológicamente como PGPRs y detectar por medio de PCR la presencia del gen *nifH*, mediante la evaluación de 5 grupos de cebadores: *nifH19F/nifH3*, *Nh21F/nifH3*, *F1/nifH-r*, *PolF/PolR* y *nifH-g1-f/nifH-g1-r*. Se encontró que las 12 bacterias pertenecen al género *Pseudomonas*, se ubicaron dentro de las especies *P. putida* (RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138, RZH143 y RZH144), *P. aeruginosa* (RZH141 y RZH142), *P. monteilli* (RZH137), *P. taiwanensis* (RZH140) y *P. alcaligenes* (RZH139). Además, 5 de ellas amplificaron bandas que pueden ser indicadas como representativas para el gen *nifH*, con 4 de los 5 grupos de cebadores, mientras que en las otras 7 se observó la amplificación de bandas con sólo uno de los grupos de cebadores evaluados. En conclusión, se evidencia el potencial diazótrofo de estas *Pseudomonas*, siendo candidatas para el desarrollo de productos biológicos en la mejora de cultivos.

Palabras clave: Organismos diazótrofes, nitrogenasa, *Pseudomonas*, PGPR, PCR

## Agradecimientos

La autora expresa sus agradecimientos a:

Fondo de Investigación Nacional Universitario – FINU, por el apoyo económico para realizar este proyecto de investigación.

A mis padres, *CARMEN MARCIALES* y *MANUEL CONTRERAS*; hermanos, *MARIA FERNANDA* y *JESÚS MANUEL*; mi hijo *DIEGO AGUILAR*, por ser mi soporte en los momentos difíciles, mi motivo para seguir. Mis padres, mi ejemplo de lucha y perseverancia.

M.Sc. *LEIDY DIANA ARDILA LEAL*, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto, por su dedicación, paciencia y tolerancia, además del asesoramiento y tiempo dedicado.

M.Sc. *DIANA MARÍA CÁRDENAS CARO*, por sus enseñanzas y asesoría en investigación y microbiología.

Ing. *CAROL CARRERO*, por su ayuda, consejos, risas y demás cosas que hicieron esta travesía más fácil de realizar.

Integrantes de los semilleros SIBAA y SIBiMBA por su colaboración en el proyecto y momentos de alegría.

*HOLANDÉS ERRANTE* por su amistad en estos años, alegrías, enojos y locuras, en el lugar en el que estén, siempre los recordaré.

A *JULIO ÁNGEL VÁZQUEZ MARTÍNEZ* por llegar en el momento indicado, por sus ánimos constantes y convertirse en mi ejemplo a seguir.

Finalmente a todas las personas que de alguna forma contribuyeron a la culminación de este proyecto.

## Contenido

	Pág.
Introducción	1
1 El problema	3
1.1 Título	3
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Formulación del problema	4
1.4 Justificación	5
1.5 Objetivos del proyecto	7
1.5.1 Objetivo general.	7
1.5.2 Objetivos específicos.	7
2 Marco referencial	8
2.1 Antecedentes	8
2.2 Marco teórico	12
2.2.1 Microorganismos importantes en la fijación de nitrógeno	12
2.2.2 Especies de <i>Pseudomonas</i> reportadas como fijadoras de nitrógeno	13
2.2.3 Genes que participan en la fijación de nitrógeno	14
2.2.4 Mecanismos moleculares de identificación bacteriana	19
2.3 Marco legal	20
2.4 Hipótesis de investigación	20

3	Diseño metodológico	21
3.1	Tipo de investigación	21
3.2	Universo y muestra	21
3.2.1	Universo.	21
3.2.2	Muestra	21
3.3	Variables	22
3.3.1	Variables independientes.	22
3.3.2	Variables dependientes.	22
3.4	Operacionalización de las variables	22
3.5	Fases de la investigación	23
3.5.1	Reactivación de las cepas.	23
3.5.2	Comparación de métodos de extracción de ADN.	23
3.5.3	Visualización y cuantificación del ADN	25
3.5.4	Amplificación del gen ARNr 16S.	26
3.5.5	Secuenciación del gen ARNr 16S	27
3.5.6	Análisis de secuencias y construcción del árbol filogenético	27
3.5.7	Amplificación de fragmentos del gen <i>nifH</i>	28
4	Discusión y Análisis de Resultados	31
4.1	Reactivación de las cepas	31
4.2	Comparación de métodos de extracción de ADN	31

4.3	Amplificación del gen ARNr 16S	36
4.4	Identificación molecular	38
4.5	Construcción del árbol filogenético	41
4.6	Amplificación de fragmentos del gen <i>nifH</i>	43
5	Conclusiones	59
6	Recomendaciones	60
	Bibliografía	61

## Lista de figuras

Figura 1. Reacciones químicas que suceden en la fijación biológica de nitrógeno.	15
Figura 2. Estructura de la nitrogenasa y los genes requeridos para su biosíntesis.	16
Figura 3. Representación esquemática de la agrupación de genes <i>nif</i> de <i>P. Stutzeri</i> A1501 en comparación con los grupos <i>nif</i> Syntenic de <i>A. vinelandii</i> AVOP, <i>K. pneumoniae</i> M5A1, <i>Azoarcus</i> sp BH72, y <i>A. brasilense</i> Sp7.	17
Figura 4. Comparación de los métodos de extracción evaluados.	32
Figura 5. Comparación de la pureza del ADN por la relación de absorbancias 260/280 nm.	33
Figura 6. Comparación de las concentraciones de ADN mediante espectrofotometría.	34
Figura 7. Ensayos con los cebadores universales 27F/1492R y BactF/BactR	37
Figura 8. Amplificación del gen ARNr 16S de las 12 bacterias.	39
Figura 9. Árbol filogenético de las cepas evaluadas, usando el método de Neighbor-Joining y p-distance, basado en sus secuencias de ARNr 16S.	42
Figura 10. Amplificación del gen <i>nifH</i> con los cebadores <i>nifH19F/nifH3</i> para la cepa AS7.	44
Figura 11. Amplificación del gen <i>nifH</i> con los cebadores <i>nifH19F/nifH3</i> .	45
Figura 12. Amplificación de <i>nifH</i> con los cebadores <i>nifH19F/nifH3</i> para todas las cepas.	45
Figura 13. Amplificación del gen <i>nifH</i> con los cebadores <i>Nh21F/nifH3</i> .	47
Figura 14. Amplificación de <i>nifH</i> con los cebadores <i>Nh21F/nifH3</i> para todas las cepas.	48
Figura 15. Amplificación del gen <i>nifH</i> con los cebadores <i>F1/nifH-r</i> .	49
Figura 16. Amplificación de <i>nifH</i> con los cebadores <i>F1/nifH-r</i> para todas las cepas.	50
Figura 17. Amplificación del gen <i>nifH</i> con los cebadores <i>PolF/PolR</i> .	51
Figura 18. Amplificación de <i>nifH</i> con los cebadores <i>PolF/PolR</i> para todas las cepas.	52

Figura 19. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores *nifH-g1-f/nifH-g1-r*. 53

Figura 20. Amplificación de *nifH* con los cebadores *nifH-g1-f/nifH-g1-r* para todas las cepas.54

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Genes nif y su función en el complejo nitrogenasa	18
<b>Tabla 2</b> Condiciones de los ensayos de PCR para amplificación del gen ARNr 16S	27
<b>Tabla 3</b> Secuencias de cebadores usados para amplificación de nifH	29
<b>Tabla 4</b> Condiciones de PCR empleadas para evaluar cebadores del gen nifH	30
<b>Tabla 5</b> Comparación de pureza y concentración de ADN, tiempo empleado y el rendimiento obtenido entre los protocolos evaluados	36
<b>Tabla 6</b> Identificación de bacterias por secuenciación de ARNr 16S	40
<b>Tabla 7</b> Resultados de amplificación para nifH con todos los cebadores evaluados	55
<b>Tabla 8</b> Fluorescencia en luz UV y tinción de Gram de las 12 bacterias	76

## **Lista de anexos**

Anexo 1 Reactivación de las cepas	76
Anexo 2. Secuencias del gen ARNr 16S	79
Anexo 3. Electroferograma de la cepa RZH133	88

## Introducción

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés) son un grupo heterogéneo de bacterias que pueden ser encontradas en la rizósfera, la superficie de las raíces y en asociación con las raíces; las cuales pueden mejorar el grado o calidad del crecimiento vegetal directa o indirectamente (Ahmad, Ahmad & Khan, 2008).

Uno de los procesos más importantes de las PGPRs es la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Obando et al., 2010), pues representa la mayor contribución biológica de este elemento a la biósfera (Pedraza et al., 2010). Algunos estudios indican que la FBN representa el 25% del nitrógeno total fijado (Loredo-Osti, Beltrán-López & Peña-del Río, 2009) y se han reportado niveles de fijación que van desde 15–140 Kg N Ha<sup>-1</sup>, es decir aproximadamente el 60% del nitrógeno necesario para algunas especies vegetales; a su vez estas cifras constituyen el equivalente a 350 kg de urea por hectárea al año (Loredo-Osti et al., 2009; Radic & McAdam, 2012).

La identificación de estas bacterias de acuerdo a sus características metabólicas ha sido posible utilizando las pruebas bioquímicas (Fernández, García, Saéz & Valdezate, 2010); pero estos métodos presentan diferentes limitaciones, entre las que cabe mencionar que no detecta mutaciones que conllevan a características diferentes, las similitudes entre especies distintas o las disparidades entre cepas de una misma especie (Godoy et al., 2008).

Debido a esto, actualmente es muy común realizar identificación molecular, analizando secuencias de genes específicos para comprobar el género e inclusive la especie (bacterias), ya que algunos no cambian su función con el tiempo o poseen muy pocas variaciones (Fernández et al., 2010).

Por otro lado, la FBN puede evaluarse a nivel molecular por la presencia de los genes *nif* que hacen parte del complejo enzimático de la nitrogenasa (Oldroyd & Dixon, 2014), moléculas que pueden identificarse gracias a técnicas ya desarrolladas como la extracción y amplificación del ADN y la secuenciación de fragmentos específicos. En la actualidad, estas técnicas moleculares están en el apogeo de la investigación gracias a los múltiples beneficios que brindan y a que la certeza y precisión de los resultados es muy cercana al 100% (Moreno y Galvis, 2013).

En el Laboratorio de Biología Aplicada UFPS, se encuentran conservadas gran número de bacterias que presentan características fisiológicas de las PGPR's y cuentan sólo con una identificación bioquímica, por lo que no se conoce con seguridad el género y la especie a la que pertenecen; además no tienen análisis de fijación de nitrógeno puesto que el Laboratorio no disponía del equipo necesario para el ensayo.

Debido a esto, en la presente investigación se realizó la identificación molecular de 12 cepas conservadas en el banco de cepas del LBA, amplificando y analizando la secuencia del gen ARNr 16S; además se indagó la presencia del gen *nifH* evaluando diferentes grupos de cebadores y variando las concentraciones de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa.

Con estos procesos se esperaba comprobar el género de las bacterias y ubicarlas dentro de diferentes especies; así mismo se esperaba observar amplicones del gen *nifH* para determinar su potencial diazotrófico (FBN).

## 1 El problema

### 1.1 Título

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y DETECCIÓN DEL GEN *nifH* EN 12 CEPAS  
CONSERVADAS EN EL BANCO DE CEPAS DEL LABORATORIO DE BIOLOGÍA  
APLICADA UFPS

### 1.2 Planteamiento del problema

El nitrógeno es un elemento que está presente en los procesos químicos vitales y en las moléculas de información como los ácidos nucleicos, es además el principal limitante después del agua, en el desarrollo y productividad de las plantas (Arias, Rengifo & Jaramillo, 2007; Villasanti, Román & Pantoja, 2013) y representa cerca del 80% de los gases de la atmósfera.

Los suelos Colombianos se caracterizan por tener problemas de acidez y poca disponibilidad de nitrógeno para las plantas; esta deficiencia de nitrógeno es causada en parte a la escasa incorporación de materia orgánica, bajas tasas de mineralización y altas tasas de inmovilización, haciendo que el nitrógeno sea de difícil asimilación para los diversos cultivos agrícolas (Reyes, Alvarez, El-Ayoubi & Valery, 2008), lo que hace que la aplicación de fertilizantes químicos sea un requerimiento en los sistemas de producción agropecuaria.

Como resultado, el problema ambiental causado específicamente por la aplicación de fertilizantes químicos ( $N_2$ ), se genera por la acumulación de nitratos en el subsuelo, que pueden incorporarse a las aguas subterráneas por lixiviación o ser arrastrados hacia los cauces

y reservorios superficiales, acelerando la degradación de los sistemas agrícolas y creando como consecuencia que los sistemas de producción afronten el reto de mantener una producción sostenida.

En Colombia, Norte de Santander hace parte de los cinco departamentos que producen el 74% del total de hortalizas del país (Delegatura de Protección de la Competencia, 2011) y es por lo tanto, un gran demandante de procesos biológicos como la fijación de nitrógeno. Sin embargo, debido al triple enlace que forma la molécula de nitrógeno ( $N\equiv N$ ), no puede ser utilizado por la mayoría de seres vivos; sólo unos pocos microorganismos tienen la capacidad de aprovecharlo mediante un proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (Mayz-Figueroa, 2004; Paredes, 2013). Por esta razón, es necesario evaluar los microorganismos que han sido aislados como promotores del crecimiento vegetal, que se han caracterizado tentativamente como *Pseudomonas* sp fluorescentes por sus funciones bioquímicas en el Laboratorio de Biología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander, identificándolos a nivel molecular para determinar con más acierto su género y especie, ya que las técnicas morfológicas y bioquímicas pueden inducir a errores (Moreno & Galvis, 2013), así mismo analizar la posible presencia de los genes que atribuyen la capacidad de FBN (genes *nif*) para establecer su potencial diazotrófico; siendo así más preciso el desarrollo de productos biológicos a partir de las bacterias que presenten dichos genes.

### **1.3 Formulación del problema**

¿Al Identificar molecularmente y analizar la presencia del gen *nifH* en 12 cepas conservadas en el LBA, permitiría conocer con certeza el género y la especie de cada microorganismo y determinar su potencial como bacterias fijadoras de nitrógeno?

#### 1.4 Justificación

La creciente producción agropecuaria en el país y en la región, ha estimulado el incremento en la aplicación de fertilizantes químicos para cubrir los requerimientos nutricionales de los cultivos, pero las fuentes de nitrógeno usadas continuamente y en exceso como urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio, traen consecuencias nocivas como la acidez del suelo (Chien, Gearhart, & Collamer, 2009; Sánchez, 2012). Es por esto que actualmente el uso de bioinsumos como la biofertilización nitrogenada se ha convertido en un mecanismo con un impacto ecológico positivo, debido a que ayuda a reducir el consumo energético ( $N_2$ ) y promueve la agricultura sostenible.

Por esta razón, el estudio del mecanismo por el que tiene lugar la FBN ha ido en aumento en las últimas décadas, pero en los últimos años se ha dado más importancia a las vías moleculares, complejos enzimáticos y a los genes involucrados en este trascendental proceso. Uno de los géneros que más se ha estudiado por poseer esta capacidad es *Azospirillum* (De-Bashan, Holguin, Glick & Bashan, 2007) pero hay otros potenciales diazótrofos que han estado en un segundo plano y que hasta hace poco se creía no pertenecían a este grupo; un ejemplo de éstos son las *Pseudomonas* (Desnoves et al., 2003).

En la actualidad, se conocen ciertas especies de *Pseudomonas* que han sido evaluadas en la fijación biológica de nitrógeno, algunos de estos microorganismos han sido aislados en China (Desnoves et al., 2003), Japón (Hatayama, Kawai, Shoun, Ueda & Nakamura, 2005) y Pakistán (Mirza et al., 2006), en donde se ha estudiado con especial relevancia el complejo de la nitrogenasa y los genes *nif*, los cuales se encargan de los procesos moleculares por los que se lleva a cabo la FBN (Oldroyd & Dixon, 2014).

Son numerosas las cepas que han sido aisladas que pueden ser potenciales fijadoras de nitrógeno, caracterizadas fisiológicamente como promotoras del crecimiento vegetal, algunas de ellas caracterizadas bioquímica y morfológicamente como *Pseudomonas* en el Laboratorio de Biología Aplicada de la Universidad Francisco de Paula Santander; aunque por ahora, sólo un grupo selecto y pequeño ha sido identificado molecularmente. Como lo mencionan Moreno y Galvis (2013), la identificación bioquímica no es una herramienta con la suficiente especificidad para lograr una buena caracterización comparada con la identificación molecular que permite determinar un nivel interespecífico llegando a caracterizar incluso subespecies, serovariedades, cepas en menor tiempo y de forma más sencilla.

Es importante seguir investigando a nivel molecular las distintas cepas que ya han sido caracterizadas como *Pseudomonas* potenciales diazótrofes, para comprobar el género al que pertenecen y analizar cuáles de ellas presentan estos genes y qué rutas metabólicas siguen, pues el uso de tecnologías moleculares que faciliten determinar si existen genes involucrados en la fijación de nitrógeno es una excelente alternativa, que reconocería la aplicación y utilización adecuada de este recurso, ya que permite revelar la presencia de mecanismos genéticos para mejorar su entendimiento y así establecer una fijación de nitrógeno eficiente, además de la posibilidad de crear biofertilizantes a partir de estos microorganismos.

Con el uso de estas técnicas se está logrando la relación de dos grandes líneas de la Biotecnología; la investigación en Genética y Biología molecular para el desarrollo de productos que beneficien el progreso de la Biotecnología Agrícola y Alimentaria. Así mismo, este proyecto de investigación que analiza el principal gen involucrado en la fijación biológica de nitrógeno es el primero en desarrollarse en los laboratorios de la UFPS.

## 1.5 Objetivos del proyecto

### 1.5.1 Objetivo general.

Identificar molecularmente y analizar la presencia del gen *nifH* en 12 cepas bacterianas conservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Biología Aplicada de la UFPS

### 1.5.2 Objetivos específicos.

- Evaluar la eficiencia de tres métodos de extracción de ADN en bacterias diazotróficas conservadas en el banco de cepas del LBA de la UFPS.
- Identificar filogenéticamente a partir de la secuenciación del gen ARNr 16S, 12 cepas del banco de cepas del LBA de la UFPS.
- Determinar a través de técnicas moleculares el potencial de las cepas como fijadoras de nitrógeno mediante la presencia del gen *nifH*.

## 2 Marco referencial

### 2.1 Antecedentes

Lovell, Piceno, Quattro, y Bagwell (2000), “**Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora***” (Estados Unidos). Expresan que mediante las tecnologías moleculares se han podido establecer métodos que permiten conocer en forma precisa la diversidad genética de los diferentes complejos del suelo donde pueden habitar las BFN y sus reportes han sido realizados gracias a el ARNr 16S y los genes *nif*, carácter particular en todos los microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>.

Grageda, Díaz, Peña & Vera, (2012) “**Impacto de los biofertilizantes en la agricultura**” (México). Evidenciaron que la fijación biológica de nitrógeno contribuye con más N<sub>2</sub> al crecimiento de las plantas, que la cantidad total de fertilizantes nitrogenados aplicados a los cultivos. Alrededor de  $1.75 \times 10^8$  ton N a<sup>-1</sup> se fijan biológicamente, lo que equivale a un poco más de la producción mundial de fertilizantes nitrogenados ( $8.9 \times 10^7$  ton N a<sup>-1</sup>).

Gaby y Buckley (2012) “**A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase**” (Estados Unidos). Realizaron un extenso estudio en el que analizaron 51 cebadores universales para la amplificación de el gen *nifH* que se conoce que uno de los genes más estudiados por su intervención en la FBN; de acuerdo a su posición en *Azotobacter vinelandii*, encontraron que sólo 15 de ellos acertaron en el 90% de las secuencias de *nifH*.

Valencia, Lozano & Valero, (2001) “**Aislamiento y caracterización de fijadores biológicos de nitrógeno asociados a caña de azúcar panelera Colombia**” (Cundinamarca),

aislaron bacterias diazotróficas asociadas a la rizósfera y a la parte interna de raíz y tallo de plantas (endófitos) provenientes de caña de azúcar panelera (variedad POJ 2878), logrando la identificación de géneros de microorganismos como: *Acetobacter* sp, *Azospirillum* sp, *Azotobacter* sp, *Beijerinckia* sp y *Herbaspirillum* sp, como resultado final se encontró que varios aislamientos presentaron alta actividad de nitrogenasa representando así organismos promisorios como biofertilizantes para el mejoramiento de los cultivos de caña de azúcar, dado su potencial como fijadores de nitrógeno.

Melgarejo et al. (2002), “**Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia**” (Cundinamarca). Menciona que CORPOICA es una de las entidades que ha realizado más investigación en el área; mediante un convenio tripartito suscrito con el Ministerio de Agricultura y con el ICA, administra el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés Agropecuario, el cual posee cerca de 4.500 accesiones; este banco constituye uno de los mayores reservorios de diversidad de germoplasma microbiano nativo a nivel nacional, donde están incluidos microorganismos con interés en fitoprotección, biofertilización, nutrición y salud animal.

Jiménez (2007) “**Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S**” (Boyacá). En su investigación indicó que los aislamientos de *A. venelandii*, *A. chroococcum*, *A. nigricans* y *A. paspali* pudieron ser realizado eficientemente, la caracterización molecular demostró ser un mecanismo trascendental para la identificación de las bacterias diazótrofes importantes para la agricultura.

Garrido (2007) “**Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas**

**climáticas**” (Cesar). Aisló e identificó bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del Valle y Sabana del Cesar, realizó 352 aislamientos de las muestras de suelo, de los cuales 51 aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente; al realizar la prueba de reducción de acetileno (ARA), se seleccionaron once aislamientos con mayor reducción de acetileno y al ser caracterizados por medio del análisis de la secuencia ARNr 16S se encontró que los aislamientos pertenecen a los géneros *Azospirillum* y *Klebsiella*.

Mantilla et al., (2009) **“Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia Colombiana”** (Amazonas). En la evaluación de la distribución y abundancia de bacterias fijadoras de nitrógeno realizada en la Amazonia Colombiana, encontró que era mayor la abundancia de bacterias aerobias y microaerófilas en suelos bajo cobertura de pastizal y cobertura de bosque. Las investigaciones que giran en torno a la fijación de nitrógeno han generado importante reconocimiento sobre la diversidad y potencial de los microorganismos en este ámbito.

Martinez-Nieto & Garcia-Gonzalez (2010) **“Bacterias diazotróficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*”** (Cundinamarca). Analizan la utilización de especies nativas de microorganismos fijadores de nitrógeno beneficiosas para la biofertilización de árboles autóctonos empleados para reforestación, desarrollado por la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR).

Camelo, Vera, y Bonilla (2011), **“Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal”** (Cundinamarca). Realizaron estudios sobre los

mecanismos biológicos llevados a cabo por microorganismos, para tratar de mejorar el rendimiento y el impacto ecológico de la agricultura de la región.

Otero (2011) **“Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana”**

(Cundinamarca). Comprobó la capacidad de fijación de nitrógeno de bacterias fotosintéticas no sulfurantes y actinomicetos, mediante la amplificación del gen *nifH*.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria [Corpoica] (2007), citada por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística [DANE] (2014) **“Producción limpia de hortalizas, más salud y bienestar”** (Cundinamarca). Analiza que la mayoría de los agricultores de hortalizas emplea gran variedad de productos químicos para la preparación del suelo y el control fitosanitario, donde el principal problema de estos agentes es la toxicidad que generan y el daño a los ecosistemas.

Álvarez-López, Osorio-Vega, Díaz-Gómez, & Marín-Montoya (2014) **“Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes”** (Antioquia). Analizaron microorganismos fijadores de nitrógeno en plantas de vainilla y por medio de la reacción en cadena de la polimerasa encontraron que además de pertenecer al género *Pseudomonas*, presentaron el gen *nifH*, confirmando su potencial diazotrófico.

Montenegro, Ararat, & Betancur (2015) **“Cachaza y carbonilla : residuos agroindustriales con potencial de fertilización biológica nitrogenada”** (Valle del Cauca). Emplearon tres mezclas de residuos usados como biofertilizantes (Cachaza, carbonilla, cascarilla de arroz, entre otros), de las que extrajeron ADN y posteriormente realizaron PCR

para amplificar el gen *nifH*; observaron el fragmento en dos de las mezclas y concluyeron que la presencia de carbono y humedad influyeron en la presencia de microorganismos diazótrofos en dichas composiciones.

Ramirez (2015) “**Técnicas moleculares y caracterización de rizobacterias (PGPR) *Bacillus amyloliquefaciens* y *Pseudomonas fluorescens***” (Cundinamarca). Es el único trabajo de grado que menciona el trabajo con el gen *nifH* en la Universidad Francisco de Paula Santander; sin embargo, la investigación se realizó en Bogotá y los resultados fueron negativos para la amplificación del gen.

Argüello-Navarro & Moreno-Rozo (2014), “**Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.)**” (Norte de Santander). En cuanto a biofertilizantes, el trabajo se ha enfocado especialmente hacia algunas bacterias del suelo (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) que realizan fijación biológica de nitrógeno y que lo hacen disponible para el desarrollo de plantas leguminosas, jugando un papel importante en la recuperación de suelos, en su trabajo aislaron e identificaron microorganismos que poseen dicha capacidad.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Microorganismos importantes en la fijación de nitrógeno**

El nitrógeno ( $N_2$ ) es un nutriente esencial para las plantas, junto al carbono, el hidrógeno y el oxígeno; mismos que además son importantes para los microorganismos y que conforman la materia orgánica del suelo. Algunos de esos microorganismos, ya sea solos o en asociación con plantas, son capaces de extraer  $N_2$  del aire y transformarlo para dejarlo

disponible a animales y otras plantas; proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Orozco, 1999).

