MARTHA E. TRUJILLO TOLEDO, PROFESOR CONTRATADO PERMANENTE, Y EUSTOQUIO MARTÍNEZ MOLINA, PROFESOR CATEDRÁTICO, AMBOS PERTENECIENTES AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA GENÉTICA,

Certificamos que la memoria de tesis titulada **“Distribución, caracterización e importancia ecológica de Micromonospora en nódulos fijadores de nitrógeno de Lupinus”**, presentada por **Pablo Alonso de la Vega** para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y **autorizamos** a presentar dicho trabajo.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca a 7 de Junio de 2010.

Fdo. Dra. Martha E. Trujillo Toledo

Fdo. Dr. Eustoquio Martínez Molina

**ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA GENÉTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

Certifico que la memoria de tesis titulada **“Distribución, caracterización e importancia ecológica de Micromonospora en nódulos fijadores de nitrógeno de Lupinus”**, presentada por **Pablo Alonso de la Vega** para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Martha E. Trujillo Toledo y del Dr. Eustoquio Martínez Molina en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca a 7 de Junio de 2010.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

Las páginas que vienen a continuación son el resultado de casi cinco años de trabajo. Al llegar al final del mismo soy más que nunca consciente de que ha sido, en gran parte, gracias a muchas personas que, con pequeños gestos o con un apoyo tenaz, me han empujado a lograr esta meta. A todas ellas, GRACIAS.

ÍNDICE:

OBJETIVOS DEL TRABAJO	7
RESUMEN EN INGLÉS	11
CAPÍTULO I: Introducción a las Interacciones Planta-Microorganismo	21
INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO	23
Aspectos generales	23
Principales interacciones planta-microorganismo	24
<i>Frankia</i> Y LAS PLANTAS ACTINORRIZAS	27
LOS RHIZOBIA Y LAS LEGUMINOSAS	28
CAPÍTULO II: Estudio de la Diversidad Microbiana Presente en Nódulos de <i>Lupinus</i>	31
EL GÉNERO <i>Lupinus</i>	33
Introducción	33
<i>Lupinus angustifolius</i>	35
<i>Lupinus gredensis</i>	36
La asociación <i>Lupinus-Bradyrhizobium</i>	37
La presencia de <i>Micromonospora</i> en nódulos de <i>Lupinus angustifolius</i>	38
ESTUDIOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA	39
La ecología microbiana	39
Técnicas de estudio independientes de cultivo	40
El DGGE (" <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ").	40
ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN NÓDULOS DE <i>Lupinus angustifolius</i> y <i>Lupinus gredensis</i>	42
Recogida y análisis de las muestras	42
Análisis del suelo rizosférico	45
Aislamiento de las bacterias presentes en los nódulos	47
Estudio de la diversidad bacteriana mediante DGGE	57
DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO III: Análisis de las Cepas de <i>Bradyrhizobium</i> Aisladas de Nódulos de <i>Lupinus</i>	65
EL GÉNERO <i>Bradyrhizobium</i>	67
Situación taxonómica	67
Principales características y descripción morfológica	68
Simbiosis <i>Bradyrhizobium</i> -leguminosas	69
CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS	70
Análisis por TP-RAPD	70
Situación taxonómica de los aislados de <i>Bradyrhizobium</i> en base al ITS1	75
Ensayos de nodulación en <i>Lupinus albus</i> y <i>Glycine max</i>	78
ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Rhizobium lupini</i>	80
CAPÍTULO IV: Análisis de las Cepas de <i>Micromonospora</i> y Otras Actinobacterias Aisladas de Nódulos de <i>Lupinus</i>	83
EL GÉNERO <i>Micromonospora</i>	85
Situación taxonómica	85
Principales características y descripción morfológica	86
Hábitat y principales fuentes de aislamiento	88
Importancia del género	91
ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS	92
Introducción	92
Análisis por BOX-PCR	93