A lo largo de los años, en diferentes estudios se han determinado los microorganismos capaces de realizar FBN, entre los que se encuentran bacterias, algas verde-azules (cianobacterias) y actinomicetos; éstos pueden actuar como microorganismos de vida libre o en asociaciones simbióticas y no simbióticas (Mayz-Figueroa, 2004).

Referente a las bacterias de vida libre, son diversos los géneros que se han encontrado con esta capacidad; entre las que se encuentran reportadas están *Beijerinckia*, *Clostridium* (Tortora, Funke & Case, 2007), *Burkholderia*, *Klebsiella* (Clavijo, Chipana, Centeno, Zúñiga & Guillén, 2012), *Gluconacetobacter* y *Azospirillum* (Obando et al., 2010). Como resultado de aislamiento, a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* “frijol” se recuperaron microorganismos de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Villanueva & Quintana, 2012), géneros que también fueron encontrados por Peña y Reyes (2007) en la hortaliza *Lactuca sativa* L. Por otro lado, Orozco-Jaramillo y Martínez-Nieto (2009) aislaron 62 cepas fijadoras de nitrógeno de *Pinus patula* entre las cuales identificaron los géneros: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*.

### **2.2.2 Especies de *Pseudomonas* reportadas como fijadoras de nitrógeno**

*Pseudomonas* es un género de bacteria que se caracteriza por sus múltiples beneficios como promotora del crecimiento en plantas (PGPR), como lo han expuesto diversos estudios (Ahmad et al., 2008; Ribeiro & Cardoso, 2012); por lo general actúa de forma indirecta usando mecanismos como producción de sideróforos y de forma directa con la solubilización de fósforo, producción de ácido indol acético, (AIA) (Ahemad & Khan, 2012; Dey, Pal, Bhatt

& Chauhan, 2004) y fijación de nitrógeno. Ésta última es una capacidad que ha sido poco estudiada en este microorganismo debido a que por mucho tiempo se creyó que era una habilidad ausente en el género, incluso algunas posibles *Pseudomonas* fijadoras de nitrógeno se han re-asignado a las  $\alpha$ - y  $\beta$ - Proteobacterias (Desnoues, et al., 2003). Según Busquets, et al. (2013), de las cepas reconocidas en este género por fijar nitrógeno algunas son miembros de *P. stutzeri* y *P. azotifigens*.

### 2.2.3 Genes que participan en la fijación de nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es un proceso que requiere de mucha energía (16-24 ATP) y se lleva a cabo por una serie de reacciones químicas, el esquema puede observarse en la figura 1 La reducción del  $N_2$  a amoníaco se realiza mediante un complejo enzimático que se conoce como nitrogenasa; está compuesto por dos unidades proteicas: el componente reductasa o proteína Fe y el componente catalítico o proteína MoFe (Oldroyd & Dixon, 2014). Tres clases de nitrogenasas homólogas han sido reportadas: la de Molibdeno (Mo), la de Vanadio (V) y la de hierro (Fe) (Seefeldt, Yang, Duval & Dean, 2013); la más estudiada de estas es la nitrogenasa Mo de *Azotobacter vinelandii*, que está formada por una proteína Fe (o *nifH*) y una proteína MoFe (o *nifKD*) (Hu & Ribbe, 2013).

Debido a lo complejo de este mecanismo bioquímico, un gran número de genes son necesarios para el ensamble y funcionamiento de la nitrogenasa y son conocidos como genes *nif* (de nitrogen fixation), estos se mencionan con detalle en la tabla 1 (Oldroyd & Dixon, 2014). La estructura de la nitrogenasa de *Klebsiella pneumoniae* y los 20 genes que la conforman están representados en la Figura 2, en donde además se puede apreciar que los

genes de la estructura de la nitrogenasa (*nifH*, *nifD* y *nifK*) están coloreados de acuerdo a la estructura “de cristal” mostrada en (b).

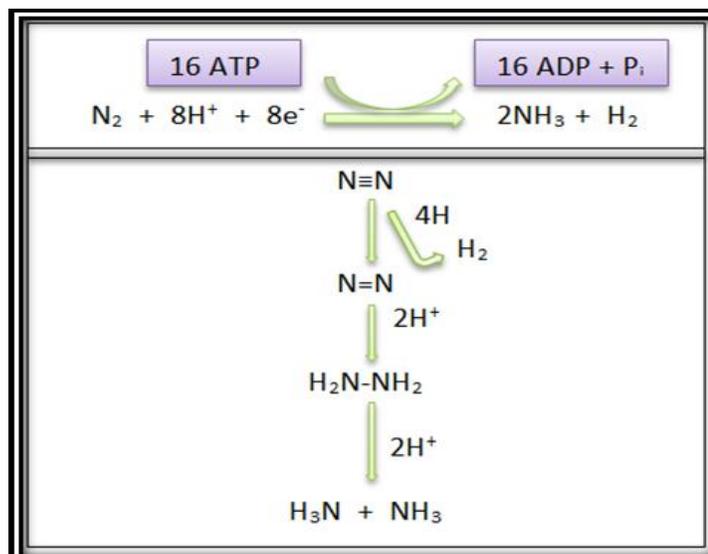


Figura 1. Reacciones químicas que suceden en la fijación biológica de nitrógeno.  
Fuente: Fuentes & Massol-Deyá (2002).

Los demás genes están codificados en colores de acuerdo a sus funciones: rojo oscuro, maduración de la proteína Fe (*nifM*); azul claro, biosíntesis del coFeMo (*nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifV*, *nifB*, *nifQ*); amarillo, biosíntesis del cluster Fe-S (*nifU*, *nifS*, *nifZ*); verde, transporte de electrones (*nifJ*, *nifF*); naranja, regulación transcripcional (*nifL*, *nifA*); gris, funciones desconocidas (*nifT*, *nifW*). En la parte (b) de la Figura 2, se ve la estructura del complejo enzimático de la nitrogenasa mostrando los componentes proteicos MoFe y Fe, con los tres metaloclusters señalados en la mitad izquierda del complejo (abreviado como F, [4Fe4S]; P, complejo P y M, co-FeMo, respectivamente). La hidrólisis de ATP por la proteína Fe, la ruta de transferencia del electrón al sitio catalítico y la reacción enzimática también son ilustradas en la mitad izquierda de la estructura. Por último en (c) se observa la estructura de

los tres metaloclusters en la nitrogenasa. Los genes requeridos para la biosíntesis de cada complejo se ilustran debajo.

Por otro lado, si bien los genes son comunes en la mayoría de los sistemas, su organización, contenido y regulación son diferentes entre géneros; en la figura 3 se puede apreciar una comparación entre la organización de los genes *nif* de la cepa A1501 de *Pseudomonas stutzeri* con los de las cepas AvOP de *Azotobacter vinelandii*, BH72 de *Azoarcus* sp, M5a1 de *Klebisella pneumoniae* y Sp7 de *Azospirillum brasilense*.

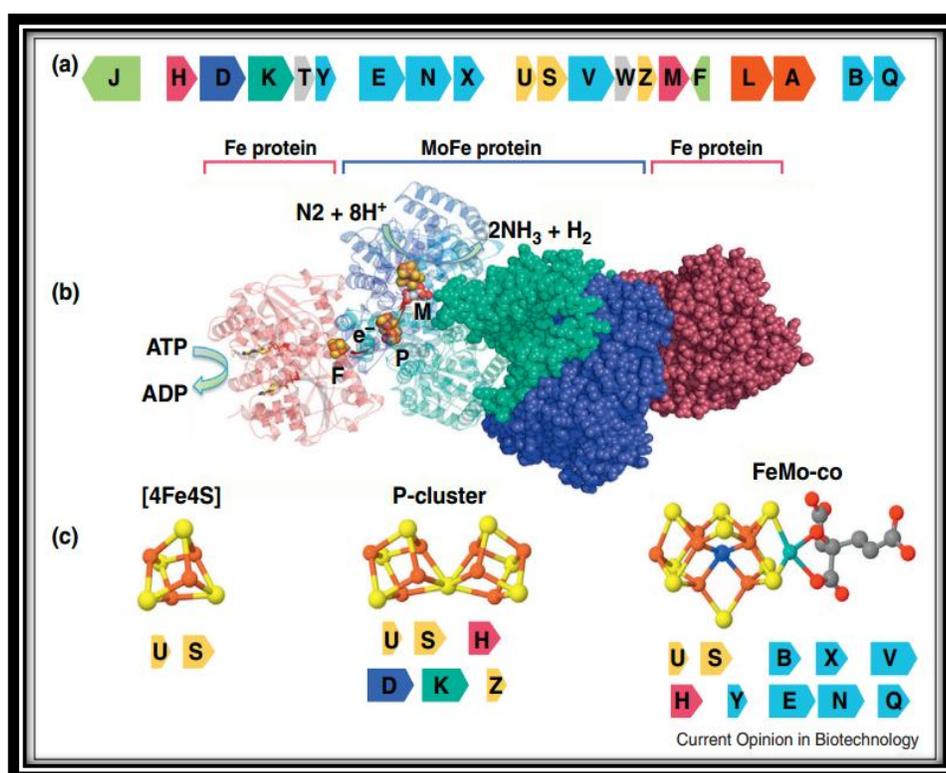


Figura 2. Estructura de la nitrogenasa y los genes requeridos para su biosíntesis. (Descripción en el texto).

Fuente: Oldroyd & Dixon (2014)



**Tabla 1** Genes *nif* y su función en el complejo nitrogenasa

Gen ( <i>nif</i> )	Función
<b>H</b>	Reductasa dinitrogenasa (proteína Fe): dímero $\alpha_2$ , centro $Fe_4S_4$ . Múltiples roles: catálisis, síntesis de FeMo-co, inserción de FeMo-co, regulación de los sistemas <i>vnf</i> , <i>anf</i> .
<b>KD</b>	Dinitrogenasa (proteína MoFe); tetrámero $\alpha_2\beta_2$ , contiene 2 FeMo-co 2 'P' cluster tetrámeros. Reducción de sustrato.
<b>J</b>	Piruvato flavodoxina oxidoreductasa; dímero $\alpha_2$ , centro FeS. Dona electrones al flavodoxin
<b>F</b>	Flavodoxina; dona electrones a la reductasa dinitrogenasa.
<b>A</b>	Regulación positiva
<b>L</b>	Regulación negativa
<b>Q</b>	Incorporación del molibdeno a la nitrogenasa
<b>B</b>	Biosíntesis de FeMo-co. Proteína FeS oxígeno-lábil. Unido a la membrana en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .
<b>NE</b>	Biosíntesis de FeMo-co; tetrámero $\alpha_2\beta_2$ , con significado similar a <i>nifKD</i> . Proteína FeS oxígeno-lábil
<b>V</b>	Biosíntesis de FeMo-co sintasa homocitrato.
<b>S</b>	S-tranferasa dependiente de cisteína; Desulfurasa cisteína homodimérico, activación S en la síntesis grupo metalo.
<b>M</b>	Se requiere para procesar <i>nifH</i> .
<b>Y</b>	Ataca la apodinitrogenasa para permitir la inserción del FeMo-co.
<b>Z</b>	Activación y maduración de la proteína FeMo.
<b>W</b>	Maduración y activación; protección del oxígeno de la proteína FeMo.
<b>U</b>	Procesamiento de la proteína FeMo.
<b>X</b>	Biosíntesis del FeMo-co. Regulación negativa.
<b>T</b>	Maduración de la nitrogenasa.

Fuente: La información para construir la tabla fue tomada de Ludden (1993) y Castillo (2005).

#### 2.2.4 Mecanismos moleculares de identificación bacteriana

Los análisis moleculares en la actualidad están bien establecidos y entre los más utilizados se encuentran la identificación mediante el gen ADN ribosomal ARNr 16S, la PCR y la secuenciación (Griffiths *et al.*, 2000). El gen ADN ribosomal ARNr 16S es un gen que codifica para el polirribonucleótido ARNr 16S, que indica conservación; es una diana muy empleada para identificar bacterias y tiene un tamaño de 1500 pb (pares de bases) aproximadamente (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto & Valdezate, 2011).

Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa, es una importante técnica que permite amplificar un pequeño fragmento de ADN y obtener millones de copias; normalmente se emplean diferentes temperaturas y varias repeticiones que van a simular procesos naturales como la desnaturalización de la doble hélice, la unión de los cebadores y la síntesis de la cadena complementaria utilizando la enzima ADN polimerasa (Serrato, Flores, Aportela & Sierra, 2014).

Otra importante técnica molecular es la secuenciación. Hace aproximadamente 40 años se desarrollaron dos procesos: la secuenciación química y la secuenciación enzimática, pero en la actualidad ya se empieza a hablar de la secuenciación masiva. Para el caso de la secuenciación enzimática, ésta consiste en parar de forma controlada la replicación del ADN *in vitro*. Luego se hace una PCR del fragmento que se desea secuenciar pero utilizando sólo un cebador y se adicionan dideoxinucleótidos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3' y están marcados con radiactividad o con fluoróforos. Cuando se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena en elongación, se termina su amplificación, así al final, se tienen fragmentos de diferente longitud y cada uno termina en un ddNTP. Los fragmentos que

se obtienen, se separan y analizan por medio de electroforesis (Márquez, Serrato & Cerritos, 2014).

### 2.3 Marco legal

**LEY 100 ARTÍCULO 245/1993.** Congreso de la República de Colombia. El cual tiene como objeto la ejecución de las políticas del INVIMA en materia de vigilancia sanitaria y control de calidad de medicamentos, alimentos, productos biológicos. Y aquellos productos generados por biotecnología.

**RESOLUCIÓN 1115 de 2000.** Ministerio del Medio Ambiente. Por medio de la cual se determina el procedimiento para el registro de colecciones biológicas con fines de investigación científica.

**DECRETO XX DEL XX DE 2011.** Por el cual se reglamenta el acceso a los recursos genéticos, sus productos derivados, los conocimientos tradicionales asociados y la distribución justa y equitativa de beneficios derivados de su utilización y se dictan otras disposiciones.

**DECRETO 1375 DE 2013.** Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Por el cual se reglamentan las colecciones biológicas.

### 2.4 Hipótesis de investigación

Las 12 cepas evaluadas, según identificación molecular, pertenecen al género *Pseudomonas* y algunas de ellas presentan el gen *nifH*.

### 3 Diseño metodológico

#### 3.1 Tipo de investigación

La investigación que se desarrolló fue de tipo cuasi-experimental ya que se utilizaron técnicas de laboratorio para extraer ADN de microorganismos, compararlos y escoger el mejor; además de la evaluación de cebadores en el proceso de PCR modificando las concentraciones los reactivos para posterior secuenciación.

#### 3.2 Universo y muestra

##### 3.2.1 Universo

Para este proyecto la población fue finita y accesible y corresponde a 12 cepas que se caracterizaron bioquímicamente como *Pseudomonas* sp fluorescentes que se encuentran conservadas en el banco de cepas del Laboratorio de Investigación en Biología Aplicada UFPS.

##### 3.2.2 Muestra

Para el proceso de comparación de protocolos de ADN se empleó un muestreo probabilístico sistemático debido a que las bacterias objeto de estudio se encuentran ordenadas y numeradas en el banco de cepas (Lagares & Puerto, 2001), en donde se escogieron sólo tres de ellas para comparar los métodos de extracción de ADN. Según esto, la población (N) es 12, mientras que la muestra deseada (n) es 3, por lo tanto el factor de elevación ( $v = N/n$ ) es 4.

Se eligió como primera muestra la cepa RZH133, por lo que la segunda fue RZH137 y la tercera RZH141, quedando definida la muestra (Sampieri, Fernández, & Baptista, 2015).

### **3.3 Variables**

#### **3.3.1 Variables independientes.**

Los métodos de extracción de ADN, los protocolos de PCR, los cebadores que se utilizaron para la secuenciación del gen ARNr 16S y los cebadores empleados para la amplificación del gen *nifH*

#### **3.3.2 Variables dependientes.**

Las 12 bacterias que se evaluaron en la investigación

### **3.4 Operacionalización de las variables**

Para el análisis de las variables se realizarán diferentes experimentos; los métodos de extracción se realizarán sólo para la muestra y el método más eficiente se aplicará a las 12 bacterias. En los protocolos de PCR se realizarán 10 ensayos con los cebadores para secuenciación del gen ARNr 16S y diferentes ensayos con los cebadores para amplificación del gen *nifH* dependiendo del grupo analizado.

### 3.5 Fases de la investigación

#### 3.5.1 Reactivación de las cepas.

Las cepas utilizadas en este proyecto fueron aisladas de diferentes cultivos de hortalizas de Villa del Rosario, Norte de Santander; fueron caracterizadas fisiológicamente como PGPR's y bioquímicamente como *Pseudomonas* sp fluorescentes. Estas bacterias se encontraban conservadas en solución salina a 4°C en el banco de cepas del Laboratorio de Biología Aplicada de la UFPS y estaban enumeradas mediante códigos establecidos por el laboratorio, que van de RZH133 hasta RZH144 en orden consecutivo. Para reactivarlas, se tomó un tubo de cada cepa, se inoculó en caldo DYGS y se incubó en agitación constante de 120 rpm a 37°C por 24 horas, después de este periodo se realizaron pases del caldo a cajas con medio King B para observar fluorescencia y se realizó tinción de Gram para asegurar la pureza de los cultivos.

#### 3.5.2 Comparación de métodos de extracción de ADN.

**3.5.2.1 Protocolo modificado de Reinhardt et al. (2008):** Se cultivaron los microorganismos en caldo Luria-Bertani (LB) a 30°C durante 18h, se extrajo 10 mL y se centrifugó a 4180 g durante 20 min. Las células precipitadas luego se re-suspendieron en 1 mL de TE-lisozima (50 mM Tris, pH 8,0; 50 mM EDTA, 1 mg / mL de lisozima) y se incubaron durante 30 min a 37°C, posteriormente se adicionaron 2,5 mL de buffer de extracción (100 mM Tris, pH 8,0; 100 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 1% CTAB) y 12 µL de proteinasa K (20 mg/mL) e incubaron por 1h a 37°C. Después se añadió 250 µL de SDS al 20% y 150 µL de acetato de potasio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K) 5M y se incubó a 65°C

durante 20 min. Pasado este tiempo, se adicionó 3 mL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1), se centrifugó por 35 min/4180 g, se repitieron los 2 pasos anteriores y se precipitó el ADN con 6 mL de isopropanol. Se centrifugó a 1050 g/10 min, se descartó el sobrenadante y luego se lavó el precipitado con 700  $\mu$ L de etanol al 70%; se centrifugó nuevamente a 1050 g/10 min y el pellet se resuspendió en 300  $\mu$ L de tris-HCl 10mM y EDTA 0.1M (pH 8.0) y 1,2  $\mu$ L de RNasa (10mg/mL), esto se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó por 1h a 37°C; posteriormente se precipitó el ADN con 9  $\mu$ L de Acetato de Sodio (CH<sub>3</sub>COONa) 3 mM y 600  $\mu$ L de etanol frio al 70%, se centrifugó a 10000 g por 3 min, se lavó nuevamente con etanol al 70%, se centrifugó a 10000 g, se descartó el etanol, se dejó secar y se re-suspendió en 100  $\mu$ L de buffer TE. Se almacenó a -20°C.

**3.5.2.2 *Protocolo modificado de Falcón & Valera (2007):*** Se obtuvo un cultivo nuevo de bacterias y se colocó 1 mL en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó a 8000 g por 5 min y se descartó el sobrenadante, las células se re-suspendieron en 0.5 mL de sulfato de magnesio 10 mM. Se centrifugó a 4500 g por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió en 300  $\mu$ L de buffer Tris HCl 0.1M pH 8 y se adicionó 40  $\mu$ L de lisozima (20 mg/mL) y 5 $\mu$ L de RNasa (7000 U/mL). Se incubó a 37°C por 5 min, posteriormente a -20°C durante 10 min y finalmente a 65°C durante 10 min, entre cada incubación, se mezcló vigorosamente. Se agregó 20  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó a 70°C durante 10 min, durante la incubación se invirtió manualmente 5-10 veces. Se centrifugó a 8000 g durante 2 min, se recuperó el sobrenadante (aprox. 250  $\mu$ L) y se transfirió a un tubo nuevo en el que se adicionó

150  $\mu$ L de isopropanol absoluto frío (a  $-20^{\circ}$  C), se incubó a  $-20^{\circ}$ C durante 30 min y después se centrifugó a 12000 g durante 3 min. Se eliminó perfectamente el sobrenadante, se limpió el pellet con 300  $\mu$ L de etanol al 70% y se agitó brevemente con vórtex. Se centrifugó a 10000 g por 3 min y luego se eliminó perfectamente el alcohol. Se secó perfectamente el pellet a  $65^{\circ}$ C por 5 min y se re-suspendió en 100  $\mu$ L de buffer Tris-HCl 10mM - EDTA 0.1M (pH 8.0) estéril.

**3.5.2.3 Extracción de ADN según el kit *Isolate II Genomic DNA*:** Los microorganismos se cultivaron en caldo LB en las mismas condiciones que en los métodos anteriores y se siguieron las instrucciones del manual para la extracción de material genético de bacterias, consignadas en las páginas 9-10 (Bioline®). Se realizó una pre-lisis y lisis de las células, posteriormente se procesó la muestra en columnas de spin con membrana de sílica y se precipitó el ADN para conservarlo a  $-20^{\circ}$ C.

### **3.5.3 Visualización y cuantificación del ADN**

La integridad del ADN obtenido se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa 0.8%, con Bromuro de etidio (0.25 $\mu$ g/mL), a 120V por 40 min en tampón 0.5X TBE [50 mL TBE 10X (Tris base 0.89M, ácido bórico 0.89M y EDTA pH 8 20mM) en 950 mL de agua destilada]. Para determinar la calidad y concentración, las muestras se diluyeron 1:300 en buffer TE a un volumen final de 1500  $\mu$ L, cada una por duplicado y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 260/280 nm en un espectrofotómetro BIOMATE 3S UV-Visible de Thermo Scientific; finalmente se calcularon los promedios de cada cepa y de cada método de extracción.

### 3.5.4 Amplificación del gen ARNr 16S.

Para la amplificación del gen ARNr 16S, se analizaron los cebadores 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Rohwer, Breitbart, Jara, Azam & Knowlton, 2001) y los cebadores Bact Forward (GATCCTGGCTCAGGATGAAC) y Bact Reverse (GGACTACCAGGGTATCTAATC) (Solano, 2010). Se realizaron diferentes ensayos para cada grupo de cebadores y cada uno de ellos contenía 1x Buffer de reacción, 200  $\mu$ M desoxirribonucleótidos trifosfato [dNTP's] y 2 mM MgCl<sub>2</sub> excepto P3 que fue de 1.5 mM; además, se empleó 1.25U Taq DNA Polimerasa para los cebadores 27F/1492R y 1U de enzima para los cebadores Bact. Se evaluaron diferentes cantidades de cebadores y ADN como se muestra en la tabla 2, con un volumen final de 25  $\mu$ L. La amplificación se realizó en un termociclador Multigene Optimax (Labnet) y las condiciones fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 30s, alineamiento 57°C por 45s, extensión 72°C por 90s y 1 ciclo de extensión final 72°C por 7 min para el conjunto 27F/1492R y 1 ciclo de desnaturalización inicial 94°C por 2 min, 30 ciclos de desnaturalización 94°C por 1min, alineamiento 56°C por 1min, extensión 72°C por 1 min y 1 ciclo de extensión final 72°C por 5 min para el conjunto Bact. Para la prueba inicial sólo se manejó la cepa RZH133 debido a la cantidad de reactivos y posteriormente se aplicó a las 12 bacterias.

Los fragmentos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa 2% con 0.25  $\mu$ g/mL de Bromuro de etidio en buffer TBE 0.5X, corrido a 60V por 180 min. Para determinar el tamaño de las bandas se utilizaron dos marcadores de peso molecular, HyperLadder™ 100 bp (Bioline) y Ready to use 100 bp DNA Ladder (Biotium).

**Tabla 2** *Condiciones de los ensayos de PCR para amplificación del gen ARNr 16S*

Conjunto de cebadores	Ensayo	Cebadores [ $\mu$ M]	ADN ( $\mu$ L)
27F/1492R	P1	0.2	0.5
	P2	0.2	1
	P3	0.5	0.5
	P4	0.5	0.5
	P5	0.5	1
	P6	1	0.5
BactF/BactR	B1	0.3	0.5
	B2	0.3	1
	B3	0.5	0.5
	B4	0.5	1

### 3.5.5 Secuenciación del gen ARNr 16S

Se realizó PCR para amplificar el gen ARNr 16S en las 12 bacterias de estudio, siguiendo las condiciones ya mencionadas a un volumen final de 50  $\mu$ L, las muestras fueron embaladas y enviadas a la corporación CorpoGen para su secuenciación.

### 3.5.6 Análisis de secuencias y construcción del árbol filogenético

Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa DNA baser versión 4.3 (Heracle BioSoft, 2013), en el cual se crearon las secuencias consenso y los resultados se analizaron mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), de The European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) y de DNA Data Bank of Japan

(<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>). Para la construcción del árbol filogenético se obtuvieron del Genbank secuencias ARNr 16S de especies bacterianas relacionadas taxonómicamente a los microorganismos estudiados y como grupo externo se incluyó a *E. coli* (JN180970) que corresponde a una especie alejada taxonómicamente del grupo de microorganismos evaluados. Las secuencias se alinearon usando CLUSTALW del programa MEGA6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski & Kumar, 2013) y la construcción de la filogenia molecular se realizó usando el test Neighbor-Joining (NJ) con el método p-distance con 1000 repeticiones *bootstrap*.

### **3.5.7 Amplificación de fragmentos del gen *nifH***

Se evaluó la efectividad de amplificación de 5 pares de cebadores (tabla 3). Se realizó una primera prueba para cada grupo a un volumen final de 25  $\mu$ L, que contenía Buffer de reacción 1x, dNTP's 0.2 mM, 1U de Taq polimerasa para los grupos 1 y 2, 1.25U para los restantes. La desnaturalización inicial se realizó a 94 °C por 5 min, mientras que la extensión final fue a 72 °C por 7 min. Las concentraciones de los demás reactivos y las condiciones de amplificación se encuentran consignadas en la tabla 4.