Análisis por TP-RAPD	99
Análisis por ARDRA.....	105
Análisis conjunto de las técnicas de tipado	121
CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS DE TIPO	
ACTINOBACTERIA	126
Análisis filogenético de las cepas de tipo <i>Micromonospora</i>	130
Análisis filogenético de las otras actinobacterias aisladas	134
ESTUDIOS DE FISIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA	140
Microscopía y tinción de Gram	140
Características del cultivo y morfología.....	140
Utilización de fuentes de carbono	146
Pruebas de degradación e hidrólisis de sustratos.....	150
Pruebas de resistencia y tolerancia	154
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA DE <i>Micromonospora</i>	159
La importancia evolutiva en el tamaño de los genomas bacterianos.....	159
Análisis del tamaño genómico de varias cepas de <i>Micromonospora</i>	160
DISCUSIÓN	166
CAPÍTULO V: Estudio de la Capacidad de Fijación de Nitrógeno de	
<i>Micromonospora</i>	169
LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO	171
La importancia del nitrógeno para la vida	171
Descripción del proceso.....	172
Distribución filogenética de los microorganismos diazotrofos	174
La fijación de nitrógeno en el género <i>Micromonospora</i>	175
ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS DE <i>Micromonospora</i> PARA	
FIJAR N₂	176
Justificación del estudio	176
Amplificación del gen <i>nifH</i>	176
Crecimiento en medio libre de nitrógeno	181
Cambios morfológicos relacionados con la fijación de N ₂	188
DISCUSIÓN	192
CAPÍTULO VI: Análisis de la Interacción <i>Micromonospora-Lupinus</i>	195
INTRODUCCIÓN	197
El proceso de infección y nodulación en plantas.....	197
La importancia de las bacterias del género <i>Micromonospora</i> para las plantas ...	198
<i>Micromonospora</i> -leguminosa: Una relación desconocida	199
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE <i>Micromonospora-Lupinus</i>	202
Análisis de la capacidad de <i>Micromonospora</i> para reinfectar nódulos de leguminosas	202
Detección de la presencia de <i>Micromonospora</i> en nódulos a través del gen <i>gyrB</i>	205
Estudio microscópico de <i>Micromonospora</i> en nódulos de <i>Lupinus</i>	206
DISCUSIÓN	218
DISCUSIÓN FINAL	221
El descubrimiento de una nueva interacción planta-microorganismo	223
La comunidad microbiana presente en los nódulos de <i>Lupinus</i>	224
La distribución de <i>Micromonospora</i> en los nódulos de <i>Lupinus</i>	226
La diversidad de <i>Micromonospora</i> en los nódulos de <i>Lupinus</i>	227
¿Un nuevo grupo de actinobacterias diazotrofas?	229
<i>Micromonospora</i> como endosimbionte intracelular	230
Similitudes entre <i>Frankia</i> y <i>Micromonospora</i>	232

<i>Micromonospora</i> -leguminosa: una relación llena de incógnitas	233
Publicaciones	236
CONCLUSIONES FINALES	237
MATERIALES Y MÉTODOS	241
LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO Y MUESTREO	243
AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS	245
ENSAYOS DE DGGE	246
Extracción de ADN de nódulos de <i>Lupinus</i>	246
Amplificación enzimática del gen ARNr 16S	247
Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante	249
Reamplificación y secuenciación	250
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PERTENECIENTES AL GÉNERO	
<i>Bradyrhizobium</i>	252
Extracción de ADN	252
Caracterización mediante TP-RAPD's	252
Amplificación y secuenciación del espacio intergénico ITS1	254
Análisis del espacio intergénico ITS1	256
ENSAYOS DE NODULACIÓN EN <i>Lupinus albus</i> CON CEPAS DE	
<i>Bradyrhizobium canariense</i>	257
CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE TIPO ACTINOMICETO	259
Tinción Gram, morfología y características de cultivo	259
Caracterización fisiológica de los aislados	259
Estudio de la capacidad de crecimiento de los aislados en medio sin nitrógeno	265
CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS DE TIPO ACTINOMICETO	266
Extracción de ADN	266
Caracterización mediante BOX-PCR	266
Caracterización mediante TP-RAPD	268
Caracterización mediante ARDRA	269
Análisis de los perfiles obtenidos para BOX-PCR, TP-RAPD y ARDRA	271
Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S	271
Análisis del gen ribosómico 16S	272
Estimación del tamaño del genoma por electroforesis en campo pulsado (PFGE)	273
Amplificación y secuenciación parcial del gen <i>nifH</i>	275
ENSAYOS DE REINFECCIÓN DE <i>Micromonospora</i> EN PLANTAS	279
Inoculación en plantas de <i>Lupinus albus</i>	279
Inoculación en plantas de <i>Medicago sativa</i>	280
CLONACIÓN DEL FRAGMENTO <i>gyrB</i> DE <i>Micromonospora</i> A PARTIR DE	
NÓDULOS	281
Amplificación del gen <i>gyrB</i>	281
Clonación del fragmento <i>gyrB</i>	282
Obtención y secuenciación del plásmido	283
ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LOS NÓDULOS	284
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	284
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	284
BIBLIOGRAFÍA	287
APÉNDICE	309