Para los ensayos se utilizaron las cepas RZH133, RZH134, RZH135, como referencia las cepas AS7 y AS9 identificadas bioquímicamente como *Azospirillum*, donadas por el Laboratorio de Biología Aplicada de la UFPS. Los fragmentos amplificados se visualizaron de acuerdo al proceso ya descrito y se analizaron en un fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

**Tabla 3** *Secuencias de cebadores usados para amplificación de nifH*

Grupo de cebadores	Nombre cebador	Secuencia cebador (5' - 3')	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
1	nifH19F	GCIWTITAYGGNAARGGNGG	476	Widmer et al, 1999.
	nifH3	ATRTTRTTNGCNGCRTA		Zani et al, 2000
2	Nh21F	GCIWTYTAYGGNAARGG	476	Deslippe et al, 2005
	nifH3	ATRTTRTTNGCNGCRTA		Zani et al., 2000
3	F1	TAYGGNAARGGNGGNATYGGNAA RTC	451	Marusina et al., 2001
	nifH-r	ADNGCCATCATYCTNCC		Zehr & McReynolds, 1989
4	PolF	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	362	Poly et al, 2001
	PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA		
5	nifH-g1-f	GGTTGTGACCCGAAAGCTGA	371	Bürgmann et al, 2004
	nifH-g1-r	GCGTACATGGCCA1TCATCTC		

Posteriormente se seleccionó un ensayo para cada grupo de cebadores y se realizó la amplificación para las 12 cepas estudiadas, según las condiciones ya establecidas. Los amplicones obtenidos se observaron en gel de agarosa 1.5% con Bromuro de etidio 0.25 µg/mL y la electroforesis se corrió a 60 V/ 150 min. Las imágenes se analizaron en el fotodocumentador ya mencionado.

**Tabla 4** Condiciones de PCR empleadas para evaluar cebadores del gen *nifH*

Ensayo	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Cebador [μM]	ADN [μL]	Temperaturas y tiempo de PCR			Número de ciclos				
				Desnaturalización	Hibridación	Elongación					
N1	2	1	0.5								
N2	2	1	1								
N3	2	2	0.5								
N4	2	2	1								
N5	2	3	0.5								
N6	2	3	1								
N7	3	1	0.5								
N8	3	1	1								
N9	3	2	0.5	94 °C / 45 s	48 °C / 60 s	72 °C / 60s	28				
N10	3	2	1								
N11	3	3	0.5								
N12	3	3	1								
N13	4	1	0.5								
N14	4	1	1								
N15	4	2	0.5								
N16	4	2	1								
N17	4	3	0.5								
N18	4	3	1								
H1	1.5	0.5	0.5								
H2	1.5	0.5	1								
H3	2.5	0.5	0.5								
H4	2.5	0.5	1	94 °C / 45 s	46 °C / 45 s	72 °C / 30s	28				
H5	1.5	1	0.5								
H6	1.5	1	1								
H7	2.5	1	0.5								
H8	2.5	1	1								
R1	1.5	1	1								
R2	1.5	2	1					94 °C / 60 s	57 °C / 60 s	72 °C / 90s	30
R3	2	1	1								
R4	2	2	1								
G1	3	1	1								
G2	1.5	1	1	94 °C / 30 s	56 °C / 60 s	72 °C / 45s	30				
L1	1.5	0.5	0.5								
L2	1.5	0.5	1								
L3	1.5	1	0.5								
L4	1.5	1	1	94 °C / 60 s	55 °C / 60 s	72 °C / 60s	30				
L5	1.5	3	0.5								
L6	1.5	3	1								
L7	2	0.5	0.5								
L8	2	0.5	1								

*Nota:* Las letras representan los grupos de cebadores como sigue; N, grupo 1; H, grupo 2; R, grupo 3; L, grupo 4 y G, grupo 5.

## 4 Discusión y Análisis de Resultados

### 4.1 Reactivación de las cepas

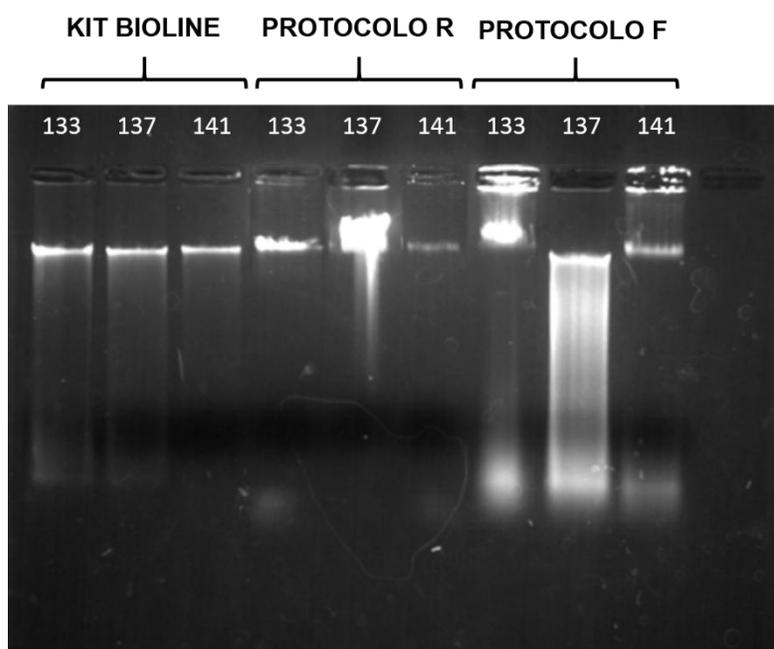
Se reactivaron 12 cepas en caldo DYGs y posteriormente se sembraron en medio King B, en donde se pudo determinar la viabilidad y también la fluorescencia de cada cepa cuando se observaron bajo luz ultravioleta; además se confirmó la pureza de las bacterias al realizar tinción de Gram y observar bacilos Gram (-) (Anexo 1); estos son algunos de los distintivos que caracterizan a las *Pseudomonas* fluorescentes (Moore et al., 2006).

### 4.2 Comparación de métodos de extracción de ADN

Se realizó extracción de ADN genómico de las cepas RZH133 (1), RZH137 (2) y RZH141 (3) comparando tres métodos diferentes, con todos los protocolos fue posible la obtención de ADN aunque con diferentes características (figura 4). Las muestras de la extracción realizada con el kit Isolate II Genomic DNA (representadas con la letra K), constituyen material genético íntegro; mientras que para la extracción según Reinhardt (2008) (letra R) se observó en la electroforesis barridos de ADN para la cepa RZH137 y en el protocolo según Falcón y Valera (2007) (letra F), las tres muestras resultaron con barrido; como lo señalan Alejos, Aragón, & Cornejo (2014), estos barridos indican que las muestras resultaron fragmentadas durante el proceso de extracción.

El género de *Pseudomonas* es conocido por la producción de exopolisacáridos, que son compuestos de gran interés biotecnológico y están relacionados a diversos mecanismos (defensa, deshidratación, patogenicidad, entre otros) de los microorganismos (Alanís & Guerrero, 2004). El comportamiento distintivo de la cepa RZH137 se puede atribuir a una

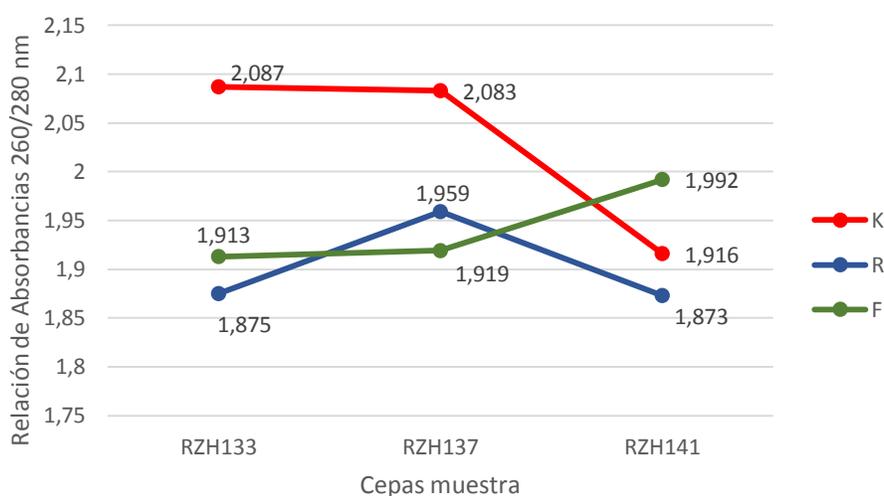
gran producción de estos polisacáridos, ya que como aseguran Iglesias et al. (2008), la producción de estos compuestos representa elevada dificultad a la hora de extraer los ácidos nucleicos; esto se observó en los ensayos según Reinhardt (2008) y según Falcón y Valera (2007), pues las muestras se tornaban viscosas en la separación de los componentes celulares. Por el contrario, cuando se utilizó el kit Isolate II Genomic ADN este problema no se presentó, puesto que uno de los pasos más importantes del protocolo consistió en pasar las muestras por tubos de spin con membranas de poros que sólo permitieron el paso del ADN.



*Figura 4.* Comparación de los métodos de extracción evaluados. 133: RZH133, 137: RZH137, 141: RZH141, Protocolo R: según Reinhardt et al y Protocolo F: según Falcón y Valera.

En cuanto a la proporción de Absorbancias 260/280 nm arrojadas por el espectrofotómetro (figura 5), se aprecia que en los métodos R y F, todos los valores se encuentran dentro del rango 1.8-2.0 que indica un ADN puro libre de proteínas y contaminación; mientras que para el protocolo K, sólo la cepa RZH141 se encontró en este

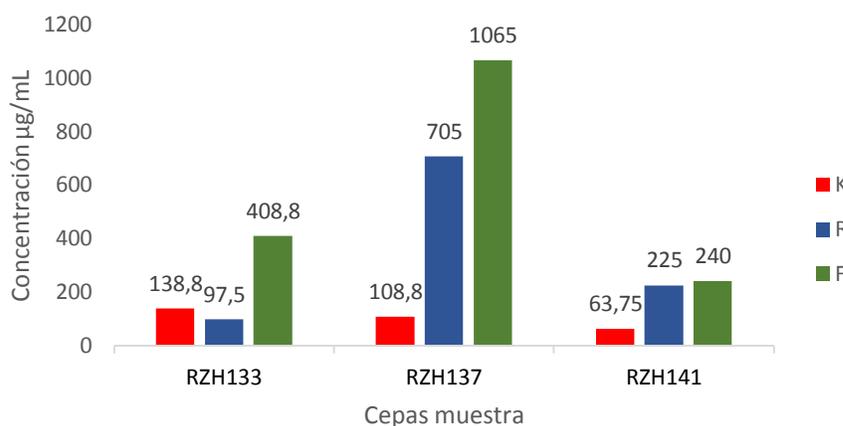
rango y en las otras dos se obtuvieron valores ligeramente por encima de 2, lo que significa presencia de ARN (Devereux & Wilkinson, 2004; Romani, Artigas, Camacho, Graca & Pascoal, 2009); esto se sustenta en que en este procedimiento no se empleó RNAsa para su eliminación y se ve reflejado en el ensayo de espectrofotometría. Se aclara que en el manual del fabricante se recomienda el uso de esta enzima si se desea un ADN libre de ARN pero no viene incluido en el kit.



*Figura 5.* Comparación de la pureza del ADN por la relación de absorbancias 260/280 nm. Las letras K, R y F representan los métodos de extracción por kit, según Reinhardt y según Falcón y Valera, respectivamente.

Además, de acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis por espectrofotometría, la concentración obtenida en las muestras RZH137 Y RZH141 en el protocolo R y la concentración de todas las muestras en el protocolo F fue superior respecto al kit, con una diferencia significativa nuevamente para la cepa RZH137 (figura 6), en donde cabe mencionar que se obtuvieron concentraciones de 705 y 1065  $\mu\text{g/mL}$  para F y F, respectivamente.

Según la casa comercial de Bioline (<http://www.bioline.com/us/isolate-ii-genomic-dna-kit.html>), las muestras que se obtienen al utilizar el kit de extracción son de alta calidad y la concentración obtenida supera los 35  $\mu\text{g}$ , estos son datos que se pudieron confirmar en esta investigación; también anuncian que la pureza debe estar representada con valores entre 1.7-1.9, lo que difiere con los datos obtenidos. Aun así, en investigaciones previas realizadas por Caprar, Cantor, Sicora, Copaci & Sicora (2014), se evaluó este método y se obtuvieron concentraciones en un rango de 74.5-112.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , en cuanto a pureza el rango en la relación de absorbancias fue de 1.9-2.1; lo que presenta una mayor concordancia con los resultados conseguidos.



*Figura 6.* Comparación de las concentraciones de ADN mediante espectrofotometría. Las letras K, R y F representan los métodos de extracción por kit, según Reinhardt y según Falcón y Valera, respectivamente.

Por otra parte, como reportan Iglesias, Luna, & López (2003), quienes evaluaron un protocolo similar al de Reinhardt, las muestras obtenidas mediante esta técnica fueron de muy buena calidad, basándose en los resultados obtenidos en la relación de absorbancias (260/280 nm) en la que obtuvieron un valor de 1.7; mientras que Borges et al. (2009) analizaron en este

protocolo, que las muestras al visualizarse mediante electroforesis presentaron gran cantidad de ADN pero se observaron barridos, concluyendo la impureza de las extracciones; ambos resultados coinciden con los de este estudio.

En cuanto al procedimiento propuesto por Falcón y Valera (2007), los autores señalan que en sus experimentos se ha logrado tener grandes cantidades de ADN pero con la desventaja de que para algunos organismos se pueden presentar impurezas representadas en una muestra fragmentada, lo que concuerda con los resultados de la presente investigación.

Igualmente, para la selección del método de extracción se tuvo en cuenta el tiempo en que se desarrolló cada protocolo y el rendimiento que se obtuvo a partir del volumen inicial (tabla 5). De acuerdo a esto, el método K sólo tomó 4.5h en desarrollarse, es decir que fue un procedimiento rápido y sencillo, en comparación al método R que demandó por poco el doble de tiempo para realizarse, mientras que el protocolo F se encontró en un tiempo intermedio. En el caso del rendimiento por mililitro de partida, basado en los resultados de los análisis por espectrofotometría, el mayor resultado se evidenció para el método F el cual fue aproximadamente 5 y 10 veces mayor que los métodos K y R respectivamente. En la tabla 5 se consignaron también los promedios de la proporción Abs 260/280 nm y los promedios de concentración para cada método evaluado.

Teniendo en cuenta todos los aspectos evaluados, el protocolo que se destacó por sus resultados en los ensayos de espectrofotometría fue el propuesto por Falcón y Valera (2007); sin embargo, se determinó que la extracción de ADN mediante el kit comercial, era el más viable para obtener el ADN genómico de las 12 cepas a evaluar; ya que además de desarrollarse en corto tiempo, tener una pureza de valores aceptables y generar una buena concentración de ADN, presentó muestras íntegras y dicho factor fue decisivo para su

elección, siendo relevante destacar que no se observó este distintivo en los demás protocolos evaluados; este último parámetro de ADN de buena calidad como lo afirman Clemente (2002) y Alejos et al. (2014), es fundamental si se desean datos confiables en técnicas posteriores como la PCR y la secuenciación, mientras que con un ADN fraccionado o contaminado es posible que no se logre la amplificación de los fragmentos deseados.

**Tabla 5.** Comparación de pureza y concentración de ADN, tiempo empleado y el rendimiento obtenido entre los protocolos evaluados

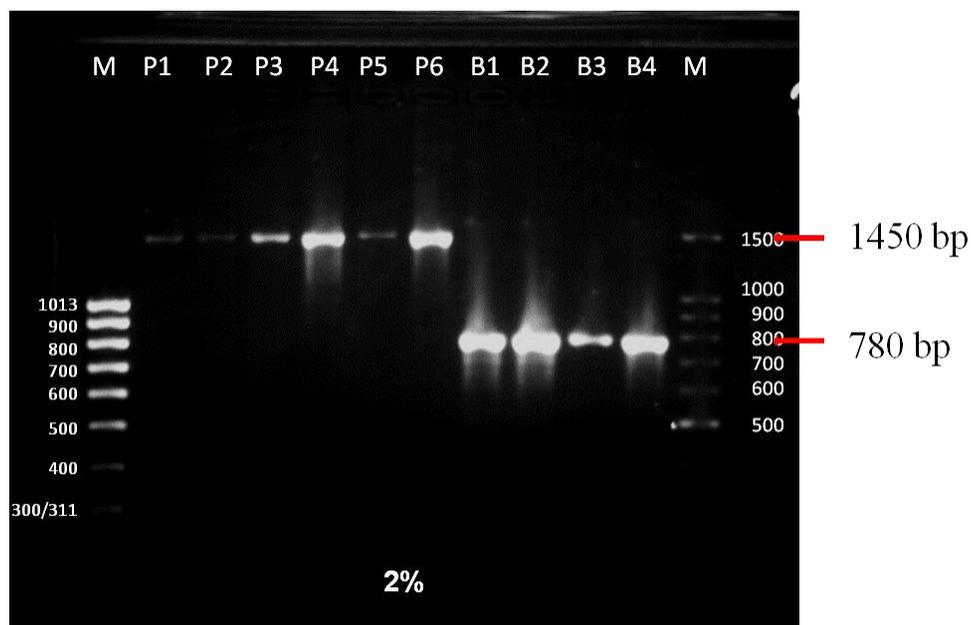
Método de extracción	Promedio Ab260/Ab280	Promedio [µg/mL ]	Tiempo de extracción	Rendimiento (µg ADN/mL de partida)
Kit Isolate II Genomic DNA	2.0292	103.75	4.5h	103.75
Modificado de Reinhardt et al. (2008)	1.9025	342.50	8h	34.25
Modificado de Falcón & Valera (2007)	1.9415	571.25	6h	571.25

### 4.3 Amplificación del gen ARNr 16S

Se realizaron 6 ensayos con concentraciones diferentes de cebadores y cantidad de ADN, para el grupo de cebadores 27F/1492R; mientras que para el grupo BactF/BactR se realizaron 4. Los amplicones obtenidos para cada ensayo reflejaron el tamaño esperado al ser observados en gel de agarosa (Figura 7); las bandas fueron de aproximadamente 1450 pb para los cebadores 27F/1492R y de aproximadamente 750 pb para los cebadores BactF/BactR.

En los ensayos P1 y P2 se observaron bandas muy débiles que posiblemente se relacionan con la baja concentración de iniciadores que se empleó en ambas pruebas, debido a que esta condición puede ocasionar que la reacción tenga un bajo rendimiento (Cultek, 2006).

Así mismo se observa en el ensayo P5, en el que se infiere que la cantidad de ADN no era adecuada para esa concentración de cebadores.



*Figura 7.* Ensayos con los cebadores universales 27F/1492R y BactF/BactR. M: marcador de peso molecular

En los ensayos P3, P4 y P6 se observó una buena amplificación del fragmento, con un menor rendimiento de la prueba P3 comparada con las otras dos. Además, al comparar P4 y P6 se observa similar producto con un ligero barrido en la prueba P4; estos hechos se atribuye a la relación entre la concentración de  $MgCl_2$  y la concentración de cebadores, puesto que en P3 la relación fue de 1.5 mM/0.5  $\mu M$ , y al aumentar el  $MgCl_2$  en P4 (2 mM/0.5  $\mu M$ ) donde se esperaba mejor rendimiento, este resultado es posible que se causara amplificaciones inespecíficas que se vieron reflejados en un tenue barrido (Bolívar, Rojas & García-lugo, 2014); por otro lado, en el ensayo P6 se observó un producto de PCR de mejor calidad, esto se logró al utilizar una relación eficiente de 2 mM/1  $\mu M$  en las concentraciones de  $MgCl_2$  y

cebadores, respectivamente (Cultek, 2006; Devereux & Wilkinson, 2004; Martnez & Silva, 2004)

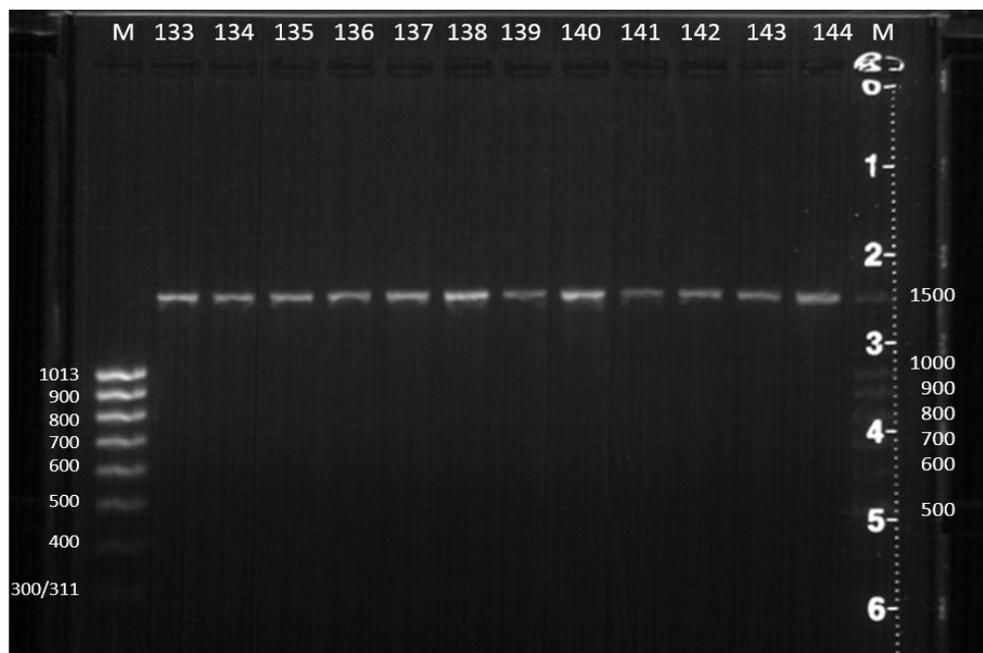
En contraste, para el grupo de iniciadores BactF/BactR, de los 4 ensayos analizados sólo B3 se observó con calidad aceptable para una posterior secuenciación, ya que en B1, B2 y B4 se apreciaron pequeños barridos e incluso tenues dímeros en B1 y B2. Resultados similares obtuvo Solano (2010) al emplear estos cebadores, puesto que detectó impurezas al visualizar los amplicones en el gel de agarosa y fue necesario que realizara purificación de los productos antes de ser llevados a secuenciación.

Al comparar los resultados de los grupos de cebadores, se escogió el ensayo P6 del conjunto 27F/1492R para replicarlo en las 12 bacterias objeto de estudio (figura 8) en un volumen final de 50  $\mu$ L y los productos obtenidos se enviaron a CorpoGen para ser secuenciados. Como lo mencionan diferentes estudios (Devereux & Wilkinson, 2004; Mao, Zhou, Chen & Quan, 2012), el grupo de iniciadores de uso más común para amplificar casi toda la longitud del gen ARNr 16S es 27F/1492R.

#### **4.4 Identificación molecular**

La secuenciación se realizó utilizando el cebador forward y el reverse, por lo que se obtuvieron dos secuencias para cada cepa (Anexo 2), por esto se editaron y se creó una secuencia consenso para cada bacteria. La importancia de este paso radica en que se evita la formación de falsos polimorfismos y además se logra alcanzar mayor longitud de la secuencia cuando se trabaja con fragmentos de más de 700 bp (Márquez et al., 2014) Después de comparar las secuencias consenso en las bases de dato de EBI, NCBI y DDBJ, se comprobó

que las 12 bacterias pertenecen al género *Pseudomonas* y se identificaron dentro de cinco especies diferentes (Tabla 6).



*Figura 8.* Amplificación del gen ARNr 16S de las 12 bacterias. M: Marcador de peso molecular, las cepas se encuentran en orden de la RZH133 a la RZH144, representadas por el número de su código.

El gen ARNr 16S tiene en una secuencia de aproximadamente 1500 bp, tamaño que genera polimorfismo suficiente para establecer diferencias (Bou et al., 2011); además, como lo afirman diferentes autores (Baker, Smith, & Cowan, 2003; Devereux & Wilkinson, 2004; Ferrera et al., 2007; Griffiths et al., 2000), este gen es ampliamente utilizado como diana molecular en análisis filogenéticos y presenta la gran ventaja de estar disponible en las bases de datos públicas (Rivas, Velázquez, Zurdo-Piñeiro, Mateos & Molina, 2004; Schuller, Sloots, James, Halliday & Carter, 2010).

**Tabla 6** Identificación de bacterias por secuenciación de ARNr 16S

Aislado	Genero/ Especie relacionada según ARNr 16S	Relación Bases de datos	
		Número de acceso	Porcentaje de similitud
RZH133	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.6%
RZH134	<i>Pseudomonas putida</i>	HQ162488	99.8%
RZH135	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.6%
RZH136	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.6%
RZH137	<i>Pseudomonas monteilli</i>	KJ5227911	99.9%
RZH138	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.7%
RZH139	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	JQ659779	100%
RZH140	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	JX088115	99.5%
RZH141	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HM067869	99.6%
RZH142	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KR349493	99.2%
RZH143	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.5%
RZH144	<i>Pseudomonas putida</i>	HM446003	99.7%

Según Bou et al. (2011), rangos de 95 al 99% de similitud son adecuados para determinar el género, mientras que una similitud de  $\geq 98.5\%$  es aceptada para definir la especie, siendo ideal  $>99\%$ . Como se aprecia en la tabla 6, los valores de similitud obtenidos para los microorganismos estudiados se encuentran de 99.2-100%, por lo que se pudo establecer una identificación de especie de estas bacterias.