ABREVIATURAS:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARDRA	<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i> Análisis de restricción de ADNr amplificado
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> Colección Americana de Cultivos Tipo
CTAB	<i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i> Bromuro de cetil trimetil amonio
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> Electroforesis con gel en gradiente desnaturalizante
DSM o DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i> Colección Alemana de Cultivos Tipo
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> Proteína verde fluorescente
ISP	<i>International Streptomyces Project</i> Proyecto Internacional de <i>Streptomyces</i>
Kb	Kilobase (unidad equivalente a mil pares de bases)
Mb	Megabase (unidad equivalente a mil kilobases)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro Nacional de Información Biotecnológica
OD ₆₀₀	Densidad óptica medida a 600 nm
pb	Pares de bases (unidad de medida del tamaño de la molécula de ADN)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	<i>Plant Growth-Promoting Rhizobacteria</i> Rhizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> Electroforesis con gel en campo pulsado
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i> Microscopía electrónica de barrido
Tampón TAE	Tampón compuesto por “Tris-Acetato-EDTA”
Tampón TBE	Tampón compuesto por “Tris-Borato-EDTA”
Tampón TE	Tampón compuesto por “Tris-EDTA”
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> Microscopía electrónica de transmisión
TGGE	<i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> Electroforesis con gel en gradiente de temperatura
TP-RAPD	<i>Two Primers - Random Amplification of Polymorphic DNA</i> Amplificación al azar de ADN polimórfico mediante dos oligonucleótidos
T-RFLP	<i>Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción terminales
UFC	Unidades formadoras de colonias
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i> Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Planteamiento inicial

En los últimos años se ha descubierto que las bacterias del género *Micromonospora* aparecen de forma sistemática en las placas de aislamiento obtenidas a partir de nódulos fijadores de nitrógeno de varias especies de leguminosas. Este hecho supone una interesante novedad, y contradice en cierto sentido la afirmación establecida de que los nódulos fijadores de nitrógeno de las leguminosas son un nicho creado específicamente por la planta para albergar bacterias de tipo rhizobia, dentro de los cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico. Dada la importancia que las leguminosas tienen para la alimentación humana, y el creciente interés que están adquiriendo los biofertilizantes para la agricultura ecológica, el estudio de la presencia de bacterias del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos adquiere una notable importancia.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la interacción establecida entre *Lupinus-Bradyrhizobium-Micromonospora*, prestando especial atención a la presencia en los nódulos fijadores de nitrógeno de las bacterias del género *Micromonospora*, dado que se trata de una novedosa e interesante relación.

Objetivos concretos

De cara a cumplir el objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Estudiar la diversidad bacteriana cultivable presente en nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis* a partir de técnicas dependientes de cultivo.
- 2.- Estudiar la diversidad bacteriana presente en nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis* mediante técnicas independientes de cultivo.

- 3.- Analizar la distribución de bacterias del género *Micromonospora* en nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*.
- 4.- Identificar y caracterizar las cepas del género *Bradyrhizobium* que inducen la nodulación en las plantas de *Lupinus* recogidas en Salamanca.
- 5.- Identificar y caracterizar las cepas del género *Micromonospora* aisladas del interior de nódulos de *Lupinus* recogidas en Salamanca.
- 6.- Analizar la presencia de bacterias del género *Micromonospora* en el interior de los nódulos, tratando de estudiar su capacidad de infección y situación dentro de estas estructuras.