Se ubicó a las cepas dentro de las especies *P. putida* (6), *P. aeruginosa* (2), *P. taiwanensis* (1), *P. moteilli* (1) y *P. alcaligenes* (1). Todas estas especies han sido reportadas como PGPR (Ahmad, Shinwari, Bashir, & Yasir 2013; Akhtar & Panwar, 2013; Pandya & Desai, 2014; Saharan & Nehra, 2011; Singh, Singh, Meena & Meena, 2015) lo que valida la caracterización fisiológica de estas bacterias en estudios anteriores (datos no mostrados).

Sin embargo, es importante señalar que la especie obtenida para la cepa RZH139, *P. alcaligenes*, a pesar de reconocerse como PGPR, es una bacteria que se reporta sin fluorescencia (Kwon et al., 2003). Es interesante que en los análisis filogenéticos la similitud de esta cepa con la especie resultó del 100%; dado que los cromatogramas de la secuenciación no presentaron inconvenientes, sería necesario realizar pruebas bioquímicas a esta bacteria para conocer sus características y realizar nuevamente extracción de ADN y secuenciación para descartar posible contaminación. Además, se debe destacar que al momento de reactivar esta bacteria, la fluorescencia de la misma fluctuaba (datos no mostrados), pero con los pases sucesivos en medio King B, se demostró la producción de pigmentos fluorescentes. Debido a esto, esta cepa se consideró *Pseudomonas* sp.

#### 4.5 Construcción del árbol filogenético

Con el fin de conocer la relación entre los microorganismos identificados se elaboró el árbol filogenético siguiendo el test de Neighbor Joining (Figura 9), con ayuda del programa MEGA6; para esto, se obtuvieron del GenBank las secuencias de 7 bacterias relacionadas taxonómicamente, además de *E. coli* como género no relacionado. Se observó que las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138, RZH143 y RZH144 se agruparon con alta similitud; de acuerdo a la comparación de sus secuencias en bases de datos, estas 7 bacterias se identificaron como *P. putida*. Las cepas RZH137 y RZH140 se agruparon y se encuentran altamente relacionadas con *P. plecoglossicida* y *P. guariconensis*; estas 2 cepas se identificaron como *P. monteilli* y *P. taiwanensis*, respectivamente. Además, estos 2 conjuntos también se encuentran relacionados, hecho que se explica debido a que las especies mencionadas pertenecen al grupo de *P. putida* (Anzai et al., 2000; Toro, Ramírez-Bahena,

Cuesta, Velázquez & Peix, 2013; Wang et al., 2010). Se aprecia la similitud entre las cepas RZH141 y RZH142, puesto que las 2 se identificaron como *P. aeruginosa*, también la cercanía de la cepa RZH139 identificada como *P. alcaligenes* con *P. pseudoalcaligenes*, relación que ya ha sido reportada (Ralston-Barrett, Palleroni & Doudoroff, 1976) y que soporta el análisis de comparación en las bases de datos para el resultado inusual de la cepa RZH139; por otro lado, la cercanía de estas 3 especies se basa en que hacen parte del grupo *P. aeruginosa*. El árbol demuestra que *E. coli* es una bacteria taxonómicamente alejada de las bacterias estudiadas.

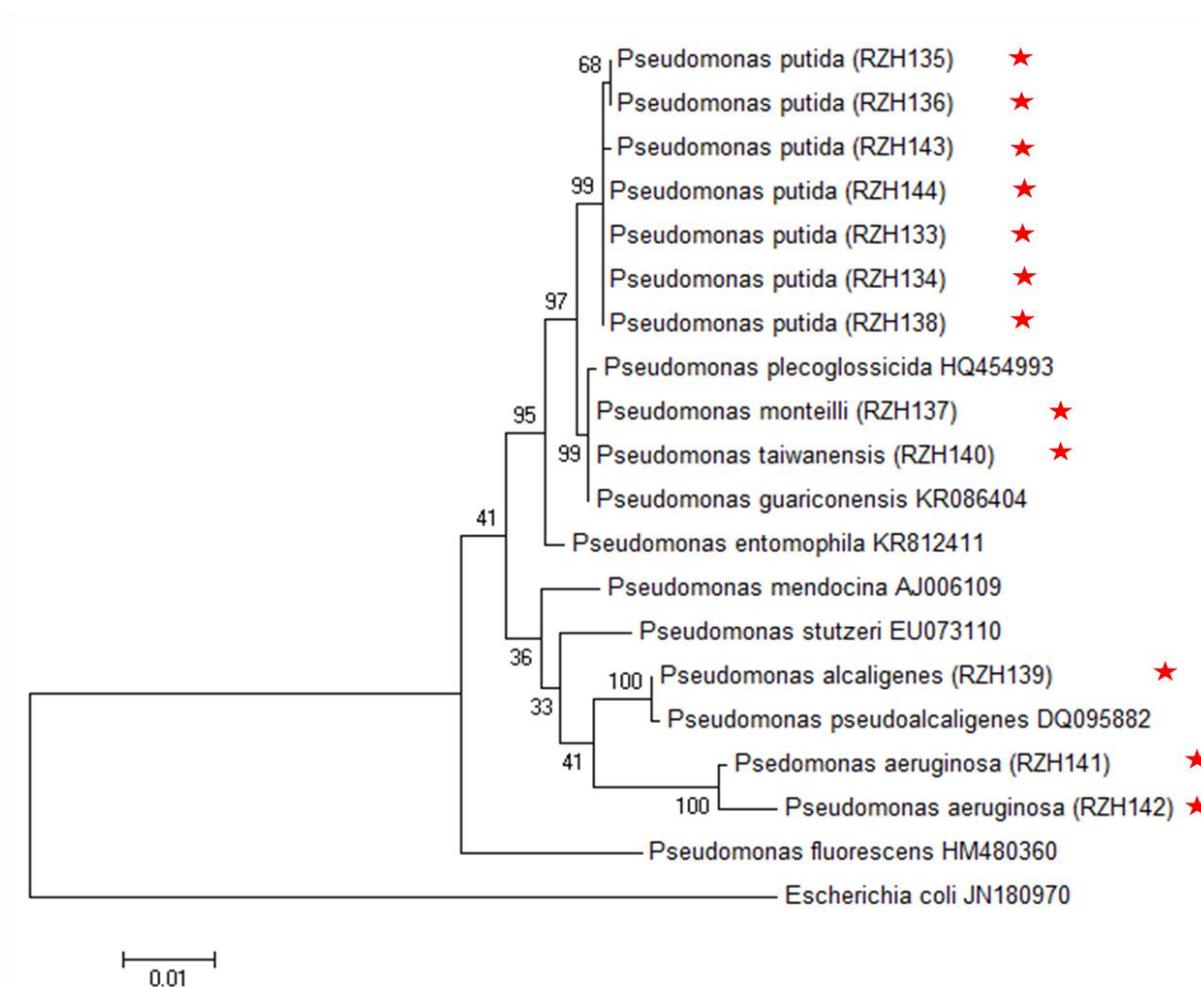


Figura 9. Árbol filogenético de las cepas evaluadas, usando el método de Neighbor-Joining y p-distance, basado en sus secuencias de ARNr 16S. Los números indican los resultados del análisis bootstrap de 1000 réplicas. Las cepas estudiadas se encuentran señaladas

#### 4.6 Amplificación de fragmentos del gen *nifH*

La fijación biológica de nitrógeno contribuye con aproximadamente  $180 \times 10^6$  toneladas métricas / año globalmente (Saharan & Nehra, 2011); aun así, esta capacidad sólo se ha atribuido a unas cuantas bacterias que se han denominado diazótrofes y que pertenecen a una amplia variedad de grupos taxonómicos (Dos Santos, Fang, Mason, Setubal & Dixon, 2012). Por mucho tiempo se creyó que el género *Pseudomonas* no hacía parte de este grupo, pero en los últimos años se han reportado algunas especies que pueden fijar nitrógeno (Addison, McDonald & Lloyd-Jones, 2010; Desnoues et al., 2003; Hatayama et al., 2005) y que propician a una atención especial para este género.

Se sabe que todos los organismos diazótrofes cuentan con el complejo enzimático de la nitrogenasa, que es la responsable de este importante proceso biológico (Deslippe et al., 2005; Desnoues et al., 2003). De los tres sub-tipos de nitrogenasa que se conocen, la mejor estudiada es la nitrogenasa dependiente de Molibdeno, que es codificada por los genes *nif* (Hu & Ribbe, 2013; Oldroyd & Dixon, 2014; Seefeldt et al., 2013); dentro de estos, el gen *nifH* está altamente conservado entre estos microorganismos, por lo que es un marcador ideal para detectar esta capacidad (Dos Santos et al., 2012; Pérez, Díaz, Restrepo-Franco, Diván-Baldani & Hernández-Rodríguez, 2015) En consecuencia, se evaluaron 5 grupos de cebadores para la amplificación de fragmentos del gen *nifH*, probando diferentes condiciones de los reactivos en la PCR.

Para el grupo 1 con los cebadores *nifH19F* y *nifH3*, se realizaron 18 ensayos inicialmente para la cepa AS7 del género *Azospirillum* (Figura 10), con los que se esperaba un amplicón de 476 bp aproximadamente. En ninguno de los ensayos se observó la banda del

tamaño esperado; sin embargo, en las pruebas N10 y N15 se observó una banda menor con pocos productos inespecíficos, por lo que se decidió repetir estos ensayos incluyendo una cepa de *Pseudomonas* (RZH133).

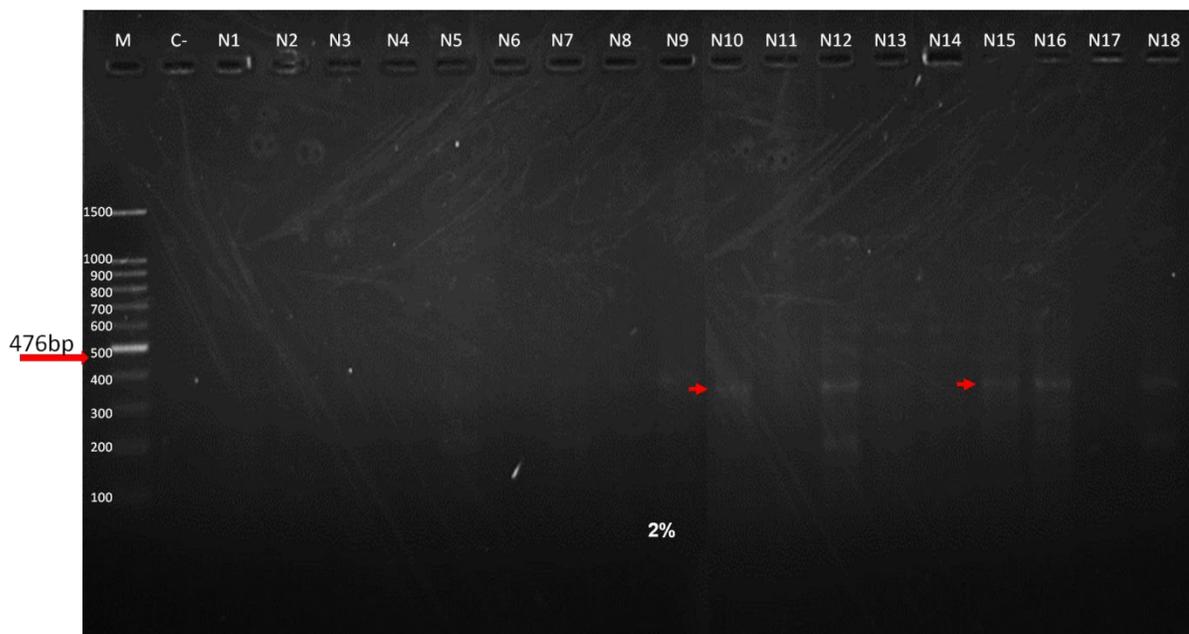


Figura 10. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores *nifH19F/nifH3* para la cepa AS7. C- : Control negativo. M: marcador de peso molecular

Se realizaron los ensayos N10, N10\* (1.5  $\mu$ L de ADN), N10\*\* (2  $\mu$ L de ADN) y N15 en ambas cepas (Figura 11) y se observaron los resultados ya obtenidos para *Azospirillum*, mientras que para *Pseudomonas*, solo hubo amplificación con N15 y esta fue del tamaño esperado para los cebadores. Debido a este resultado, se empleó el ensayo N15 para probar estos cebadores con las 12 bacterias objeto de estudio (Figura 12), dicha amplificación reveló la presencia de bandas inespecíficas, inclusive en la cepa en que ya se había realizado el ensayo; a pesar de esto, se observa una banda del tamaño esperado para las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138, RZH141, RZH143 y RZH144.

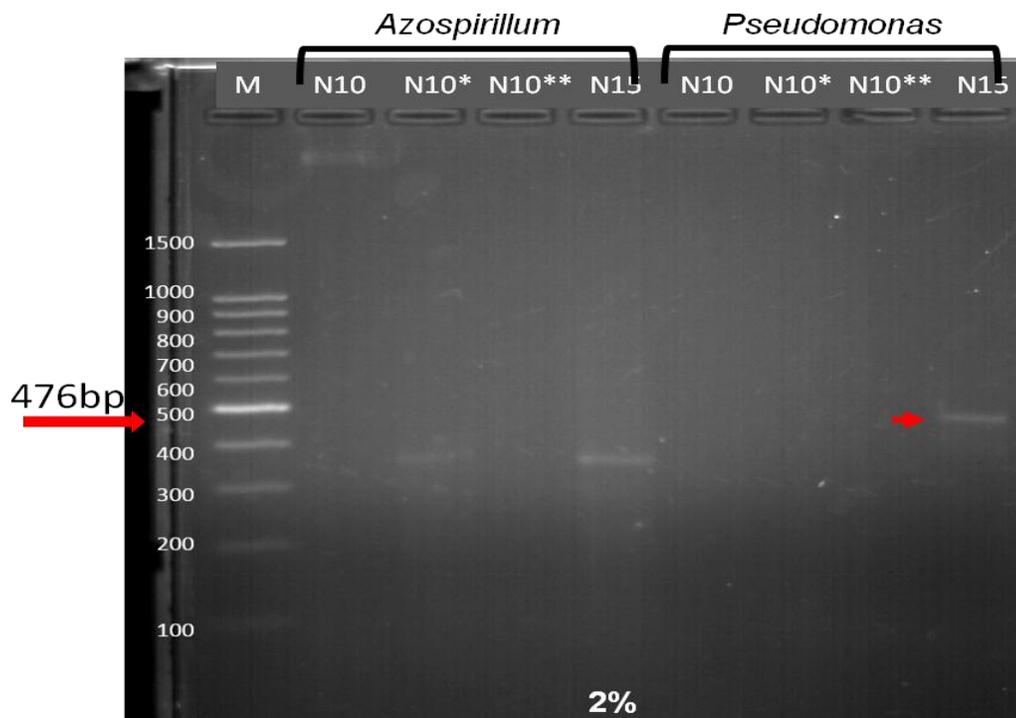


Figura 11. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores *nifH19F/nifH3*. M: marcador de peso molecular

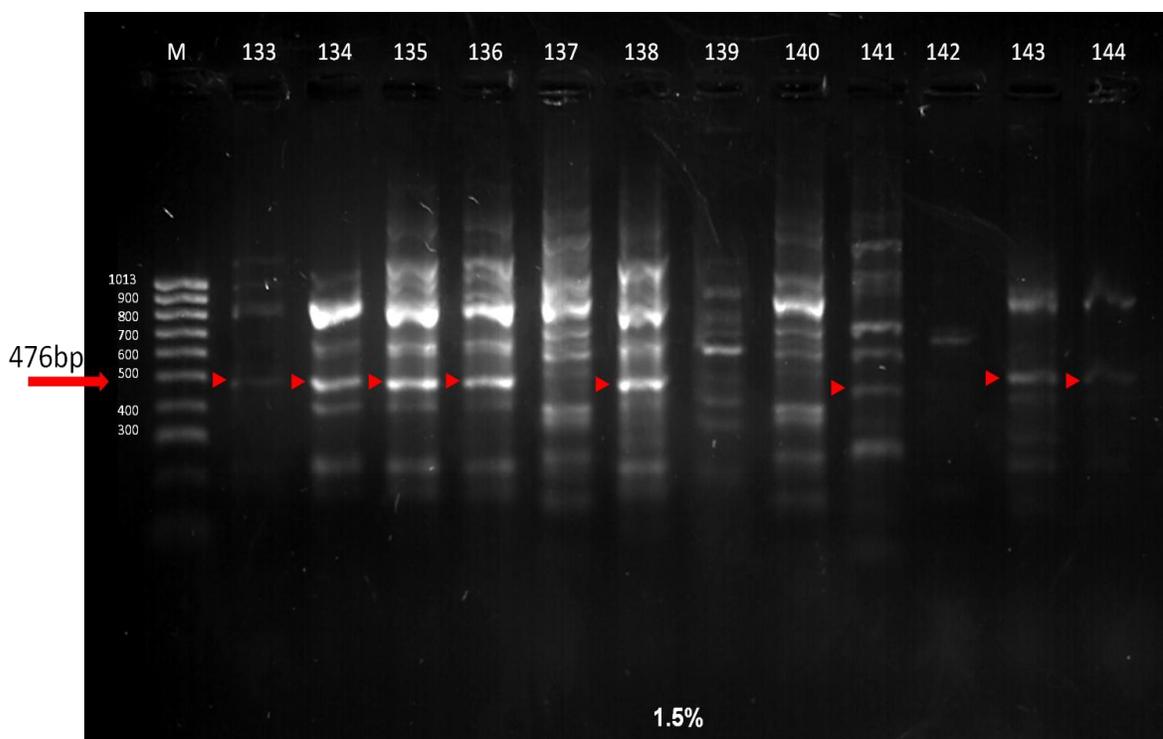


Figura 12. Amplificación de *nifH* con los cebadores *nifH19F/nifH3* para todas las cepas. Las cepas se encuentran en orden de la RZH133 a RZH144, representadas por el número de su código. M: marcador de peso molecular

En el estudio realizado por (Berthrong et al., 2014), se obtuvieron fragmentos de 506-521 bp del gen *nifH*, en la PCR con ADN extraído de muestras de suelo, empleando ese conjunto de cebadores. Mientras que (Menezes, 2009), evidenció la presencia del gen al observar fragmentos de 460 bp, pero también reporta que en las amplificaciones con estos cebadores se observaron otras bandas de diferentes tamaños además de la esperada; estos resultados coinciden con los de este estudio a pesar de que los fragmentos obtenidos para el gen fueron de 480 bp aproximadamente.

Para el grupo 2 con los cebadores Nh21F y nifH3, el tamaño del fragmento también correspondía a 476 bp; los 8 ensayos iniciales se realizaron para *Azospirillum* (AS7) y para *Pseudomonas* (RZH133) (Figura 13). Se encontró que para *Azospirillum* hubo amplificación con las pruebas H5, H6 y H8 pero en ningún caso se observó la banda esperada, al mismo tiempo se obtuvo que sólo en el ensayo H8 hubo reacción para *Pseudomonas* y aunque se presentaron productos inespecíficos, se observó una banda tenue con el tamaño apropiado, por lo que se repitió este ensayo para las 12 bacterias (Figura 14)

Con la electroforesis se evidenció la amplificación del fragmento para la cepa RZH142, aunque se presentaron algunas bandas inespecíficas poco visibles en esta cepa; dicha banda del tamaño esperado (476 bp) se observó en las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138 y RZH139 pero con mayor presencia de productos de PCR inespecíficos. De igual forma lo reportan (Gaby & Buckley, 2012) en su investigación observaron que las amplificaciones con estos cebadores generaban productos de PCR con diferentes tamaños, bandas con barrido y además amplificaban un fragmento en el control negativo; concluyendo

que este conjunto de cebadores no es exclusivamente específico para el gen *nifH* bajo las condiciones evaluadas.

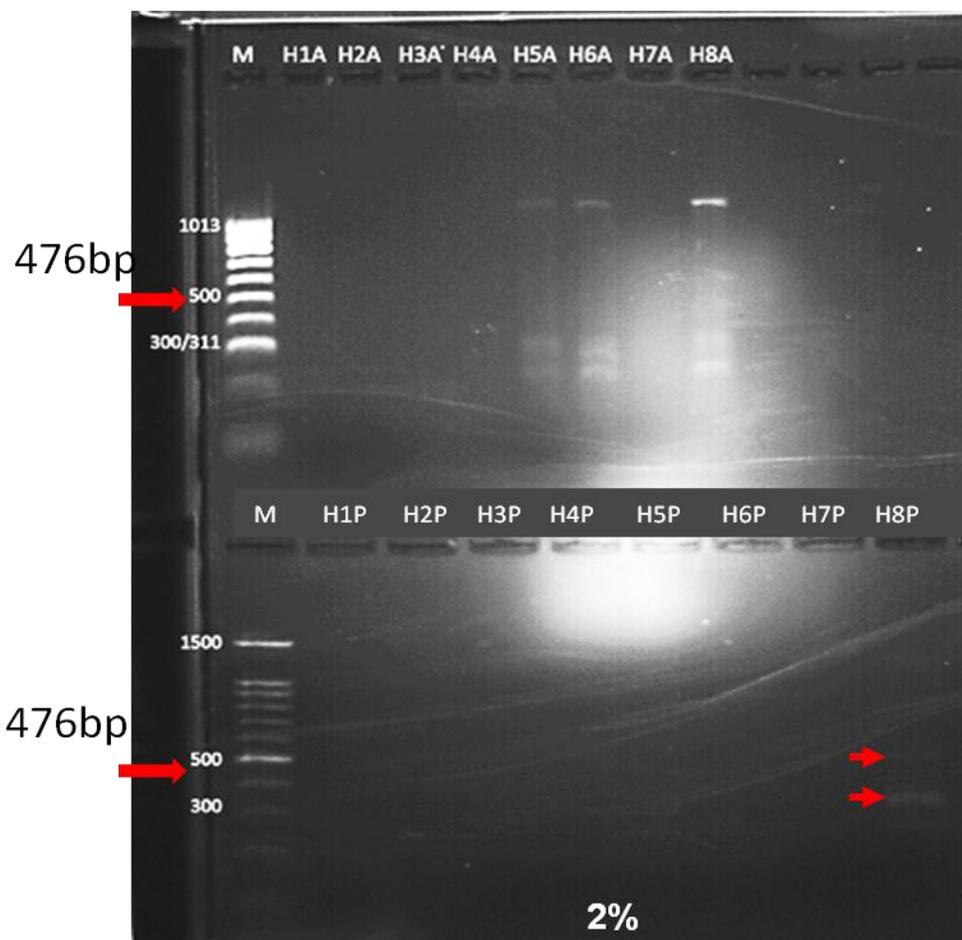


Figura 13. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores Nh21F/nifH3. La A indica *Azospirillum* y la P *Pseudomonas*. M: marcador de peso molecular

Con el grupo 3 de cebadores, F1 y *nifH*-r, el fragmento amplificado debía ser de 451 bp, se realizaron 4 ensayos para ambos géneros (AS7 y RZH133) (Figura 15) en donde se observó que para *Azospirillum* sólo hubo amplificación en el ensayo R3 pero fue de un tamaño menor al esperado (300 bp), mientras que para *Pseudomonas* en todas las pruebas se observa la banda esperada además de productos inespecíficos; debido a que en R4 las bandas son más visibles, se utilizó este ensayo para las 12 bacterias.

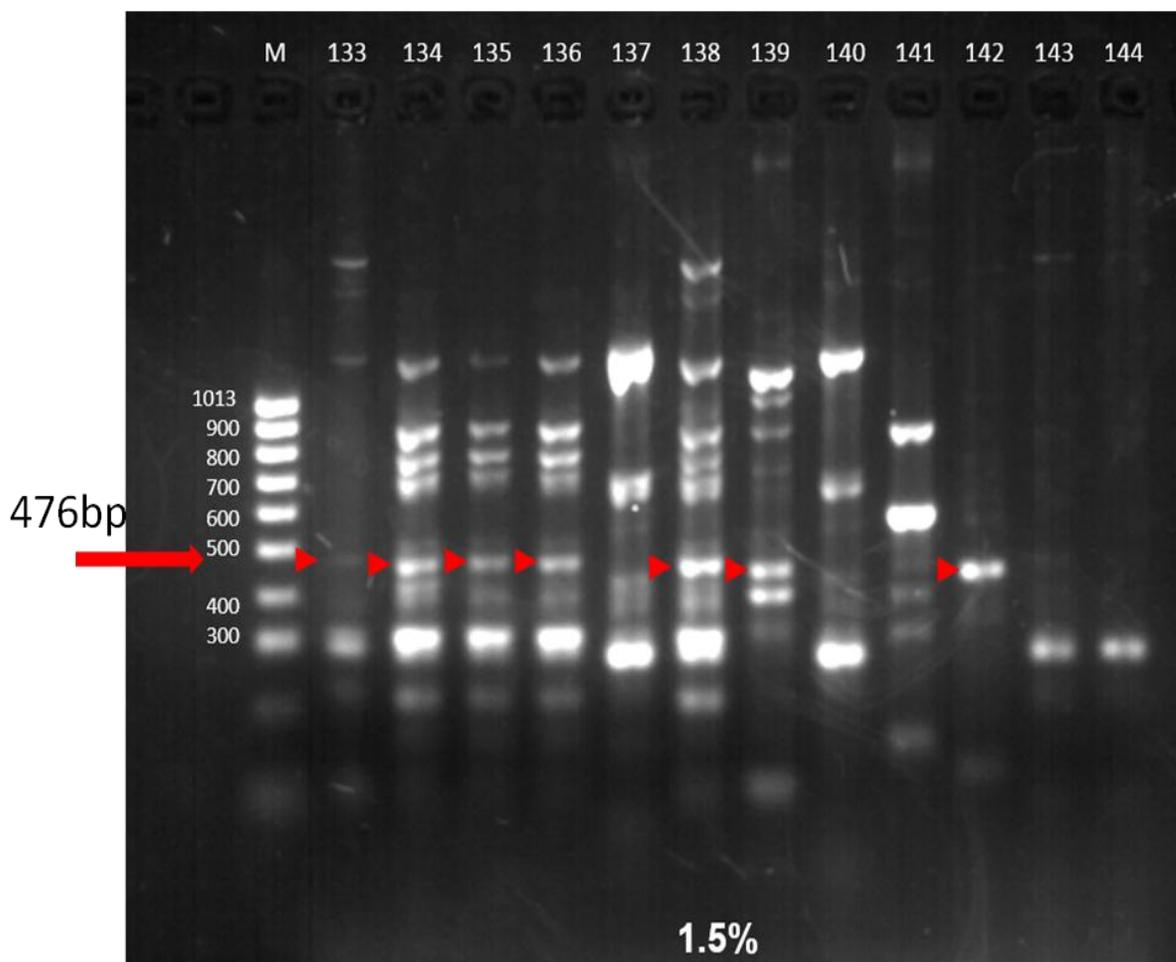


Figura 14. Amplificación de *nifH* con los cebadores Nh21F/nifH3 para todas las cepas. Las cepas se encuentran en orden de la RZH133 a RZH144 M: marcador de peso molecular.

Al evaluar los cebadores F1/nifH-r en las 12 bacterias (Figura 16), no se observa el fragmento esperado en ninguna de las cepas, a pesar del análisis anterior. Con este grupo de cebadores del gen *nifH* Dedysh, Ricke & Liesack (2004) amplificaron en bacterias metanotróficas bandas de 453 bp.

Por otro lado, en el grupo 4 se analizaron los cebadores PolF y PolR que amplifican un fragmento de 362 bp aproximadamente. Para este grupo se llevaron a cabo 8 ensayos para AS7 así como para RZH133 (Figura 17), en donde se observó que para el género *Azospirillum* hubo amplificación con todos los ensayos, excepto con L6; por el contrario para

*Pseudomonas*, las bandas fueron muy tenues y en L2 y L6 no se observó reacción. Para este grupo se realizaron pequeñas modificaciones y se realizó un ensayo para los 12 microorganismos con las siguientes condiciones: 1U de Taq polimerasa,  $MgCl_2$  2mM, Cebadores 2  $\mu M$  y ADN 1  $\mu L$  (Figura 18); en esta PCR se incluyó también la cepa AS7.

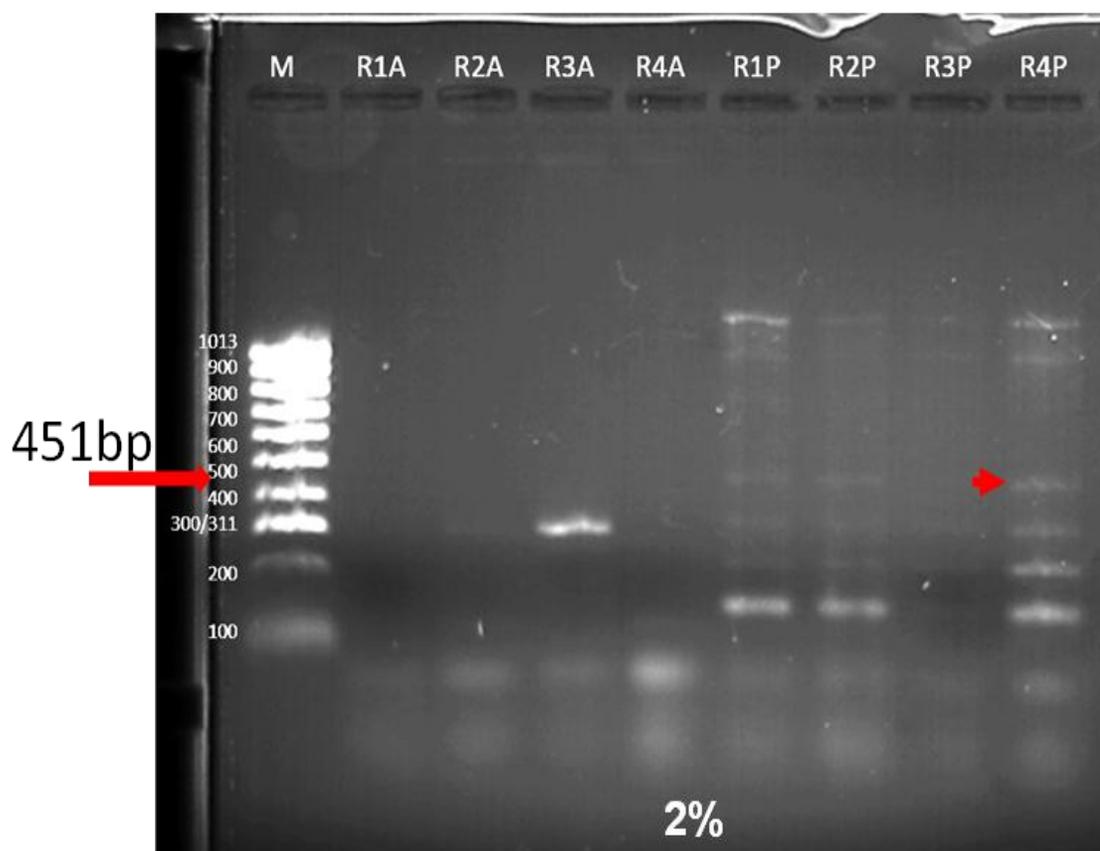


Figura 15. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores F1/*nifH*-r. La A indica *Azospirillum* y la P *Pseudomonas*. M: marcador de peso molecular

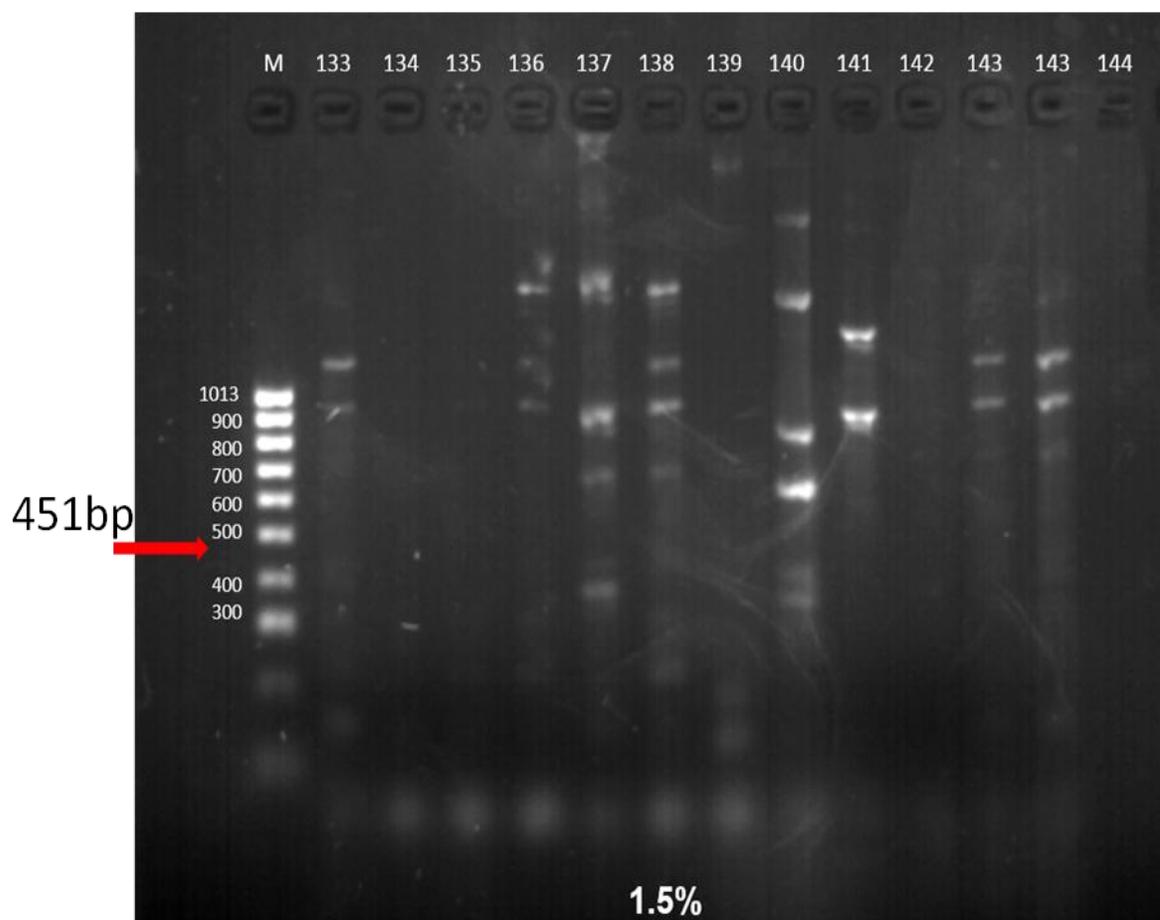


Figura 16. Amplificación de *nifH* con los cebadores F1/*nifH*-r para todas las cepas. Las cepas se encuentran en orden de la RZH133 a RZH144, representadas por el número de su código. M: marcador de peso molecular

Con este ensayo, se observó un fragmento de 340 bp aproximadamente para *Azospirillum*, mientras que para algunas cepas de *Pseudomonas* (RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH137, RZH138, RZH140, RZH143 y RZH144) se amplificó un fragmento con un tamaño un poco mayor de aproximadamente 400 bp, en donde sólo para la cepa RZH137 no se observó la presencia de productos inespecíficos.

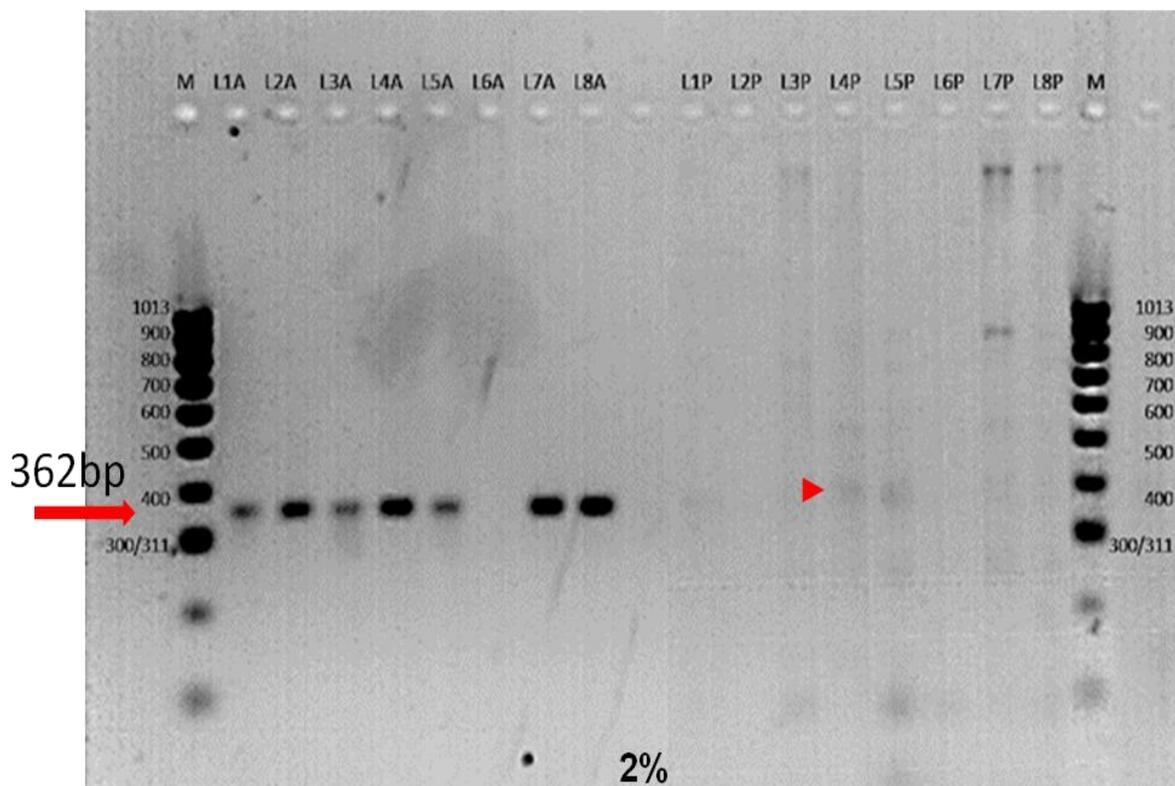
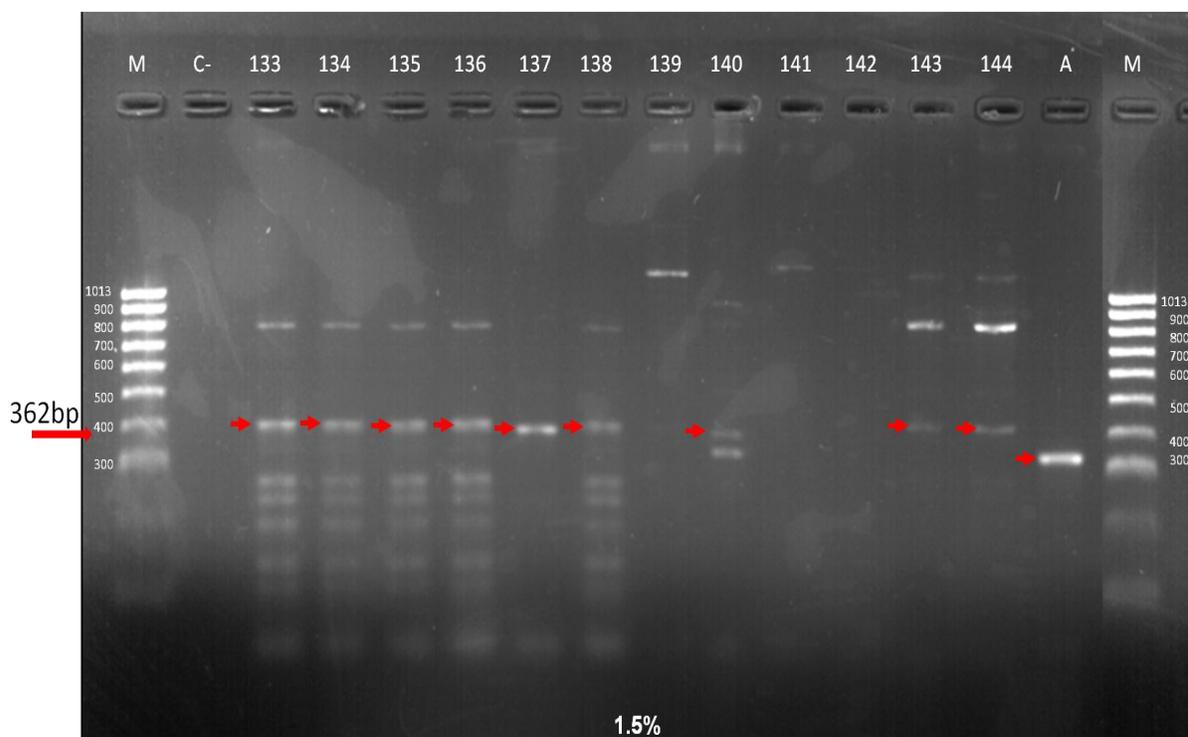


Figura 17. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores PolF/PolR. La A indica *Azospirillum* y la P *Pseudomonas*. M: marcador de peso molecular

En estudios previos en los que se ha amplificado el gen *nifH* usando este grupo de cebadores, se reporta un fragmento de 360 bp (Mirza et al., 2006) para la cepa K1, que además según análisis del gen ARNr 16S se ubicó dentro del género *Pseudomonas* y demostró alta similitud con *P. alcaligenes* (97%), *P. pseudoalcaligenes* (96%) y *P. stutzeri* (96%). En la investigación de Venieraki et al. (2011) se reportan fragmentos de 355 bp en 11 cepas de *Azospirillum* y 6 de *Pseudomonas*, estas últimas presentaron identidad de 99.7-99.9% con *P. stutzeri*.



*Figura 18.* Amplificación de *nifH* con los cebadores PolF/PolR para todas las cepas. C-: Control negativo, las *Pseudomonas* se encuentran en orden de la RZH133 a RZH144, representadas por el número de su código. A: *Azospirillum* (AS7). M: marcador de peso molecular

Por otro lado, en el trabajo de Dashti et al (2015), se evaluaron 13 cepas, incluida una de *P. stutzeri*, en donde observaron en la amplificación con estos cebadores, una banda de 344 bp y otra de menor tamaño para todas las cepas y encontraron luego de secuenciar las dos bandas que ambas eran fragmentos del gen *nifH*; además en 9 de las 13 bacterias se presentó una banda con un tamaño superior pero no fue analizada. Mientras que Cerda (2008) obtuvo fragmentos de 454 bp en las cepas ACN 14a de *Frankia anli* y LUPAC 08 de *Micromonospora*, observando además otros fragmentos en el gel de electroforesis. El resultado obtenido en el presente estudio para *Azospirillum* (360bp) concuerda con estos reportes y para las cepas de *Pseudomonas* la banda fue un poco mayor pero también está en el rango de resultados ya reportados.

Finalmente, con el grupo de cebadores *nifH-g1-f* y *nifH-g1-r*, se esperaba la amplificación de un fragmento de aproximadamente 371 bp. Para estos ensayos se usaron las cepas AS7, AS9, RZH134 y RZH135 (Figura 19); como se esperaba, hubo amplificación sólo para las cepas del género *Pseudomonas*, debido a que estos cebadores son específicos para  $\gamma$ -Proteobacterias (Bürgmann et al., 2004), clase a la que pertenece este género (Yan et al., 2008); por el contrario, el género *Azospirillum* pertenece a la clase de  $\alpha$ -Proteobacterias (Steenhoudt & Vandereyden, 2000). A pesar de esto, el amplicón en todos los casos presentó un tamaño superior de aproximadamente 500 bp. Se realizó el ensayo G2 para las 12 *Pseudomonas* (Figura 20) y se observó la amplificación de un fragmento de 500 bp para las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136 y RZH138.

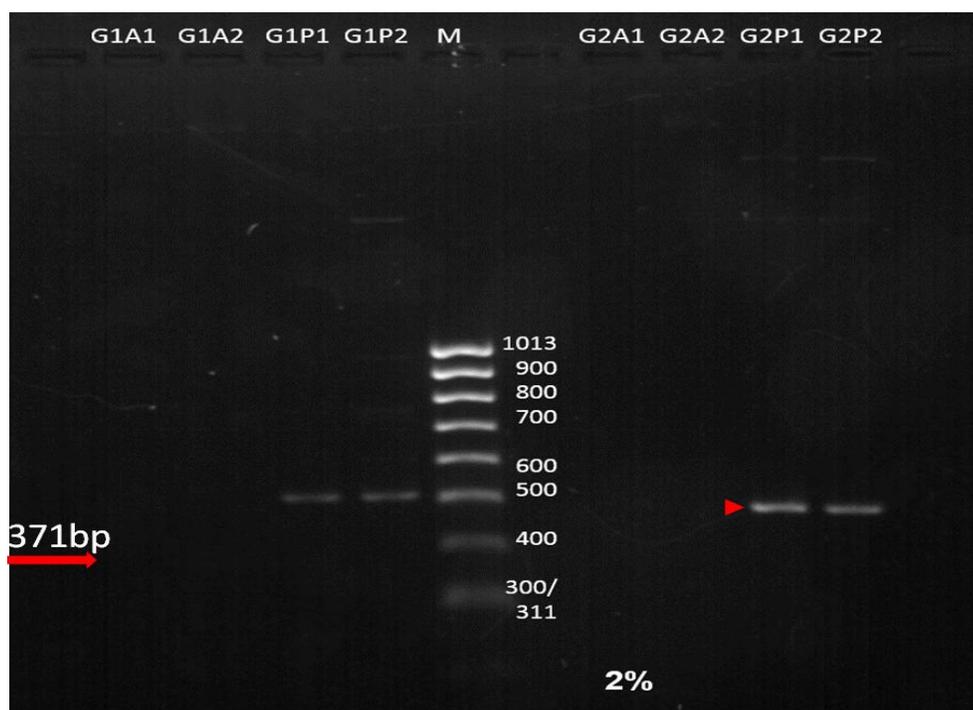


Figura 19. Amplificación del gen *nifH* con los cebadores *nifH-g1-f/nifH-g1-r*. La A indica *Azospirillum*, A1: AS7, A2: AS9 y la P indica *Pseudomonas*, P1: RZH134, P2: RZH135. M: marcador de peso molecular

En la investigación realizada por Rajeswari & Kasthuri (2009), se empleó este grupo de cebadores para amplificar el gen *nif* de 28 aislados de *Azotobacter* ( $\gamma$ -Proteobacteria), se observó un fragmento de 400 bp en todas las cepas evaluadas y se seleccionó un fragmento al azar para ser secuenciado, de esta manera se comprobó la presencia del gen en estas bacterias. Así mismo, en el trabajo de Otero (2011) se amplificó un fragmento de 378 bp en actinomicetos y bacterias fotosintéticas no sulfurantes, con lo que se evidenció la capacidad diazotrofa de las cepas mediante el gen *nifH*.

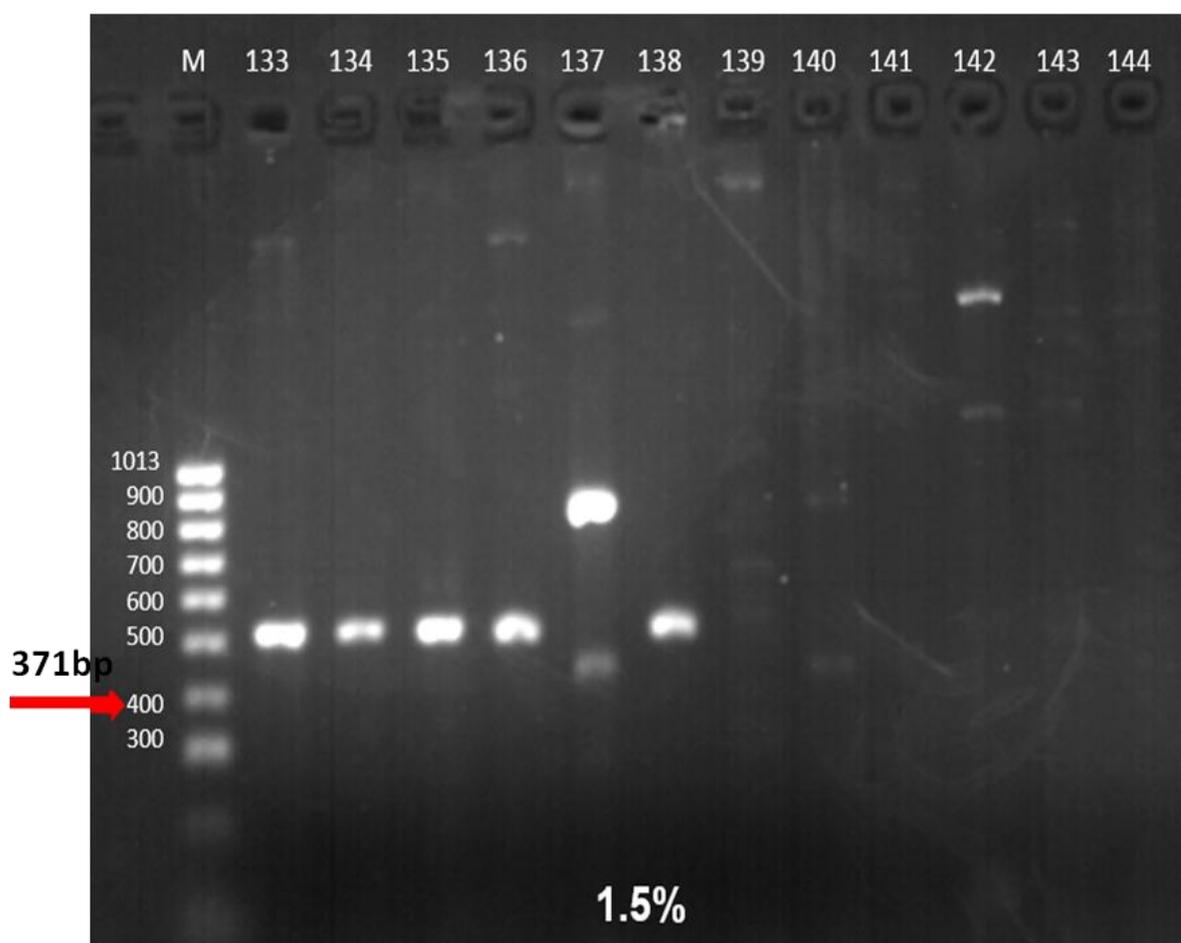


Figura 20. Amplificación de *nifH* con los cebadores *nifH-g1-f/nifH-g1-r* para todas las cepas. Las cepas se encuentran en orden de la RZH133 a RZH144, representadas por el número de su código. M: marcador de peso molecular

En la tabla 7 se encuentra un resumen de los resultados de amplificación del gen *nifH* para cada bacteria. No hubo una cepa que registrara la presencia del gen con todos los grupos de cebadores evaluados. Los resultados muestran que con el grupo F1/*nifH*-r la amplificación de una banda que indicara la presencia del gen *nifH* fue negativo en todos los microorganismos evaluados, por lo que no se tuvo en cuenta dicho grupo de cebadores para los análisis. Al considerar las amplificaciones sin tener en cuenta este grupo de cebadores es evidente la presencia de bandas que pudiesen estar relacionadas con el gen *nifH* en las cepas RZH133, RZH134, RZH135 y RZH138 con todos los grupos evaluados. En las cepas restantes las PCR realizadas no muestran bandas amplificadas con todos los grupos de cebadores; la cepa RZH143 y RZH144 presentaron bandas posiblemente relacionadas con el gen *nifH* con 2 de los grupos evaluados y en las cepas restantes se evidenció el fragmento esperado con 1 de los grupos de cebadores.