RESUMEN EN INGLÉS

Abstract

**Resumen
en inglés**

Micromonospora inside root nodules.

Root nodules are unique structures, specialized in nitrogen fixation, formed in legumes and actinorhizal plants, as a result of the symbiosis established with two different groups of bacteria: rhizobia and *Frankia* respectively. It is widely accepted by the research community that root nodules are basically occupied by the bacteria responsible of their formation, however, recently a new group of bacteria has been reported as usual inhabitants of these structures: *Micromonospora*. Members of this genus are being systematically isolated from root nodules.

Up to date, *Micromonospora* strains have been detected in a wide range of legumes, as well as inside some actinorhizal plant nodules (Valdés *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2007b). Due to the recently description of *Micromonospora* inside the nodules, this new interaction is poorly studied. Previous researches have focused on the study of the distribution of these microorganisms among legumes, finding that legume root nodules appear to be an important source of many bacterial species of the genus *Micromonospora*. Some studies also concluded that *Micromonospora*, coinoculated with rhizobia or, alternatively, with *Frankia*, is able to increase the nodulation and to improve the growth of the plants (Solans, 2007; Cerda, 2008). In this sense, it can act as a PGPR. However, it is still too early to explain the exact role that *Micromonospora* strains may play inside root nodules.

Bacterial diversity in lupine nodules.

This work has focused on the study of the root nodules developed in *Lupinus angustifolius* and *Lupinus gredensis* plants, collected in Salamanca. Special attention was paid to the presence of *Micromonospora* inside the nodules, trying to improve our knowledge around this new interaction. Three different sampling periods were established for plant collection from the field during spring time. The first plants were taken approximately two weeks after the plant's emergence, the second one just before the flowering period, and the last one during the flowering stage.

Initially, the diversity of bacteria present in these nodules was analyzed, using standard isolation procedures and culture-independent approaches. Root nodules were surface

sterilized with mercuric chloride, washed with sterile distilled water several times and crushed (Vincent, 1970). The macerate from each nodule was inoculated on YMA and Humic Acid plates, which were incubated at 28°C. Approximately one week after incubation, rhizobia-like colonies appeared on the isolation plates. These bacteria were tentatively identified as *Bradyrhizobium* colonies, based on their morphology. Between two and three weeks after incubation, several colonies, most of them orange pigmented, grew on the plates, showing the characteristic morphology described for the genus *Micromonospora*. These two types of bacteria formed the two major populations isolated from the nodules, obtaining 21 *Bradyrhizobium*-like and 95 *Micromonospora*-like strains respectively. In some isolation plates, other bacteria identified as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Streptomyces* by 16S rRNA gene sequencing were isolated, but only one or two colonies at most were observed.

Micromonospora distribution in different lupine nodules, based on isolation results, is highly variable, both in nodules from the same plant or between nodules from different plants. It was found that many nodules, around the 50%, did not yield any *Micromonospora* colonies, where as only 3 of the 42 sampled nodules produce nearly 60% of the *Micromonospora* strains collected in this study. These results suggest that *Micromonospora* appears to concentrate in a few nodules of the lupine plants, while the others have a very low presence or no presence at all.

For the culture-independent approach, the DGGE technique was selected. Total DNA was obtained from several nodules, following the procedure previously described by Ramírez (1999), with some modifications. The 16S rRNA gene was amplified using universal bacterial primers and PCR products were loaded into a 35-60 % denaturing gradient gel. The separation of 16S rRNA gene fragments using DGGE is based on the sequences, or, more correctly, on their melting domains. Resulting gel bands were excised, DNA recovered by water elution and 16S rRNA gene fragments were reamplified and sequenced. Surprisingly, only two types of bands were obtained, one of them corresponding with *Bradyrhizobium canariense* 16S RNA gene, and the second one corresponding with plant chloroplasts ribosomal gene. No 16S RNA genes from *Micromonospora* were detected. This fact contradicts the isolation results; however, it is possible that the amount of *Micromonospora* DNA in the genomic pool obtained from the nodules may be less than 1%, compared to the chloroplast and *Bradyrhizobium*

vegetative-bacteroid cells, therefore, the DGGE technique is not sensitive enough to detect *Micromonospora* (Schäfer & Muyzer, 2001). It is necessary to point out that although chloroplasts and *Bradyrhizobium* bacteroids contribute with large amounts of DNA in the metagenomic samples, only *Micromonospora* and *Bradyrhizobium* vegetative cells can be recovered on the isolation plates. Therefore in the case of lupine, important differences were observed in the application of culture-dependent and culture-independent techniques to study the bacterial populations present inside the nodules.

Since one of the aims of this work was the detection of *Micromonospora* DNA inside the nodules, another culture-independent technique was applied. DNA isolated from the lupine nodules was used for the amplification and cloning of a *gyrB* gene fragment using specific *Micromonospora* primers previously designed by García *et al.* (2010). Fourteen of the fifteen clones analyzed showed high similarity with fragments of rhizobia complete genome sequences deposited in the NCBI database, whereas one of the clones sequenced corresponded with the *gyrB* gene of *Micromonospora* sp. strain 37 (98% similarity). This result confirmed the presence of *Micromonospora* DNA inside the nodules.

Chrarakterization of *Bradyrhizobium* and *Micromonospora* strains

The results presented above indicated that *Bradyrhizobium* and *Micromonospora* were the two major bacterial populations inside lupine nodules, therefore a taxonomic characterization study of these strains was done.

TP-RAPD fingerprinting profiles were obtained for all *Bradyrhizobium* strains isolated. Representatives from each group were selected for ITS identification, confirming their affiliation with the species *Bradyrhizobium canariense*, known to induce nodules in *Lupinus* spp. plants, especially in Spain and Morocco (Vinuesa *et al.*, 2005). Two different branches were formed in the corresponding phylogenetic tree. *In vitro* nodulation essays in *Lupinus albus* and *Glycine max* were performed with each *Bradyrhizobium* strain, using *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 and *Rhizobium lupini* DSM 30140^T as controls. All the strains isolated in this work were able to induce nodulation in *Lupinus albus*, but not in *Glycine*

max, as expected. Surprisingly, the type strain of *Rhizobium lupini* DSM 30140^T was unable to induce nodule formation in lupine plants, while *Glycine* plants inoculated with the same strain were highly nodulated. ITS and 16S rRNA analyses identified the strain within the *Bradyrhizobium japonicum* species. This result strongly suggests that the original strain deposited by Eckhart in 1931 at the ATCC culture collection has been lost because in the original paper for the description of *Rhizobium lupini*, the strain was confirmed to induce nodules in lupine (Eckhardt *et al.*, 1931).

An initial characterization was performed for all the 95 *Micromonospora*-like strains, using three different genomic fingerprinting techniques: BOX-PCR, TP-RAPD and ARDRA. In all cases, the respective fingerprint patterns were analyzed with the Bionumerics program. A great diversity was observed based on the variability of profiles obtained, especially using BOX-PCR. A global dendrogram was performed using the three techniques profiles at the same time. Some representatives of each group were chosen for 16S rRNA gene sequencing. These results confirmed that most of the strains belonged to the genus *Micromonospora* while nine strains were identified as members of the genus *Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptomyces* and *Verrucosipora*. Phylogenetic analyses confirmed that *Micromonospora* population inside lupine nodules is surprisingly diverse, being distributed along the whole tree of the genus. Among the 44 strains of *Micromonospora* selected for 16S RNA sequencing, there are representatives related with 12 of the 40 validated species of the genus, having three or more strains related with *Micromonospora coriariae*, *Micromonospora echinofusca*, *Micromonospora lupini*, *Micromonospora olivasterospora* and *Micromonospora saelicesensis*.

All the 95 actinobacterial strains were also characterized through phenotypic tests, such as carbon source utilization, degradation of different compounds, growth rates using several media and resistance to various pH, salinity and temperature parameters. These results confirmed the high diversity among the *Micromonospora* isolates.

In addition, genome size estimation for LUPAC 09, MIA 10 and MIA 32 was carried out using the PFGE approach. Genomes sizes ranged from 4.9-5.0 Mb for LUPAC 09 and MIA 10 to 6.5 Mb in the case of strain MIA 32.