**Tabla 7** Resultados de amplificación para *nifH* con todos los cebadores evaluados

Cebadores Cepas	nifH19F/nifH3	Nh21F/nifH3	F1/nifH-r	PolF/PolR	Nif-g1-f/nif-g1-r
<b>RZH133</b>	+	+	-	+	+
<b>RZH134</b>	+	+	-	+	+
<b>RZH135</b>	+	+	-	+	+
<b>RZH136</b>	+	+	-	+	+
<b>RZH137</b>	-	-	-	+	-
<b>RZH138</b>	+	+	-	+	+
<b>RZH139</b>	-	+	-	-	-
<b>RZH140</b>	-	-	-	+	-
<b>RZH141</b>	+	-	-	-	-
<b>RZH142</b>	-	+	-	-	-
<b>RZH143</b>	+	-	-	+	-
<b>RZH144</b>	+	-	-	+	-

Nota: +: positivo, -: negativo

De acuerdo al estudio realizado por Gaby & Buckley (2012), en el que se evaluaron 51 cebadores universales para la amplificación del gen *nifH*, con los que obtuvieron 42 combinaciones de pares de cebadores; encontraron que sólo 7 acertaron en >90% de las secuencias de las bases de datos y dentro de estos estaban los grupos nifH19F/nifH3 y Nh21F/nifH3. Sin embargo, al utilizar estos cebadores en ensayos experimentales, observaron la amplificación de bandas de diferentes tamaños e incluso amplificación en el control negativo (*Escherichia coli*). De la misma manera, en la presente investigación se observó la amplificación inespecífica para los grupos de cebadores mencionados.

Por otra parte, en las investigaciones realizadas por Cerda (2008) y Dashti et al. (2015), se presentó la misma situación de bandas de diferentes tamaños al emplear los cebadores PolF/PolR, resultados que también coinciden con los de este trabajo.

Estos resultados comunes al utilizar diferentes pares de cebadores en la amplificación del gen *nifH*, sugieren que no hay una combinación de cebadores universales que amplifiquen sólo el fragmento esperado del gen y representan una falta de especificidad bajo las condiciones probadas en una PCR convencional; ya que en estudios en los que se han realizado PCRs anidadas se reportan mejores resultados de amplificación (Newell, Pritchard, Foster, & Fulweiler, 2016).

De los cebadores evaluados, el grupo más efectivo para ser usados en *Pseudomonas*, como se esperaba resultó ser el grupo 5, puesto que están diseñados entre otros para las  $\gamma$ -Proteobacterias, a pesar de generar un fragmento mayor; sin embargo se podría confirmar la identidad de la banda con afinidad para el gen *nifH* con análisis posteriores como el de secuenciación y comparación en bases de datos.

Como lo señalan algunos estudios (Addison et al., 2010), hay poca información sobre los genes *nif* en este género y al realizar las comparaciones en las bases de datos, frecuentemente se obtienen similitudes con los genes *nif* de otros géneros (Addison et al., 2010; Dashti et al., 2015). Estos análisis sustentarían la hipótesis de transferencia horizontal de información genética entre diferentes especies bacterianas respecto a estos genes (Rodríguez, 2008; Yan et al., 2010) que además explicaría la razón por la que ahora se reportan especies de *Pseudomonas* con capacidad fijadora de nitrógeno cuando en el pasado esta no era una característica presente en el grupo (Yan et al., 2008).

Referente a los cebadores universales evaluados, el grupo 4 (PoIF/PoIR), se puede tomar también como efectivo para la amplificación de *nifH*, esto con base en que fue el único grupo con el que se logró un amplicón correcto para el control positivo (*Azospirillum*). En otros estudios (Berthrong et al., 2014) se han seleccionado estos cebadores por su amplia cobertura y tamaño óptimo del fragmento,

En cuanto a la relación entre la especie identificada para estas bacterias y la presencia del *nifH*, se puede analizar que a pesar de que el género *Pseudomonas* se consideró por mucho tiempo fuera del grupo de los diazótrofos (Busquets et al., 2013), se empezó a evaluar este género y se encontró que los miembros de las especies *P. stutzeri*, *P. azotofigens*, *P. mendocina* y *P. pseudoalcaligenes* poseen dicha capacidad, en las que la ausencia de pigmentos fluorescentes es una característica común de estas cuatro especies. Sin embargo, las investigaciones han avanzado y en los últimos años se han reportado nuevas *Pseudomonas* diazótroficas que presentan fluorescencia, como *Pseudomonas koreensis* (Álvarez-López et al., 2014), también las cepas IPPW-2 e IPPW-3 aisladas por Addison et al. (2010), que se ubicaron dentro de este género pero no fue posible establecer la especie a la que pertenecen.

Por esta razón y de acuerdo a los resultados obtenidos, se confirma el potencial diazotrofo para las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136, RZH138; aunque para las demás cepas no se descarta esta capacidad.

## 5 Conclusiones

Al evaluar tres métodos de extracción diferentes, el kit comercial Isolate II Genomic DNA, resultó ser el más eficiente de acuerdo a la integridad, concentración, pureza y rendimiento obtenidos, además del tiempo en que se lleva a cabo el procedimiento.

Se identificaron molecularmente las 12 bacterias estudiadas mediante la secuenciación y análisis del gen ARNr 16S; se estableció el género al que pertenecen y además se halló la relación de especies para 11 de las cepas.

Los resultados obtenidos en el árbol filogenético soportan el análisis realizado por comparación en bases de datos y demuestran la relación entre las cepas en concordancia con las especies identificadas.

Se detectó la posible presencia del gen *nifH* mediante la amplificación de fragmentos del tamaño esperado o cercano para el gen, demostrando el potencial de las cepas RZH133, RZH134, RZH135, RZH136 y RZH138 como posibles fijadoras de nitrógeno, a pesar de que los cebadores evaluados resultaron poco específicos bajo las condiciones analizadas.

Se comprobó la hipótesis planteada al demostrar que las bacterias estudiadas pertenecen al género *Pseudomonas*, análisis posteriores permitirán conocer si los fragmentos amplificados corresponden al gen *nifH*.

Con las técnicas empleadas en la presente investigación se estandarizaron protocolos de extracción de ADN y PCR para el Laboratorio de Biología Sintética de la UFPS y se elaboró un manual de reactivos.

## 6 Recomendaciones

Se recomienda realizar un nuevo análisis con dianas moleculares más específicas como las regiones ITS de la cepa RZH139 para poder ubicar de forma correcta la especie a la que pertenece.

Probar los cebadores evaluados para amplificación del gen *nifH* en protocolos de PCR anidada, para disminuir la unión no específica de los cebadores.

Realizar secuenciación de los fragmentos obtenidos para el gen *nifH* para confirmar el potencial diazótrofo de las cepas en las que se observó el fragmento y que dichos análisis se complementen con la cuantificación de la fijación de nitrógeno de estas cepas mediante pruebas fisiológicas.

Se recomienda continuar el estudio con estas bacterias debido al gran potencial demostrado, para lograr el desarrollo de productos biotecnológicos que contribuyan al progreso de la agricultura nortesantandereana.

Se recomienda a la UFPS más inversión para los laboratorios de investigación, puesto que en el edificio se presenta suspensión inesperada de la energía eléctrica ocasionando errores en el proceso de conservación de las muestras y desarrollo de protocolos extensos. Además se sugiere la creación de una norma de cooperación entre los diferentes laboratorios pues no todos cuentan con los equipos que se requieren para los diferentes análisis.

## Bibliografía

- Addison, S. L., McDonald, I. R., & Lloyd-Jones, G. (2010). Identifying diazotrophs by incorporation of nitrogen from  $^{15}\text{N}_2$  into RNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2313–2322.
- Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Alleviation of fungicide-induced phytotoxicity in greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] using fungicide-tolerant and plant growth promoting *Pseudomonas* strain. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(4), 451–459.
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173–181.
- Ahmad, N., Shinwari, Z., Bashir, S., & Yasir, M. (2013). Function and phylogenetic characterization of rhizospheric bacteria associated with GM and non GM maize. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1781–1788.
- Akhtar, M., & Panwar, J. (2013). Efficacy of root-associated fungi and PGPR on the growth of *Pisum sativum* (cv. Arkil) and reproduction of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Journal of Basic Microbiology*, 52, 1–9.
- Alanís, E., & Guerrero, I. (2004). *Pseudomonas* en Biotecnología. *Revista Biotecnología*, 09(1), 26–37.
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (Primera, pp. 1–26). México.
- Álvarez-López, C., Osorio-Vega, W., Díaz-Gómez, M., & Marín-Montoya, M. (2014).

- Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 225–241.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J., Wakabayashi, H., Oyaizu, H., & The, P. (2000). Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonads* based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(2000), 1563–1589.
- Argüello-Navarro, A., & Moreno-Rozo, L. (2014). Evaluación del potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de suelos con cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Acta Agronómica*, 63(13), 1–6.
- Arias, J. H., Rengifo, T., & Jaramillo, M. (2007). *Buenas practicas agricolas en la produccion de frijol voluble*. (CORPOICA, FAO, & MANA, Eds.) *Corpoica, MANA y FAO* (Primera). Medellín.
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555.
- Berthrong, S., Yeager, C., Gallegos-Graves, L., Steven, B., Eichorst, S., Jackson, R., & Kuske, C. (2014). Nitrogen fertilization has a stronger effect on soil nitrogen-fixing bacterial communities than elevated atmospheric CO<sub>2</sub>. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 3103–3112.
- Bioline. (2015). Isolate II Genomic DNA kit. Retrieved December 20, 2015, from [http://www.bioline.com/au/downloads/dl/file/id/873/isolateii\\_genomic\\_pm\\_web.pdf](http://www.bioline.com/au/downloads/dl/file/id/873/isolateii_genomic_pm_web.pdf)
- Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.
- Borges, A., Rosa, M., Recchia, G., Queiroz-Silva, J., Bressan, E., & Veasey, E. (2009). CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. *Scientia Agricola*,

66(4), 529–534.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608.

Bürgmann, H., Widmer, F., Sigler, W., & Zeyer, J. (2004). New Molecular Screening Tools for Analysis of Free-Living Diazotrophs in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 240–247.

Busquets, A., Gomila, M., Mayol, J., Bosch, R., Nogales, B., Bennasar, A., & Lalucat, J. (2013). Draft Genome Sequence of *Pseudomonas azotifigens* Strain DSM 17556T (6H33bT ), a Nitrogen Fixer Strain Isolated from a Compost Pile. *Genome*, 1(4), 13–14.

Camelo, M., Vera, S., & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista CORPOICA. Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 159–166.

Caprar, M., Cantor, M., Sicora, O., Copaci, C., & Sicora, C. (2014). Optimization of DNA isolation Rhododendron from Europe from four species of, 18(1), 117–122.

Castillo, F. (2005). Ciclos biogeoquímicos III. In *Biotecnología ambiental* (pp. 151–256). Madrid, España: Tébar.

Cerda, M. (2008). *Aislamiento de Micromonospora de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal*. Universidad de Salamanca.

Chien, S. H., Gearhart, M., & Collamer, D. (2009). Acidez generada por los fertilizantes nitrogenados: Nueva evaluación de los requerimientos de cal. *Informaciones Agronómicas*, 41, 16–17.

Clavijo, C., Chipana, V., Centeno, J., Zúñiga, D., & Guillén, C. (2012). Aislamiento,

caracterización e identificación de bacterias diazotróficas de la rizósfera del cultivo de Olea europea “olivo” en Tacna Perú . *Ecología Aplicada* , 11 (2), 89–102.

Clemente, J. (2002). *Construcción de un sistema de expresión heterólogo con los genes de la D,L-hidantoinasa y de la D-carbamilasa, evaluación de su aplicación biotecnológica a la síntesis enzimática de D-aminoácidos a partir de derivados de la D,L-hidantoína*. Universidad Almería.

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. (2007). *Estrategias de producción limpia de hortalizas*. (J. Jaramillo & G. Rios, Eds.). Bogotá DC: Produmedios.

Cultek. (2006). *Amplificación de ácidos nucleicos in vitro. Aplicación PCR*. España.

Dashti, N., Ali, N., Eliyas, M., Khanafer, M., Sorkhoh, N., & Radwan, S. (2015). Most Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Total Environment are Diazotrophic, which Highlights their Value in the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants. *Microbes and Environments*, 30(1), 70–75.

De-Bashan, L., Holguin, G., Glick, B., & Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. In R. Ferrera-Cerrato & A. Alarcón (Eds.), *Microbiología Agrícola, hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo* (pp. 170–224). Ciudad de México: Trillas.

Dedysh, S. N., Ricke, P., & Liesack, W. (2004). NifH and NifD phylogenies: An evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, 150(5), 1301–1313.

Delegatura de Protección de la Competencia. (2011). *Cadena productiva de las hortalizas en Colombia: diagnóstico de libre competencia (2009-2011)*. Colombia.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2014). *Producción limpia de*

*hortalizas, una mejor salud y bienestar.*

- Deslippe, J., Egger, K., & Henry, G. (2005). Impacts of warming and fertilization on nitrogen-fixing microbial communities in the Canadian High Arctic. *FEMS Microbiology Ecology*, *53*(1), 41–50.
- Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreño-López, R., & Elmerich, C. (2003). Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology*, *149*(8), 2251–2262.
- Devereux, R., & Wilkinson, S. (2004). Amplification of ribosomal RNA sequences. In G. Kowalchuk, F. de Bruijn, I. Head, A. Van de Zijpp, & J. van Elsas (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual* (Vol. 3, pp. 509–522). Kluwer Academic.
- Dey, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M., & Chauhan, S. M. (2004). Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, *159*(4), 371–394.
- Dos Santos, P. C., Fang, Z., Mason, S. W., Setubal, J. C., & Dixon, R. (2012). Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. *BMC Genomics*, *13*(1), 162.
- Falcón, L., & Valera, A. (2007). Extracción de Ácidos nucleicos. In L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Moleculara molecular* (Primera, pp. 499–516). México.
- Fernández, A., García, C., Saéz, J. A., & Valdezate, S. (2010). *Metodos de Identificacion Bacteriana En El Laboratorio De Microbiología*. (E. Cercenado & R. Cantón, Eds.). España.
- Ferrera, I., Longhorn, S., Banta, A. B., Liu, Y., Preston, D., & Reysenbach, A. L. (2007). Diversity of 16S rRNA gene, ITS region and acIB gene of the *Aquificales*.

*Extremophiles*, 11(1), 57–64.

Fuentes, F., & Massol-Deyá, A. (2002). Nutrientes y gases: Nitrógeno. In *Manual de Laboratorios: Ecología de microorganismos*. Puerto Rico.

Gaby, J., & Buckley, D. (2012). A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase. *PLoS ONE*, 7(7).

Garrido, F. (2007). *Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas*. Universidad Militar Nueva Granada. [identificacion-de-bacterias-diazotroficas-rizosfericas-y-endofitas-asociadas-a-suelos-y-pastos-del-valle--9789584429100.html](http://www.identificacion-de-bacterias-diazotroficas-rizosfericas-y-endofitas-asociadas-a-suelos-y-pastos-del-valle-9789584429100.html)

Godoy, M. J., Orozco, L., Hernández, C., DaMata, O., De Waard, J., & Gonzáles, S. (2008). Identificación de micobacterias no tuberculosas : comparación de métodos bioquímicos y moleculares. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28, 96–104.

Grageda, O., Díaz, A., Peña, J., & Vera, J. (2012). Impacto de los biofertilizantes en la agricultura. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(6), 1261–1274.

Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., Anthony, G., Donnell, O., Bailey, M. J., & Donnell, A. G. O. (2000). Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5488–5491.

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 Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1539–1544.

Heracle BioSoft. (2013). DNA Baser Sequence Assembler. Retrieved Nov 10, 2015 from

www.DnaBaser.com.

- Hu, Y., & Ribbe, M. (2013). Nitrogenase assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827, 1112–1122.
- Iglesias, L., Luna, M., & López, R. (2003). Determinación del método de extracción de ADN óptimo para el desarrollo de la técnica RAPD en megagametofitos de *Pinus hartwegii* Lindl. *Foresta Veracruzana*, 5(1), 43–48.
- Iglesias, N., Marengo, J., Rentería, F., Gatti, B., Segal, E., & Semorile, L. (2008). Tipificación molecular de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(1), 3–8. Retrieved from
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas colombianas de Azotobacter spp. mediante el analisis de restriccion del DNA ribosomal 16S*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Kwon, S., Kim, J., Park, I., Yoon, S., Park, D., Lim, C., & Go, S. (2003). *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 21–27.
- Lagares, P., & Puerto, J. (2001). Población y muestra. Técnicas de muestreos. *Management Mathematics for European Schools*, 1–19.
- Loredo-Osti, C., Beltrán-López, S., & Peña-del Río, M. (2009). Importancia de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la producción de cultivos. In *Primer simposium internacional de agricultura ecológica* (Primera ed, pp. 14–22). México.
- Lovell, C., Piceno, Y., Quattro, J., & Bagwell, C. (2000). Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 66(9), 3814–3822.

- Ludden, P. (1993). Nif Gene Products and Their Roles in Nitrogen Fixation. In R. Palacios, J. Mora, & W. E. Newton (Eds.), *New Horizons in Nitrogen Fixation* (Vol. 17, pp. 101–104). Cancún, México: Springer Netherlands.
- Mantilla, A., Cardona, G., Peña, C., Murcia, U., Rodríguez, M., & Zambrano, M. (2009). Distribución De Bacterias Potencialmente Fijadoras De Nitrógeno Y Su Relación Con Parámetros Físicoquímicos En Suelos Con Tres Coberturas Vegetales En El Sur De La Amazonia Colombiana. *Revista de Biología Tropical*, 57(4), 915–927.
- Mao, D.-P., Zhou, Q., Chen, C.-Y., & Quan, Z.-X. (2012). Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiology*, 12(June), 66.
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2014). Secuenciación de fragmentos de ADN. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (Primera, pp. 231–249). México.
- Martinez-Nieto, P., & Garcia-Gonzalez, D. (2010). Bacterias diazotroficas y solubilizadoras de fósforo aisladas de las especies forestales altoandinas colombianas *Weinmannia tomentosa* y *Escallonia myrtilloides*. *Rev. Intropica*, 5(13), 63–76.
- Martínez, C., & Silva, E. (2004). Metodos físico químicas en biotecnología. *Analytical Chemistry*, 62(13), 1202–1214.
- Marusina, A., Boulygina, E., Kuznetsov, B., Turova, T., Kravchenko, I., & Gal'chenko, V. (2001). A system of oligonucleotide primers for the amplification of nifH genes of different taxonomic groups of prokaryotes. *Mikrobiologiya*, 70(1), 86–91.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno Juliana Mayz-Figueroa. *UDO Agrícola*, 4(1), 1–20.

- Melgarejo, L., Sánchez, J., Chaparro, A., Newmark, F., Santos, M., Burbano, C., & Reyes, C. (2002). *Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia* (INVEMAR No). Bogotá: Cargraphics.
- Menezes, A. (2009). *Aislamiento y caracterización de bacterias diazotrofas asociadas a maíz (*Zea mays*) variedad PAU 871*. Universidad de la República de Uruguay.
- Mirza, M. S., Mehnaz, S., Normand, P., Prigent-Combaret, C., Moëgne-Loccoz, Y., Bally, R., & Malik, K. A. (2006). Molecular characterization and PCR detection of a nitrogen-fixing *Pseudomonas* strain promoting rice growth. *Biology and Fertility of Soils*, 43(2), 163–170.
- Montenegro, S., Ararat, M., & Betancur, J. (2015). Cachaza y carbonilla: residuos agroindustriales con potencial de fertilización biológica nitrogenada. *Revista de Investigación Agraria Y Ambiental* 2, 6(1), 83–90.
- Moore, E., Tindall, B., Martins, V., Pieper, D., Ramos, J., & Palleroni, N. (2006). Nonmedical : *Pseudomonas*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, & E. Starckebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (tercera ed, pp. 646–703). Springer.
- Moreno, L. Y., & Galvis, F. (2013). Potencial biofertilizante de bacterias diazótropas aisladas de muestras de suelo rizosférico. (Spanish). *Pastos Y Forrajes*, 36(1), 33–37.
- Newell, S., Pritchard, K., Foster, S., & Fulweiler, R. (2016). Molecular evidence for sediment nitrogen fixation in a temperate New England estuary. *PeerJ*, 4, e1615. <http://doi.org/10.7717/peerj.1615>
- Obando, D., Burgos, L., Rivera, D., Rubiano, M. ;, Divan, V., & Bonilla, R. (2010). CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS ASIMBIÓTICAS ASOCIADAS AL EUCALIPTO (*Eucalyptus* sp.) EN CODAZZI , CESAR

- (COLOMBIA). *Acta Biologia Colombia*, 15(3), 107–120.
- Oldroyd, G. E. D., & Dixon, R. (2014). Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 19–24.
- Orozco, F. H. (1999). *La Biología del Nitrógeno*.
- Orozco-Jaramillo, C., & Martínez-Nieto, P. (2009). Evaluación de la inoculación con microorganismos fijadores de nitrógeno asimbióticos aislados de la rizósfera de *Pinus patula* en Colombia. *Bosque (Valdivia)*, 30(2), 70–77.
- Otero, V. (2011). *Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la Costa Atlántica Colombiana*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pandya, N., & Desai, P. (2014). Screening and characterization of GA3 producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(5), 110–115.
- Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. Pontificia Universidad Católica de Argentina.
- Pedraza, R. O., Teixeira, K. R. ., Fernández, A., García, I., Baca, B. E., Azcón, R., ... Bonilla, R. (2010). Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. *Revista Corpoica*, 11(2), 155–164.
- Peña, H. B., & Reyes, I. (2007). Aislamiento y evaluación de bacterias fijadoras de nitrógeno y disolventes de fosfatos en la promoción del crecimiento de la lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Interciencia*, 32(8), 560–565.
- Pérez, Y., Díaz, A., Restrepo-Franco, G., Diván-Baldani, V., & Hernández-Rodríguez, A.

- (2015). Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(1), 17–26.
- Poly, F., Jocteur, L., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95–103.
- Radic, S., & McAdam, J. (2012). Estimación de la fijación de nitrógeno en una vega de tierra del fuego por el método de la diferencia de nitrógeno. *Anales Instituto Patagonia (Chile)*, 40(2), 95–102.
- Rajeswari, K., & Kasthuri, M. (2009). Molecular characterization of *Azotobacter* spp. nifH gene Isolated from marine source. *African Journal of Biotechnology Vol.*, 8(24), 6850–6855.
- Ralston-Barrett, E., Palleroni, N., & Doudoroff, M. (1976). Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of the “*Pseudomonas alcaligenes*” Group. *Journal of Systematic Bacteriology*, 26(4), 421–426.
- Ramírez, S. (2015). *Técnicas moleculares y caracterización de rizobacterias (pgpr) bacillus amyloliquefaciens y pseudomonas fluorescens*. Universidad Francisco de Paula Santander.
- Reinhardt, É. L., Ramos, P. L., Manfio, G. P., Barbosa, H. R., Pavan, C., & Moreira-Filho, C. a. (2008). Molecular characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from Brazilian agricultural plants at São Paulo state. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 414–422.
- Reyes, I., Alvarez, L., El-Ayoubi, H., & Valery, A. (2008). Selección y evaluación de rizobacterias promotoras del crecimiento en pimentón y maíz. *Bioagro*, 20(1), 37–48.
- Ribeiro, C. M., & Cardoso, E. J. B. N. (2012). Isolation, selection and characterization of root-

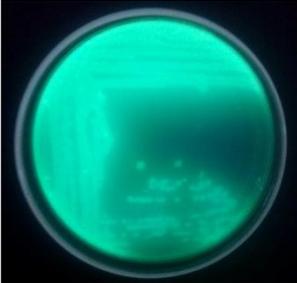
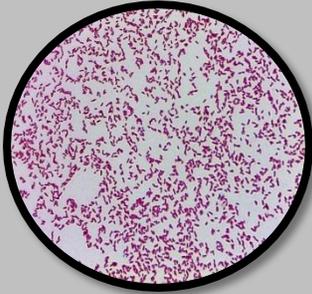
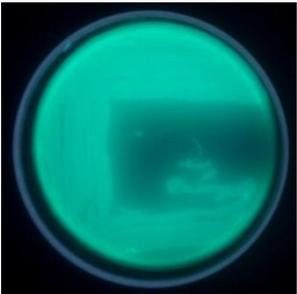
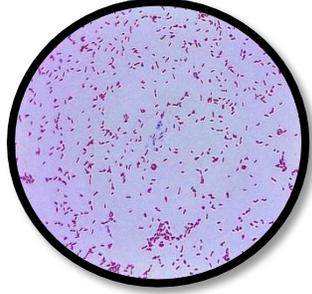
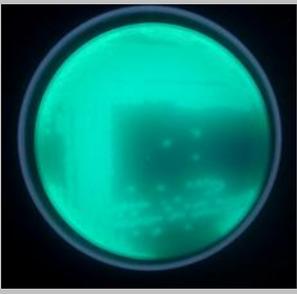
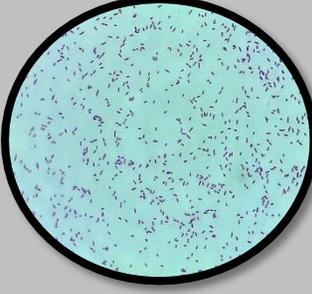
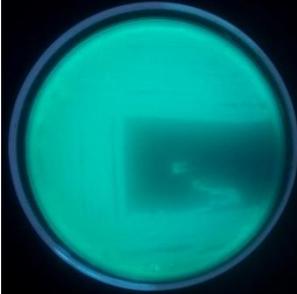
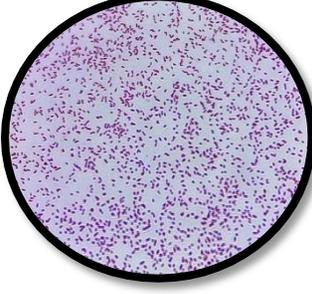
- associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological Research*, 167(2), 69–78.
- Rivas, R., Velázquez, E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Mateos, P. F., & Molina, E. M. (2004). Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 413–426.
- Rodríguez, R. (2008). *Análisis de la población bacteriana endofita presente en nódulos de Lupinus: interacción y localización in situ*. Universidad de Salamanca.
- Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, F., & Knowlton, N. (2001). Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. *Coral Reefs*, 20(1), 85–91.
- Romani, A., Artigas, J., Camacho, A., Graca, M., & Pascoal, C. (2009). La biota de los ríos: los microorganismos heterotrofos. In A. Elosegi & S. Sabater (Eds.), *Conceptos y técnicas en ecología fluvial* (pp. 169–218). España: Fundacion BBVA.
- Saharan, B., & Nehra, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria : A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research*, 21, 1–30.
- Sampieri, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2015). *Metodología de la investigación* (Quinta edi, Vol. 1). México D.F.: McGrawHill.
- Sánchez, J. D. (2012). Acidez de los suelos y su manejo. *CENIBANANO*, 3, 1–10.
- Schuller, M., Sloots, T. P., James, G. S., Halliday, C. L., & Carter, I. W. J. (2010). PCR for clinical microbiology: An Australian and international perspective. *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective*, 1–438.
- Seefeldt, L. C., Yang, Z., Duval, S., & Dean, D. R. (2013). Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1827(8-9), 1102–11.