Nitrogen fixation in *Micromonospora*

Valdés *et al.* (2005) described the nitrogen fixing capacity of some *Micromonospora* strains isolated from actinorhizal plant nodules. In order to know if strains isolated from legume root nodules also share this diazotrophic ability, nitrogen fixing essays were carried out.

As a first approach, the *nifH* gene of several *Micromonospora* strains was amplified. As it was not possible to obtain good results with the procedure described by Valdés *et al.* (2005), a new PCR strategy was developed, combining primers previously described in the bibliography with other newly designed in this work. In all cases, primers were searched on the basis of *Frankia alni nifH* gene, as preliminary results showed high similarity of *Micromonospora nifH* gene with the corresponding sequence of *Frankia alni*. A fragment of 350 bp was obtained for 12 strains, in all cases having a similarity with the corresponding gene of *Frankia alni* ACN14a (98%). For *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T a 650 bp *nifH* gene fragment was obtained, maintaining high similarity with the sequence mentioned above. These results strongly suggest a recent horizontal gene transfer event between *Frankia* to *Micromonospora*.

Growth tests on nitrogen free BAP-modified medium were also performed. Solid, semi-solid and liquid media were used for growing strains LUPAC 08, LUPAC 09 and MIA 32. Cultures of *Streptomyces coelicolor* and *Paenibacillus polymyxa* were used as controls. *Micromonospora* strains showed growth in nitrogen depleted media in all media tested.

As nitrogen fixation is an oxygen-sensitive reaction, and nitrogenase is irreversibly inactivated by it, diazotrophic bacteria must develop a protection mechanism against O₂ molecules. Samples from *Micromonospora* cultures were observed under the microscope for any morphological changes. SEM images showed the presence of a new type of globular structure never described before for *Micromonospora*. These structures were only found on cultures grown in nitrogen free media, and appeared to be quite similar to *Frankia* vesicles. However, more essays must be done to confirm the potential role of these structures in relation with the possibility that the study strains may fix nitrogen.

Infection capacity and detection of *Micromonospora* in root nodules

The capacity of *Micromonospora* to infect *Lupinus albus* was tested using strains LUPAC 08 and LUPAC 09. For these experiments, *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 was used for coinoculation of the plants since previous results indicated that *Micromonospora* is not able to induce nodules. In most cases, about 50% of the nodules from each plant were infected with *Micromonospora*. As described in the isolation results, most of the nodules infected with *Micromonospora* yielded between 3-4 colonies. A notable exception was a nodule infected by strain LUPAC 09, from which more than 350 colonies were counted. 16S rRNA identification confirmed that the reisolated strains corresponded with the inoculated ones.

Similar results were obtained using the same *Micromonospora* strains inoculated in *Medicago sativa* plants, coinoculated with *Ensifer meliloti* Sm1021. These results suggest a non-specific relationship between *Micromonospora* strains isolated from a specific legume and its capacity to infect other legume species. In this case, *Micromonospora* strains isolated from lupine plants are able to reinfect other legumes, such as alfalfa, or as previously shown *Phaseolus* (Cerdeja, 2008). The ability of *Micromonospora* to infect different legume species deserves to be considered as relevant when compared to the symbiotic interactions rhizobia-legume and *Frankia*-actinorhizal plants which are more restrictive.

The aim to detect *Micromonospora* inside root nodules was studied using different microscopic techniques, such as light, SEM and TEM. In a previous study, success on detecting *Micromonospora* hyphae between the outer nodule cell layers was achieved (Rodríguez, 2008). In the present work, the best evidence of *Micromonospora* present in internal nodule tissues was obtained using TEM. Images obtained showed some large structures, similar in morphology with *Micromonospora* hyphae, inside cortex nodule cells. Considering that these structures are *Micromonospora* hyphae, nodule cell walls might be penetrated by the bacteria. The structure of the host cell membrane appears to remain intact because the bacterium is usually separated from the host cell cytoplasm by the plant cell membrane. This process may be similar to that described for *Frankia* (Miller & Baker, 1985; Benson & Silvester, 1993).

The significant numbers of *Micromonospora* populations in the root nodules suggest that the presence of this microorganism is not casual, but indicates that *Micromonospora* has an important ecological role. Thus, the question is: what exactly is *Micromonospora* doing in the legume root nodules?

CAPÍTULO I:

Introducción a las Interacciones Planta-Microorganismo

INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO

Aspectos generales

Los organismos que forman parte de las comunidades biológicas de cualquier ecosistema establecen entre ellos una serie de relaciones de tipo muy diverso. Los microorganismos no son una excepción en este aspecto, e interaccionan entre ellos y con su entorno. Su presencia en los ecosistemas es tan importante que en muchos casos son capaces de condicionar completamente la vida de otros organismos en el mismo. Las reacciones que éstos llevan a cabo con frecuencia controlan los ciclos de elementos esenciales, como el carbono, el nitrógeno, el hierro, el azufre o el propio oxígeno. La actividad microbiana determina por tanto en gran medida la composición química de su entorno, la disponibilidad de nutrientes y, en general, la composición de los ecosistemas de los que forman parte.

En el caso de las relaciones con plantas, la mayor parte de las interacciones descritas tienen lugar entre la parte radicular de los vegetales y los hongos y bacterias del suelo. Esto es fácil de entender dado que el suelo es el nicho de una gran biodiversidad microbiana, por lo que la parte de las plantas más en contacto con la microbiota se da, precisamente, en el suelo y más concretamente en la fracción del mismo en contacto con las raíces, formando el complejo ecosistema de la rizoplana y la rizosfera. Es frecuente que estos ambientes presenten una mayor diversidad de microorganismos, dado que las raíces de las plantas suelen ser zonas más ricas en elementos nutritivos y agua y con condiciones ambientales más constantes (de pH, por ejemplo). Las plantas cambian las características del suelo debido a los exudados que liberan, en forma de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos, estimulando el crecimiento de ciertas bacterias frente a otras y participando en la activación de genes microbianos responsables de las relaciones simbióticas con las plantas, dando lugar a “comunicaciones” de tipo químico entre plantas y microorganismos (Grayston *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2003; Bauer & Mathesius, 2004). De este modo, las plantas son capaces de condicionar la microbiota presente en su zona de influencia rizosférica, facilitando el crecimiento de bacterias simbióticas.

Por su parte, los microorganismos también influyen sobre el desarrollo de las plantas, dado que aceleran los procesos de mineralización y solubilización de nutrientes, liberan vitaminas y hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, etc. Este es un fenómeno bien estudiado en la actualidad, ya que trata de descubrir los microorganismos promotores del crecimiento vegetal susceptibles de ser empleados como biofertilizantes, en un intento de sustituir los fertilizantes químicos que plantean serias problemáticas de sostenibilidad, contaminación edáfica y de aguas subterráneas, etc.

Además de las interacciones derivadas de la propia actividad bioquímica de los microorganismos, existen otro tipo de relaciones mucho más estrechas y especializadas que se establecen entre ciertos microorganismos endófitos y un variado grupo de plantas. En las simbiosis endofíticas, los microorganismos viven dentro de la misma planta, colonizando las zonas intercelulares o intracelulares. Son especialmente destacables, por su interés agronómico, algunas de las relaciones simbióticas establecidas entre microorganismos y plantas. En este tipo de interacciones simbióticas, los microorganismos y las plantas se benefician mutuamente de forma directa, generalmente intercambiando nutrientes y elementos esenciales para su supervivencia.

Principales interacciones planta-microorganismo

De todas las interacciones conocidas que se establecen entre plantas y microorganismos las más conocidas e importantes (tanto por su extensión como por su interés económico y biotecnológico) son las micorrizas y los nódulos fijadores de nitrógeno, si bien es cierto que nuevas investigaciones describen continuamente nuevas relaciones simbióticas entre plantas y microorganismos.

*** Las micorrizas**

Las micorrizas son el resultado de una de las más extendidas relaciones simbióticas conocidas, de la que forman parte un hongo (*mycos*) y raíces de plantas (*rhizos*). Se trata de una interacción descrita por primera vez por Frank en el año 1885 (Frank, 1885).