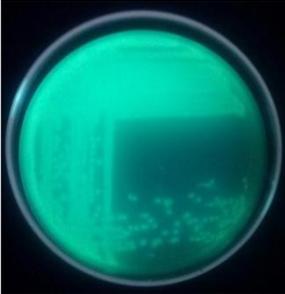
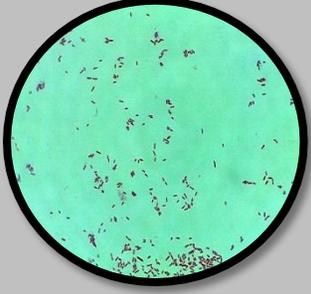
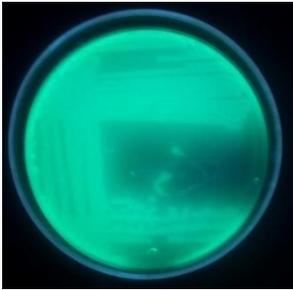
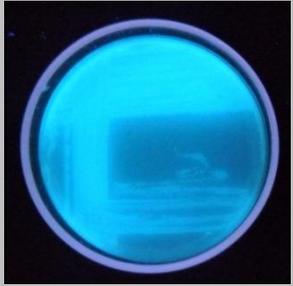
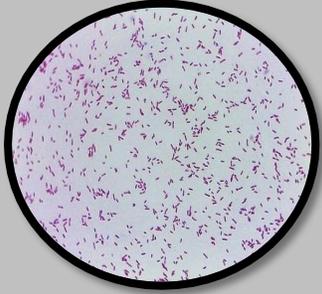
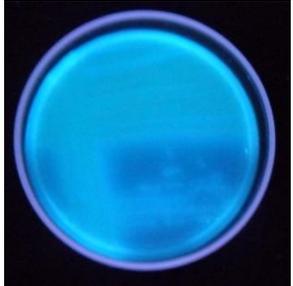
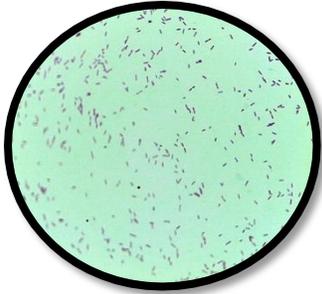
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2014). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (Primera, pp. 53–74). México.
- Singh, N., Singh, R., Meena, V., & Meena, R. (2015). Can we use Maize ( *Zea mays* ) Rhizobacteria as Plant Growth Promoter? *Vegetos- An International Journal of Plant Research*, 28(1), 86–99.
- Solano, M. (2010). *Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias causantes de pudrición blanda en malanga (Colocasia esculenta Schott)*. Universidad Veracruzana.
- Steenhoudt, O., & Vandereyden, J. (2000). Azospirillum, free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 487–506.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA.
- Toro, M., Ramiírez-Bahena, M., Cuesta, M., Velázquez, E., & Peix, A. (2013). *Pseudomonas guariconensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 4413–4420.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena). Buenos Aires, Argentina.
- Valencia, H., Lozano, A., & Valero, N. (2001). Aislamiento y caracterización de fijadores biológicos de nitrógeno asociados a caña de azúcar panelera Colombia. *Suelos Ecuatoriales*, 131(1), 96–102.
- Venieraki, A., Dimou, M., Pergalis, P., Kefalogianni, I., Chatzipavlidis, I., & Katinakis, P. (2011). The Genetic Diversity of Culturable Nitrogen-Fixing Bacteria in the Rhizosphere

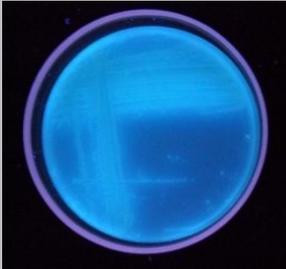
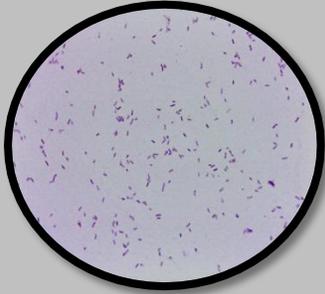
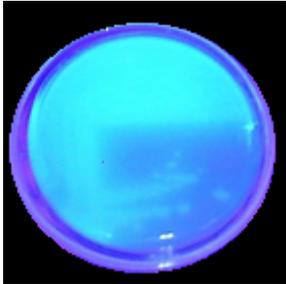
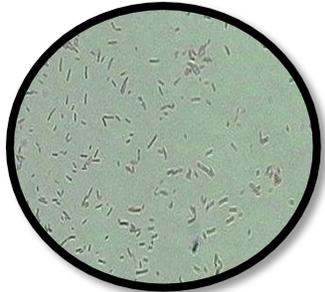
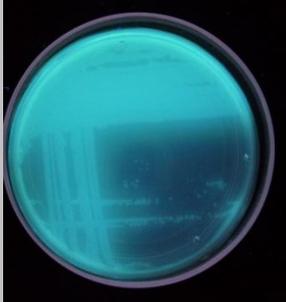
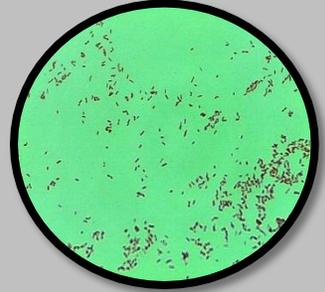
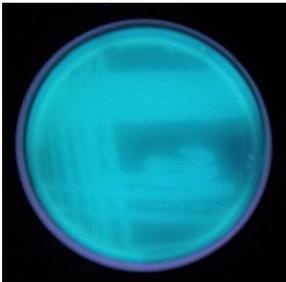
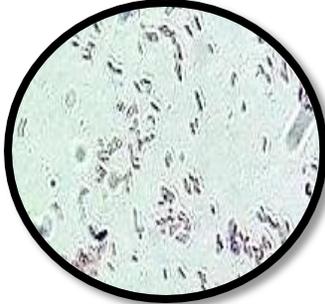
- of Wheat. *Microbial Ecology*, 61(2), 277–285. <http://doi.org/10.1007/s00248-010-9747-x>
- Villanueva, E. E., & Quintana, A. (2012). Aislamiento y selección de bacterias nativas de rizobios fijadores de nitrógeno , a partir de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* . *Rebiol*, 32(1), 24–30.
- Villasanti, C., Román, P., & Pantoja, A. (2013). *El manejo del suelo en la producción de hortalizas con buenas prácticas agrícolas* (FAO). Paraguay.
- Wang, L.-T., Tai, C.-J., Wu, Y.-C., Chen, Y.-B., Lee, F.-L., & Wang, S.-L. (2010). *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9), 2094–2098.
- Widmer, F., Shaffer, B., Porteous, L., & Seidler, R. (1999). Analysis of nifH Gene Pool Complexity in Soil and Litter at a Douglas Fir Forest Site in the Oregon Cascade Mountain Range. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 374–380.
- Yan, Y., Ping, S., Peng, J., Han, Y., Li, L., Yang, J., ... Lin, M. (2010). Global transcriptional analysis of nitrogen fixation and ammonium repression in root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *BMC Genomics*, 11(Iii), 11.
- Yan, Y., Yang, J., Dou, Y., Chen, M., Ping, S., Peng, J., ... Jin, Q. (2008). Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(21), 7564–7569.
- Zani, S., Mellon, M., Collier, J., & Zehr, J. (2000). Expression of nifH Genes in Natural Microbial Assemblages in Lake George , New York , Detected by Reverse Transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 3119–3124.
- Zehr, J., & McReynolds, L. (1989). Use of degenerate oligonucleotides for amplification of

the nifH gene from the marine cyanobacterium *Trichodemium thiebautii*. *Applied Environmental Microbiology*, 55(10), 2522–2526.

**Anexo 1 Reactivación de las cepas****Tabla 8** Fluorescencia en luz UV y tinción de Gram de las 12 bacterias

Código cepa	Foto al transiluminador	Foto al microscopio
RZH133		
RZH134		
RZH135		
RZH136		

<b>RZH137</b>		
<b>RZH138</b>		
<b>RZH139</b>		
<b>RZH140</b>		

<b>RZH141</b>		
<b>RZH142</b>		
<b>RZH143</b>		
<b>RZH144</b>		

## Anexo 2. Secuencias del gen ARNr 16S

### RZH133\_27F

CTCTTACTCCGTAGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGGGACGGGTGAGTAATGC  
 CTAGGAATCGCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGA  
 TCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTA  
 ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGG  
 ACAATGGGGGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA  
 GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATA  
 CAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGG  
 CTCACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAAATGC  
 GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCA  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCT  
 AACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGGC  
 TTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAA  
 CCCTTGCTCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAAGTGGGGGATG  
 ACGTCAAGTCAATGAGCCCTTACGGCCTGGGGTTACACCGGGTTACAAATGGTTCGGGAACAAAGGTTGCCAAACCCGCG  
 AGGTGGGAGCTAATCTTCAAAAACCGATCGGTATTCCGGGTTCCAGTTGGCAAACTCCAATGGGGGAAAAGCGGAATCTTA  
 AAAAATCCGGAATCCAAATGGTCCGGGGGAAAAAATTCCCGGGCCTGTAAACCCGCGGTGTAACATGGGGAAGGGGGTGG  
 CCCAAAAAATAATTTAACTTCCGGGGGAGGTTACGGGTAACGGGTTGGTGGGGGTAAGCCCCAGGGACAAAAACA  
 AGAATCAAAGGAACGGGAACCTAATGCCGAA

### RZH133\_1492R

GTGTTATCCTGCACTCGCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGG  
 GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTCTGATTCCGGATTACTAGCGATTCCGACTTACGCAGTCGAG  
 TTGCAGACTGCGATCCGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTGTACCGACCATTTGT  
 AGCAGCTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACTTCTCCGGTTTTGCACCGGCAGTCTCCT  
 TAGAGTGGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTAACCCAACTCTACGACAC  
 AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTCTGCATGTCAAGGC  
 CTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCGTAATTCATTGAGTTTTAA  
 CCTTGGCGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGAC  
 ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCAAGGCTTTCGCACCTCAGTGTCAATCAGTCCAGGT  
 GGTGCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCTTCTATACTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACCACCCTTACCATACTCT  
 AGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTAC  
 GCCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGGTA  
 ACGTCAAACAGCAAGGTATTAACCTTACTGCCCTTCTCCCACTTAAAGTGTCTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGC  
 GGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCAATATTTCCCACTGCTCCCGTAGGAGTTCGACCGGCTCAGGCTCCTCAATTC  
 AGGGGGATGATCTCTCTCAAACAATTACGGATCGTGCCTTGGGGAGCTTACTCCCAACTAGCTAATCCGACCAAGGTCT  
 CTTGGTAACGGGAGGGCCGAAATCCACCTTTTCCCGAGGAAGTGGCGGGTTAAGGCCTCTCGAAGGTGCCACTACAGGG  
 AATCTAGGTTATCACCGCGCCTGAAAAGGAAATCCGTCGCTTTTGGAGTCGCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTTAGATAAGG  
 ATGAATGCAAGGGACCAACCAAAACAAAGCAAAAT

### RZH134\_27F

CGATTCCGTCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGGGACGGGTGAGTAATGCCTA  
 GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGATCT  
 TCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACA  
 ATGGGGGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAAGG  
 CAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAG  
 AGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGGCTC  
 AACCTGGGAACTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
 GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAA  
 AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACAGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAAC  
 GCATTAAGTTGACCGCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGC  
 ATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAAAATGGATTGGTGCCTT  
 CGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAC  
 CCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAAAGGGGGGGATGA  
 CGTCAAGTATCATGGGCCCTTACGGCCTGGGGTTAACACGTGGTTACAATGGTGCCGTAACCAAGGGTTGCCAAACCCCG

CGAGGGGGGAGTTATTCTCCAAAACCGATCGTGATTCCGGGTGGCAGTTTGGCACTCCACTGGCGGGAAATCGCAATCCTAA  
 GAATCCGAAAATAAATGGACGCGGGTAAAACCTCCCCGGCCTTGTCACCGCCCCCGGCCCATGGAAGGGGTGGCCAA  
 AAAAAATGTAACCTCCGGGCGGACTGTTACGGTTAGGGGTATGGGGGTGAGGGGGGAGAAAAGAAAAAGGGTTAAAGT  
 TGAAAATTTAAAAGGAAAAAATGAGGTTTGGGTTTTTTTTGTTTTAAAGGAAATAAAGTTGTTTTTAATTTTTTTTCTTTC  
 CTTTCTCCCCTTTCTCTTTCTGTTTCTTTTTTGGTTTTCGTTTTTTCGGGGTGGTTTTTTTCTGGCCCTTTTTTTCTTTTTG  
 GA

## RZH134\_1492R

CTTTCTGCTCCAGTTCTGCTTTGGATGGTGGAAAGTCAGCCCGAGGGTTAGACGAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGT  
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGC  
 AGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCG  
 ACCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGG  
 CAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAAACCAACATCTC  
 ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTCCCGAAGGCCAATCCATCTCTGGAAAAGTTCTCTGCAT  
 GTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTG  
 AGTTTTAACCTTGGCGCCGTAACCTCCCAAGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCACACGGC  
 TAGGTGACATCGAATTACGGCGTGAACCTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACGACGATGCAGAATCA  
 TTCCAGGTGGTTCGCTTCCGCACTGTTGATCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGTAAATCCACCACCTCTACC  
 ATACTCTAACTCGCCATGTGTGGATGCATGTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAGCTTAAAGAACCCACTACTCGCG  
 CTTTACGCCAAAAATTCGATTAACGCTTGCACCTCTGGATTACAGCGGCTGCTGGAGCGAATTTATCCGATACTTATTCTG  
 GCAGTTACGACAAAAACGACAAGGAATTAACCTTACTGCCCTTACTACCAACTAAAATGCTTTCAATCCGAAGACCTTCTTCA  
 ACACACGGGATGGCTGAATCAGCTTTCGCCATTGTGCATTATTCCCCATGCTGCCTCCCGAGGGATTTTGTACTGGTTTCAGAT  
 CCTTAGAAGTATGCAACCTCGGACATTTACGAATGTTCCGTTGGGTAGTCTTAGCAACCCATAATTAATGACAATCAAATTA  
 TTAGAGAGCGTGGGTCTGAAAAGCCCCCTTTTCCCAATGAATTTAGGGATTGTTGACCTTAAACGAAGGGGACCCCTGATAGAA  
 AAATCTGAAGTATTGTCCAACCCCCATTAGTGATTAGGATTCCCAATACCATAGCTATGTAGGGGGTCGACCCTATTGTTTTT  
 ATCGG

## RZH135\_27F

CTCCATCCGTACGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGTCTCTTGATTACGCGGGGACGGGTGAGTAAATGCC  
 TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGAT  
 CTTCCGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTACCAAGGGCAGCATCCGTAA  
 CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGA  
 CAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG  
 GGCAGTAAGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGTAACCTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATAC  
 AGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGC  
 TCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCG  
 TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAA  
 ACAGGATTAGTAACTTGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTAGTGGCGCAGCTA  
 ACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGGCCGACAAGCGGTG  
 GAAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGCTTGCATGCAGAGAACTTCCAGAAAATGGATTG  
 GTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCGTAACGA  
 GCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCAACGTCATGGTGGGCACTTAAAGGAGACTGCCGGTGAACCCGAGGAAAGGGGG  
 GGGGATGACGTCAAAGTCATCATGGGCCCTTACGGCCTGGGGTTACACCCGTGCTTACAATGGTCCCGGACAAAAGGGTTGCC  
 AAACCCGCGGAGGGGGGAGTTATTTCCCAAAACCGATCGTAATCCCGATCGCAGCTTGAACCTCCACTGCGTGGAAAATCG  
 CAATCCCTAAGAATCCGAAAACAAAATGTGCGGGGGGAAAACATTTCCCGGGCTTGTAAACAGCGCGCTTGCACACATGGGA  
 AAGGGGTGGCAACAAAATAATCTACCTTCCGGGCGTGACCGGATTCCGGTCGATTGGTTGGCGGAGGAAGGCGGTGACTGT  
 AGGACGGCCATTGACCGCATGCCATGACCGGCTGCCAAAAAAAACCGAAAAGGAAAGGAACCCGGAAAAGGGGGGCAAG  
 GGGGGCAGGGAACCGGACT

## RZH135\_1492R

TTTTTCTTTTATTGCTCTGGCGAGGCTACCGTCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTG  
 ACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGT  
 CGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTCTGTACCGACC  
 ATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCGAG  
 TCTCCTTAGAGTGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAAACCAACATCTCACG  
 ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAAGTTCTCTGCATGTC  
 AAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGT  
 TTTAACCTTGGCGGCTACTCCCCAGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAG

TTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAAGTATCAGTC  
 CAGGTGGTTCGCTTCCGCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCACCACCTCTACCAT  
 ACTAGCTCGCCAGTTTTGGATGACAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGGC  
 TTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGT  
 CGGTAACGTCAAACAGCAAGGATTAACCTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTCACA  
 CACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCA  
 GTTCCAGTGTGACTGATCATCTCTCA

## RZH136\_27F

CTCCATACGGTTCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACGCGGGGACGGGTGAGTAATGCC  
 TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGAT  
 CTTCCGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTACCAAGGCGACGATCCGTA  
 CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACAGGTCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
 CAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG  
 GGCAGTAAGTAAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
 AGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCGGGC  
 TCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCG  
 TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA  
 ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTA  
 ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG  
 AGCATGTGGTTAATTTCGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGCATGCAGAGAAGTTCAGAGAATGGATTGGT  
 CCTTCGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCG  
 CAACCCTGTCTTAGTTACCAGCAGTCACTGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTACAACCGGAGGAAAAGTGGGGG  
 ATGACGTCAAGTCACTATGGGCCCTTAAGGGCTGGGGTTACCACGTGGTTACAATGGTCCGTTACAAGGGTTGCCCAACCCG  
 CGAGGTGGAGTTATTTCCCAAAACCGATCGGAATCCCGGATTCAAGCTTGAAGTTCGCAACTCCACTGCGGGGAAACCGAAATCCCTAA  
 GAATCCGAAATCAAATGGCCCGGGGGAACAATTCCCCGCCTTGTACACGCGCGCTCCCACTCGGGATGGGGTGGCCCAA  
 AATATAAGTAAATCTCGGGAGTCCCGGTTCCGGTTGGTTGGTTAGGTTGGGAATGAGGCGGTTAAGGCAAGTGTATTAG  
 CTCGAAATAAAACCCACAAAAGAAAGGATACCGAAAAGGAAGGGGGAAGGGGGTTAGGGGGGGCGGGGAAGTTTTTATT  
 TTTCCCTTTTATTTTTTTTGTTTTTTTTTTCTTGGCCTTTGGCCGGAAGGACCCGGCGTTCCCGAA

## RZH136\_1492R

CTTCGTTAGCATCAAAGCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGAC  
 GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTTCTGATTCCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCCG  
 AGTTGCAGACTGCGATCCGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTGTACCGACCAT  
 GTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCT  
 CCTTAGAGTGGCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA  
 CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGCATGTCAAG  
 GCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCATTGAGTTTT  
 AACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTG  
 ACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAAGTATCAGTCCAG  
 GTGGTCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCTCTACCATACT  
 CTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTAA  
 CGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGT  
 AACGTCAAACAGCAAGGATTAACCTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACAC  
 GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAAGAATCTGGACCGGGTCTCAGTT  
 CCAGGGGATGGTCACTCTCTAACAATTACGGATCGTCCCCTTGTGGAGCTTTTCTCCCACTAGTTAATCCGACTAAGGTC  
 TTCTGTAAGCGAGAGGGGCGAAAATCCCACTTTCTCCCAAGGAGGTTGGGGATTAAGGCTTTTCGGAGAGTTGTCCCAC  
 AACGAGATTCAAGGATATCCACCGCGCGCTGATAGGGAAGCTCGGACGTCATCGTGGTTCGCGCGCGCTTAGACGGACTAC  
 TAAGTATAAGTAACTAATATTGTCGTCTACCTACTGTTAAATAGTTTTGGAAAATCAATCCAAACCAACCAAAATCTTTGGT  
 TCTTGGGCTCAACCCGGCTCA

## RZH137\_27F

TTTCTCGTACGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTA  
 GGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGATCT  
 TCGGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAC  
 GGTCTGAGAGGATGATCAGTACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATATTGGACA  
 ATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGG  
 CAGTAAGTAAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAG

AGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTC  
AACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCCTA  
GATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCAGCCACCTGGACTGATACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC  
AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTAAC  
GCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGC  
ATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTC  
GGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCC  
TTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGAGGAAAGGGGGGGATGACG  
TCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGGCTGGGGTTACCACCGTGCTACAATGGTCCGGTACAAAAGGGTGGCCAAGCCGCGAGGG  
GGAGTTATTCTCAAAAACCGATCGTAATTCGGGATACAAGTTTGGAAATCCCCTGGCGGGAAAGCGCAATCCCTCGGAAC  
GCCGCAATTCAAATGCTCCGGGTAATACTTCTCCGGGCTGAGCACACGGCCCGCGCCACCGTGGGTAAGGGGTGCGCCAG  
GAAAATGTTTTTACCCTCCGGGGAAGGTTACCTGGTTACTTGGAAATGGGGTGGGGGAAGGGAGTGTGCGGAATGGGTTAG  
GGCAATGTTATTTGGATTTAATTTTTAATTTTTATTTTAGTTTTAA

## RZH137\_1492R

CTCATTAGCATCTAAGCGTGGTACCGTCTCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG  
CGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGT  
TGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTA  
GCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTT  
AGAGTGGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACACGA  
GCTGACGACGCCATGCGACCTGTGTGACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGGTTCTCTGCATGTCAAGGCC  
TGGAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC  
CTTGCAGCCGACTCCAGGGGCTCACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACA  
TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTG  
GTCGCTTCGCCACTGTGTTCCCTTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCACCCTACTCTA  
GCTCGCCAGTTTTGGATGCGATTCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACG  
CCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTA  
CGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCTCCCAACTAAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGGG  
GCATGGTGGATCAGGCTTTCGCCATTTGTCCTAATTCACCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAATCTGGACCGGGTTTCAGTTC  
AGGGGGTGGTATCCTCTCAAAACAGTTACGGATCTGCGCTTGGTGGAGCATTACTCCCAAGATTAATCCGACCTAGGT  
CTCTGTAAAGGGGGGGGGCGAATCCCCCTTCTCTCCGAGAGAGATGGGGGGTTAAAGGTCTTTCCGAAAAGTGCC  
CCCCTACCAGGCGAATTCAGGGTTGATTACCCCGCGGCTGATACAGGAAATCCCTTCTCCATTGTAGGCCGGGTTTC  
TCTTACCCCGGCTCAACGAGTTCAGGGTAAGAAAAAATAAAG

## RZH138\_27F

TTTTTCCACTGTACGGCTACACATGCGAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACGCGCGGACGGGTGAGTAAT  
GCCTAGGAATCGCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGG  
GATCTTCGGACCTCAGTATCAGATGACCTAGGTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACAAAGCGACGATCCG  
TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTCTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGG  
AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTGTTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
TACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG  
GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTGGAATTTCTGTGAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCA  
GCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG  
TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGT  
GCCTTCGGGAACCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCG  
CAACCCTGTCTTACGAGCAGTACGTTGGTGGGCACTTAAGGAAACTGCCGGTGAACAACCGGAGGAAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTAACAACTGCTACAAATGGTGGTACAAAAGGGTTGCTAACCCGCGAGG  
TGGATTAATTTCAAAAACCGATCGTATTCGGGATCGATTGCAATGGCTGAAATCGGAATCCCTAGAATCCCGAAT  
CAAAATGGCCCGGAAAACGTTCCAGGCCCTTGAACCGCCCCCTCACACTGGGAATGGGTTCCAGAAAATAGTTATTGAAC  
TTCGGGGAAGTTCCGGGTTTCATGGGTGGGGGGAAACGGGGAGCCTAGAATTAGGTTTTGGCGTGGTAAAAATTAATAATGA  
AAAAATTAAGAAAAAATAAAGGGGTGAAAATTTAATTTTCA

## RZH138\_1492R

TCGGTAGCACTCGCCGATAGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG  
CGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGT

TGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTA  
 GCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTACCGGCAGTCTCCTT  
 AGAGTGCCCACCATGACGTGCTGGTAACATAAGGACAAGGGTTGCGTCTGTTACGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACAGCA  
 GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCC  
 TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC  
 CTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTTGACA  
 TCGTTACGGGCTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAATCAGTCCAGGTG  
 GTCGCTTCGCCACTGGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCACCACCTTACCATACTCTA  
 GCTCGCCAGTTTTGGATGCGATTCCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACG  
 CCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGCACCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTA  
 CGTCAAAACAGCAAGGATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG  
 GCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCGTAGGAATCTGGACCGGGTCTCAGTTCCA  
 GTGTGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCTTGGTGAACCTTTACCTCACAACAGTAAATCCGACCTAGGT  
 TCTCTGGTAAGCGGGAGGTCGGAGGATCCCCACTTCTTCCCAGGAGGTATGGGGATTAAGGCTCCTTTCGGAAGGTTGCC  
 CCATACCAGGGGAATTTAGGGTTATCCACCAGTCCCCCTATAACAGAGAACTCGCCTCCCGCTTCCGGGTTCTCGGACGT  
 CCTAGCATCGTGGTGGAGATACATTAAGGTCTGCTAAGAAATAAACCCCCCCCCCTTTAAGATGTTAAAGAAAAA  
 GTGAACCCCAATGTTGCTTA

### RZH139\_27F

TTGGGGTCGGTCCGTACGGACTACCATGCAGTCGAGCGGATGAGTGGAGCTTGTCTCCATGATTCAGCGGGGACGGGTGAGT  
 AATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGACAACGTTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCA  
 GGGGACCTTCGGCCCTTCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCGACGA  
 TCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA  
 TATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG  
 AGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTCTGTTTTGACGTTACCCAGAGAATAAGCACCGGCTAACCTTCGTGCCAGCAGCCGCG  
 TAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTTGGTTTCAGCAAGTTGGATGTGAAAGCC  
 CCGGGCTAACCTGGGAACGTCATCCAAAACACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGTTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGA  
 AATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTTGCGAAAGCGTGGG  
 GAGCAAAACAGGATTAAGATACACTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCG  
 CAGCTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGACACAAGC  
 GGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAACTTCCAGAGATGGATTG  
 GTGCCTTCGGGAACCTAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCACGTAACGAG  
 CGCAACACTTGTCTTAGTTACAAGCAGTTATGGGGGAATCTAAGGAAATGGCGGTGACAATCGGGAGGAAGGTTGGGGAG  
 GAGTAAAGTATCATGGGCTTAAGCCAGGGGTAACAAGTGTACATGGTCCGTTACAAGGGTTGCAAGCCGCGAGGGGGACTA  
 ATCCATAAAAACGAACGTAATCGGATACAATTTGCAATCGACTGGTGAAGTCCGATCCCTAAAATCGGGATCAGATGTCGG  
 GAATACGTTCCGGACTGTACACGCCCCGCCACCAAGGGGAGGGTTGGCCAAGAAACATGTAACGTGGGGGAGTTTACTGAA  
 TTCGTCGGTGGAGGATTCGATGCG

### RZH139\_1492R

TTCGTTAGCTCTCTGCAGTGGTACCGTCCCCCTTGGCGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCTCCATGGTGTGACGGG  
 CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTTACCCGTGACATTCGATTACGATTACTAGGGATTCCGACTTCACGCAGTGGAGT  
 TGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTGTACCGACCATTGTA  
 GCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACCTGACCTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCT  
 AGAGTGGCCACCATAACGTGCTGGTAACATAAGGACAAGGGTTGCGTCTGTTACGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACAGCA  
 GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCC  
 AGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC  
 CTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACA  
 TCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAATCAGTCCAGGTG  
 GTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATTCACCACCTTACCCTACTCTA  
 GCTCAGTAGTTTTGGATGCGATTCCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTACATCCAACCTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTTACGC  
 CCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCTTCGATTACCCGCGTCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCTGGCGGTAAC  
 GTCAAAACAGCAAGGATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTACACACGCG  
 GCATGGGTTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGGCCAATATCCCCACTGGTGGCTTCCGTAGGAATCTGGAACCGGGTCTCCAG  
 TTCCAGGGTGGATGATCATCTCTCAAAACAAGTTACGGATCGTCCGCTTGGGGGAGCCTTTACCTCACCACCTAATTAATTT  
 CGAGGAAAGTTCTCTTTGAAAGGAAAGGGCCGAAGGTCCTGTTTTCTCCCGCAGAAGATTAGCCGGGATTAACGTTCTT  
 TTTGAAACAGTGGCCCCCTCCCAAGGGGAATTTAAGGTTAATTTCCCCCTCCGGCGGTGATTTGAGAAATTCCTTTTCGCGCA  
 TGTTGAGTGGGGAGGCGGTAGGTTGACACCCCCCCCCCAATAAATAACAATATTTTTTTTTTTTTAAAAA

### RZH140\_27F

CTACAACCGTAAGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTCAGCGGCGACGGGTGAGTAATGCC  
TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGGGAT  
CTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACAAGGGCAGATCCGTA  
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
CAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG  
GGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
AGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGC  
TCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGCTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGGTGAATGCG  
TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTGTGGCGCAGCTA  
ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAAAGTCAATGAATTTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGT  
GGAAGCATGTGGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAGCTTCCAGAGAATGGATT  
GGTGCCTTCGGGAAGCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTTGGGTTAAGTCCCCTAACG  
AGCGCAACCTTGTCTTAGTTACCAGCACCGTTATGGTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACAACCGAGAAAAGGG  
GGGGGATGAACGTCAAGTCACTTTGGGCCCTTACGGGCTGGGGTTACCACCGGTTACATAGGTGGGGGACCAAAGGGTGGC  
CAACCTCCGAGTGGGTTATTTCTCAAAAACCGATCGTTTCCGGTGGGAGGTTGGTATTCCAATGCCGGTGAATGAGG  
CTCTATAATACGGAATACAAAAGAGCGCGGGGATAACATCCCCGGCCCTGGCATCCGCCGGCCAACAAGTGCAGGGGTGTG  
CACCAAGTCAATTTACTCTGAGGACTGTCGGTTCGGCCGTCGGTGTTCGGACGGACGTAAGTCAGTAATTGATCCAGCTACC  
GGGCGTGGTTCGGTGGGTTCGCTCCCTCCGGGGGGGGGGGAAATTAAAAAACATTGGGAAAAATGAGGGGAAGG  
AAGCCCCCGCCCCCGGTTGCCGGAATAT

## RZH140\_1492R

GTTTTGCTTTCGCAACATCGCCGTAGGTACCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGT  
GACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTAATCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAG  
TCGAGTTGCAGTCCGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTCTGTACCGAC  
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTTGTACCGGCA  
GTCTCCTTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACAAAGGACAAGGGTTCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCAC  
GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAGTTCGGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGCATGT  
CAAGGCCCTGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGTCCCGCTCAATTCATTTGAG  
TTTTAACCTTGCAGCCGATCCCGAGGGGGTCAACTAATGCGTTAGTCCGCCACTAAAATCTCGAGGATTCCAACGGCTA  
GTTGACATCGTTTACGGCGTGTACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGT  
CCAGGTGGTTCGCTTCGGCACTGGTGTCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCGCCCTCTACCG  
TACTTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTCTCATCCAGCTTACGAACCACCTACGCGCGCT  
TTATGTCGTAATTCAGAGCAAAGCTTGCACCCTTGGATTACAGCGACTGGTGCTACAGAGTAAGAGAGGGCTTTCTGTTGT  
AGAATCAAAGCAAGAGGTGTGAGATTTCTGCCCTTCTCCCATCTTAAATGGTTTACATCCGAAGAAGCTTCTCCCTCCCGAG  
ATGCGTGGGATCAGTGTGTGCTGTGTGAGATATCACATGCTTCTCCCGTAGAGCGGAGTGGGGGGGGTATTCTCTGTCAC  
TTATCTATGACGGAGCCGATACCAACAGCACCTGAGGGAGCGTGTCTCGGGCGAGTAGTTACCGACGGAAGTATTTAACAT  
GGGATAGTCGAATGGCACGACGACCCAGCCCTCCCGCTTGTGTAAGGATAAGTTAACGGTTGATTTCCCTGGTTCGAGGACC  
CGGTCCACGCCCGGCCGCTATTCCAGGCCACCGGCCGGAGACGGTAAATGGAATAGGCTCCGCCCTGTAATGCTACGGTA

## RZH141\_27F

TTTTATTCGACGTCGACTACCATGCAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCC  
TAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCGCGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAAGTGGGGGAT  
CTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGGCAGCAGATCCGTA  
CTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGA  
CAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG  
GGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAAGTTCGTCGACGACCGCGGTAATAC  
GAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGC  
TCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGCTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCAA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTA  
ACGCGATAAGTTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAAGTCAAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTCCAGAGATGGATTGGTGCC  
TTCCGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAA  
CCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG  
TCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTCGCTACAATGGTTCGGTACAAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGGGGA  
ACTAATCCATAAAAACCAACCTAG

## RZH141\_1492R

TTTTCTGCTTGTCTCTCCGTGGTACCGTCCACCTTGCGGTTAGACTAGTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACG  
 GGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTTCGA  
 GTTGACAGTTCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTTGTACCGACCATTTG  
 TAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTAGCTCATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCC  
 TTAGAGTGGCCACCCGAGGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG  
 AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGC  
 CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAA  
 CCTTGCAGGCTACTCCACAGGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGCGTTCGAC  
 ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCACCGCTTTCGCACCTCAGTGTCAATCAGTCCAGGT  
 GGTGCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTTACCGTACTCT  
 AGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTGCTGAACCACCTACGCGCGCTTTAC  
 GCCCAGTAATCCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTCTTATTCTGTTGGTA  
 ACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACACACGG  
 GGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATGTCCAATATCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGGTCTCAGTTC  
 AGGGTACTGATCATCTCTCAAACCAGTTACGGATCTGCGCTTGGTAGGCCCTTACCCACAACCTAGCTAATCCGACCTAG  
 GTTCTTTGGAAAGTCCGAGGATCCCACTTTCCCTCAGGAAGTATGCGGAATTAAGCCCGTTTCCGCGAGTTTTT  
 CCCCCATAAGGGGAATTTCTAGGGTATCTCCCCGGTGCAGCTGTAATCAGAAAAGATCCTCTTCTTCTTATTCTTGTACG

## RZH142\_27

CGTAGTCGTTTCGAGTCGATCCCATGCTGTCGAGCGGATGATGGGAGCTTGTCTCTGGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAAT  
 GCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGCGCTAATACCGCATAACGCTCTGAGGGAGAAAAGTGGGG  
 GATCTTCGGACCTACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCG  
 TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
 GGACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGG  
 AAGGGCAGTAAAGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCAACAGAAATAAGCACCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAA  
 TACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGCGCGTAGGTTGGTTCAGCAAGTTGGATGTGAAATCCCCG  
 GGCTCAACTGGGAAGTGCATCCAAAACCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGATATAGAAAGGAACACCAGTGGCGAAGGGCACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  
 CAAACAGGATAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTTGGATCCTTAGTGGCGCAG  
 CTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGT  
 GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTACATGCTGAGAATTTCCAGAGATGGATTGGTG  
 CCTTCGGGAACTCAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGC  
 AACCCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGGGGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGGACAAACCGGAAGGAAGGTGGGG  
 GATGACGCTAAGTCATCATGGGCCTTACGGCCAGGGCTACACACGGTGTACAATGGTCCGGTACAAAGGGGGTGGCCAGC  
 CCCCCAAGTGGAGCTTAATCCATTAACCCCGG

## RZH142\_1492R

ATTTTTTATCTCTTTTTGATGGTACGATGTCTACGTCCACCTTGCGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGG  
 TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACG  
 CAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCCTTGTACC  
 GACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTACGCTCATCCCACTTCTCCGGTTTGTACCCGG  
 CAGTCTCCTTAGAGTGCCACCCGAGGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCA  
 CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTTGAAAAGTTCTCAGCATG  
 TCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGA  
 GTTTTAACTTGCGCCGTACTCCCAAGGCGGTGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCT  
 AGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCAACCGCTTTCGCACCTCAGTGTCAATCAG  
 TCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCTACC  
 GTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTGCTGAACCACCTACGCGC  
 GCTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCT  
 GTTGGTAAAGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA  
 CACACGCGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGTCATATTCACCGCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCTGG

## RZH143\_27F

CTCCCGACGTCGACTACACATGCAAGTTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGTCTCTGATTACAGCGCGGACGGGTGAGTAATGC  
 CTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATAACGCTCTACGGGAGAAAAGTGGGGGA  
 TCTTCGGACCTACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCAACCAAGGCGCAGATCCGTA  
 ACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGG  
 ACAATGGGCGAAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA

GGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  
 CAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGG  
 CTAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCCTGGAGTACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCT  
 AACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGGCCGCAACAGCGGT  
 GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAGTTCAGAAAATGGATTGG  
 TGCCTTCGGGAACCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAG  
 CGCAACCCTTGCTTAGTTACCAGCACCGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGAAAACCGGAGGGAAAGGGGG  
 GGGATGACGTCAAGTCATCATGGGCCCTTACGGGCTGGGGTTAACACGTTGTTACAATGGTTCCGGTACAAAAGGGTTGCCA  
 AAACCCGCGAGGGGGGAGTTATTTCCCAAAAACCGATCGGGATCCCGGATCGCAGTTGCAATTCCTGGCGGGAAATCGG  
 AATCCCTTAAAATCCGAAAACCTAAAAGGGCGGGGGAAACACTTTCTCGGGCTGTACACCCGCGCCGACCTCCGGGA  
 GGGTGTGGCCAAAATAATCTACCTCTCGGGCGTGCCTGATAGGTCGGTCTGTTGGTTGGATGCATCACTCACTGCATG  
 CGCAGGGCGACAGCTAGGAAACAAACCAAAACCATTTAAGGTTAGGGGGGGTAAGGGGGGGGTTGGATAAATA

## RZH143\_1492R

GTTTAGTTGGGTCATGCACTCCCGTGGTACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCCACTCCCATGGTGT  
 GACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAG  
 TCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCTCTGTACCGAC  
 CATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCA  
 GTCTCTTAGAGTGCACCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGTCTGTTACGGGACTAACCCCAACTCAC  
 GACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAAGTTCTCTGCATGT  
 CAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTTGAG  
 TTTTAACTTGGCGCCGTAACCTCCAGGCGGTCACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGCTA  
 GTTGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTCCCGACGCTTTCGACCTCAAGTTCAGTATCAGT  
 CCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCTCTACCA  
 TACTTAGCTCGCCAGTTTGGATGCAAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCG  
 CTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGCACACTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGTATTCTG  
 TCCGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGGCTTCTCCCACTTAAAGTGCCTTACAATCCGAAGAAGTTCTTAC  
 ACACGGCGGATGGCTGGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATTTCCCACTGCTCCCGTAGGAGTTCGAAACGGT  
 CTCAGTTCAGGTGGATGGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTGCCTTGGGGGAGCTTTTACTCACCACCTAATTAAT  
 TCGACCTAAGGTATCTGATAACGGGAGGGTCGAAAATCCCCACTTTTTTCCCGGAGGAAGGTTGGCGGAATTAAGGCTCCT  
 TCCGAACGGTTGTCCACAATCCAGGGCGGTTTCTAGGGGATTTAACCTGGCCGCCGTTTATTAAGA

## RZH144\_27F

CTTTGTTTCGTCGCGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTGATTACGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  
 GCCTAGGAATTCGCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAAGTGGGG  
 GATCTTCGGACCTCAGCTATCAGATGAGCCTAGTTCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCG  
 TAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTACGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
 GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTCTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG  
 AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
 TACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG  
 GGCTAACCTGGGAAGTGCATCCAAAACCTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAAT  
 GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  
 CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAG  
 CTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATGACGGGGGCCGCAACAGCGGT  
 GGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAAGTTCAGAGATGGATTGGT  
 GCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCG  
 CAACCCTTGCTTAGTTACCAGCACGTCATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAAGTTGGGGA  
 TGACGTCAAGTGCATATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGGGCTACAAATGGTCCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGA  
 GGTGAGTTAATCTCCAAAACCGATCGGAATCCGAGTATCCAGTTGCAATTCGAATGGCGGGAAGCGGAATCCTTAAAATCCG  
 AAACCAAAATGTCGGGGGAATACTTTCCCGGGCCTTGTAAACACCGCCCGCACCCATGGGAAGGGGTTGCCAAAAAAAT  
 AAGTAACTTCGGGGGAGGTAAGTGTGTTAGGTTGGGGTAGAAAGGAATGAGAAACCGAAGTACGACAAACAACCAACGA  
 AAGGAATTTTTTTTTTTTTTATTTAA

## RZH144\_1492R

TTTTTCTTTATCTTCTGACCTCTGTGGTACCAGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGTGAACCCACTCCCATGGT  
 GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGC

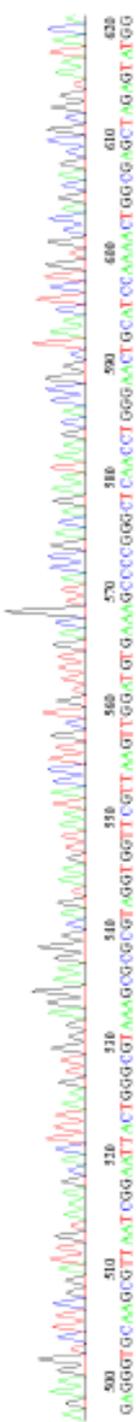
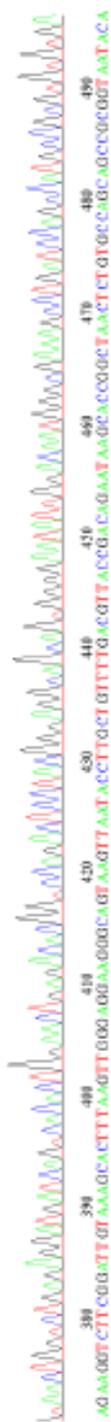
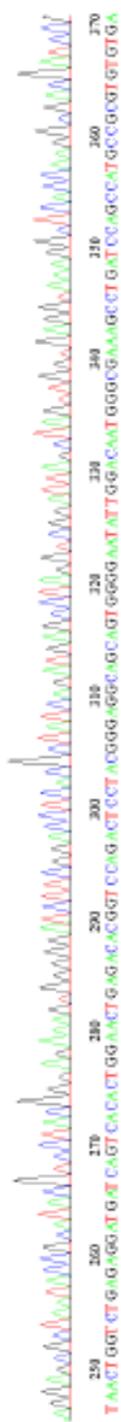
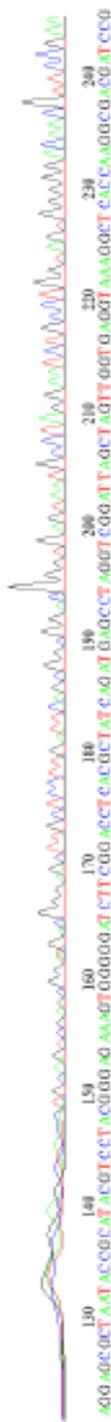
AGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCG  
ACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGG  
CAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATGACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTC  
ACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAAGTTCTCTGCAT  
GTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTG  
AGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATTCCAACGGC  
TAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTCAGTATCA  
GTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTCACCGCTACACAGGAAATTCCACCACCTCTAC  
CATACTCTAGCTCGCCAGTTTTGGATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGAACCACCTACGGC  
CGTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCTGTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTC  
TGTCGGTAACGTCAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCCTCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTC  
ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGGT  
CTCAGTTCAGGGGGACTGATCATCTCTCAAACCAGTTACGGATCGTCCCCTTGGTGAGCCTTACCTCACCAACTAGTTAAT  
CCGACCTAGGTTTCATCTGGTAAGCGGGAGGTCCGAAGATCCCCACTTCTTCCCGGAGGAGGTATGGGGGTTAAGGGTCC  
TTTCGGAAGGTTGCCCCCATTACCAGGAAAATTCTTAGGTTTTATTCCCCGGTCCCCGCTGGAATCAAGGAAAACCTCTCCG

### Anexo 3. Electroferograma de la cepa RZH133

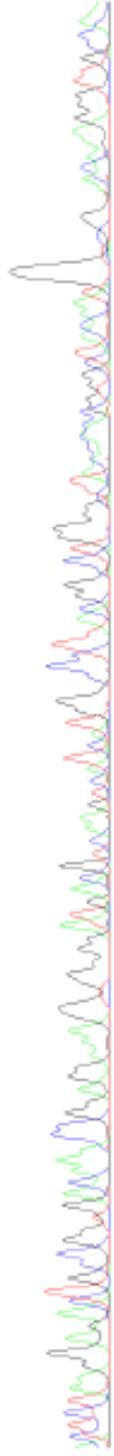
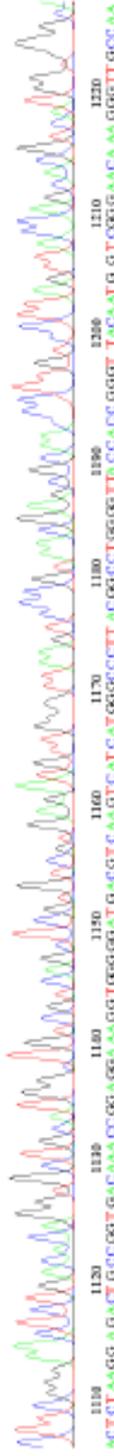
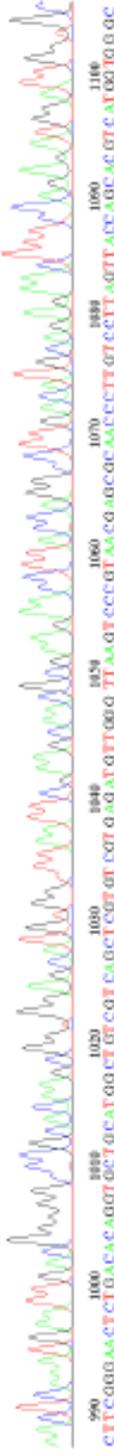
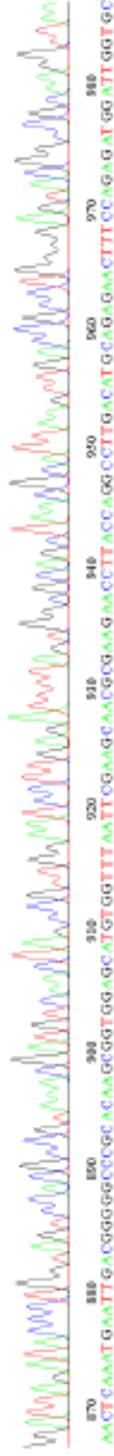
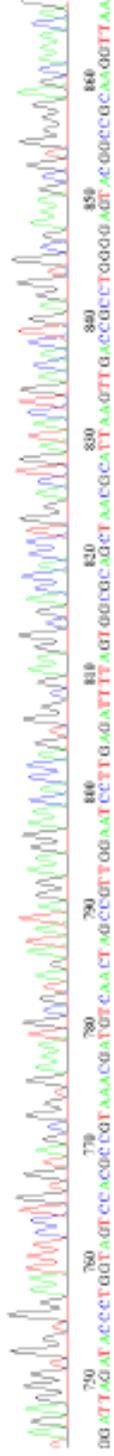


File: 133\_27F.ab1 Run Endat: 2015/7/11 10:9:59 Signal G:2215 A:2106 C:1381 T:1449  
 Sample: 133\_27F Lane: 72 Base spacing: 15.19893 1513 bases in 18508 scans Page 1 of 2

C T C TT A CT GGT A GG CTA GGGGCAGTCGAGGGG TGGCGGG AGTTGGTCTTGGATTCAGCG GGGGAGGCTAGGAGTACTAGGAGTGGTGGTGGGGG CAAAGCTTCGGAA



TAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATATAGGAGGACACCCAGTGGCGAAGGGCGACACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACA



34 38 42 46 50 54 58 62 66 70 74 78 82 86 90 94 98 102 106 110 114 118 122  
 G T G T T A T C C T G G C G T G G T A G G T C C C C C C A G G T T A G A G T A C T T C T G G T G C G G G G G G T G T A C A A G G C C C G G G A A G T A T T C M C C C G G



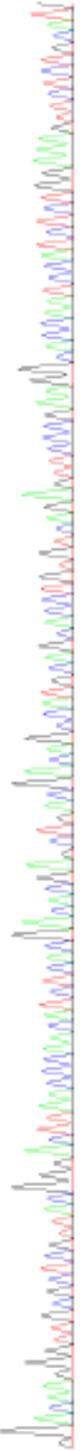
130 134 138 142 146 150 154 158 162 166 170 174 178 182 186 190 194 198 202 206 210 214 218 222 226 230 234 238 242  
 A C G T T C T G A T T C C G C A T T C C G C A T T C C G C A T T C C G A T C C G A T C C C G A C T A C G A T C G G T T T T G T G A G A T T A G C T C C A C C T C G C G G C T T G C A A C C C C T C T G T A C C G



250 254 258 262 266 270 274 278 282 286 290 294 298 302 306 310 314 318 322 326 330 334 338 342 346 350 354 358 362  
 A C C A T T G T G G A C G T G T A G C C C A G C C C T A M G G G C C A T G A T A C T T G A C G T G C A T C C G G C G A G T C C T T A G A G T G C C C A C C A T G A C G T G C T A A C T A A



370 374 378 382 386 390 394 398 402 406 410 414 418 422 426 430 434 438 442 446 448 452 456 460 464 468 472 476 480 484 488 492  
 G G A C A A G G G T T G C G T C C G T A C C G A C A T C T C A C G A C A C G A G E T G A C G A C A C C A T G C A G A C C T G T C A G A G T T C C C G A A B B C A C C A T C C A T C T C T G A A A G T T E T G C A T



500 504 508 512 516 520 524 528 532 536 540 544 548 552 556 560 564 568 572 576 580 584 588 592 596 600 604 608 612  
 G T C A A G G C C T G G T A A G G T T C T T C G G T T G C T T G A A T T A A G C C A C A T G C T C A C A C G G T T G T G C G G G C C C C G T C A A T T G A T T T A G C T T G C G G C G T A C T C C C C A G G C G G T C A A C T T A