El hongo forma una densa red de micelio en el suelo que pasa a formar parte del sistema radicular de la planta (Figuras 1A-1D), ya que su principal función es aportar nutrientes

minerales y agua a la misma, a cambio recibe de la planta hidratos de carbono y vitaminas. Se han descrito más de 5000 especies de hongos capaces de formar esta simbiosis, perteneciendo mayoritariamente a la división *Basidiomycota*, y de forma más excepcional a las divisiones *Ascomycota* y *Glomeromycota*. Se estima que entre el 90% y el 95% de las plantas superiores presentan micorrizas de forma habitual y espontánea (Wang & Qiu, 2006).

Esta simbiosis presenta un gran interés biotecnológico, ya que se ha demostrado que las plantas micorrizadas son capaces de instalarse en suelos más pobres y en condiciones más extremas, crecer más rápidamente y ser menos sensibles a las variaciones ambientales (Guerin-Laguet *et al.*, 2003). Además, otro aspecto de gran interés en esta interacción es la formación de cuerpos fructíferos comestibles, alrededor de la cual existe un importantísimo mercado económico (Figura 1E).

Figura 1.- Hongos micorrízicos.

Raíces de *Quercus* sp. colonizadas por diferentes hongos micorrízicos: *Phialocephala* sp. (A), *Inocybe curvipes* (B), *Peziza* sp (C) y *Scleroderma verrucosum* (D) (Leski *et al.*, 2010). Cuerpo fructífero de *Boletus aureus* (E). Barra = 1 mm.

*** Las simbiosis de la fijación de nitrógeno**

El género *Frankia* y el grupo de los rhizobia son los dos grandes grupos bacterianos capaces de fijar nitrógeno atmosférico como endosimbiontes de plantas, en unos orgánulos específicos denominados nódulos. Las cianobacterias del género *Nostoc* y

Anabaena también son capaces de establecer simbiosis con diferentes plantas, aportando para ellas su capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Es especialmente importante en el caso de la simbiosis *Azolla-Anabaena*, dada su relevancia en el cultivo de arroz (Watanabe *et al.*, 1981).

En general, se trata de unas interacciones de gran importancia en el ciclo del nitrógeno y más aún para el desarrollo de plantas pioneras y colonizadoras de suelos pobres o degradados, dado que permite que existan plantas que puedan establecerse en zonas con muy bajo contenido en nitrógeno, un elemento esencial para el desarrollo vegetal y necesario en grandes cantidades.

Esta simbiosis esta adquiriendo en la actualidad una gran importancia dado el elevado potencial de estos microorganismos como biofertilizantes y su posible utilización para desplazar el consumo de fertilizantes químicos nitrogenados. El uso excesivo de estos fertilizantes químicos está provocando importantes problemas de contaminación de acuíferos, dando lugar a fenómenos de eutrofización de las aguas. El consumo de fertilizantes nitrogenados en España (según datos del Instituto Nacional de Estadística), oscila durante la última década entre las 900.000 y las 1.300.000 toneladas, apreciándose un leve descenso en los últimos cuatro años, en parte gracias al auge de la agricultura ecológica (Figura 2).

Figura 2.- Consumo de fertilizantes químicos en España.

En el gráfico se muestra el consumo, en toneladas, de fertilizantes químicos nitrogenados (granate), fosfatados (amarillo) y potásicos (azul), y su evolución entre los años 1995 y 2007.

***Frankia* Y LAS PLANTAS ACTINORRIZAS**

Las bacterias del género *Frankia* son actinobacterias que establecen simbiosis con un heterogéneo grupo de plantas angiospermas, conocidas como plantas actinorrizas. Se trata de una interacción conocida desde hace más de un siglo y ya en 1886 se consideraba que el endófito responsable de la nodulación de las plantas actinorrizas era de tipo microbiano (Figura 3). Sin embargo los continuos intentos de aislar el simbiote fracasaron continuamente y no se logró hasta el año 1978, cuando el equipo del Doctor J. G. Torrey, de la Universidad de Harvard, logró obtener *in vitro* un cultivo de *Frankia* (Callaham *et al.*, 1978).

Frankia es una bacteria filamentosa Gram positiva, perteneciente al grupo de las actinobacterias, con alto contenido en G+C, englobada dentro de la familia *Frankiaceae*. Sus hifas se diferencian en esporangios, pero también pueden dar lugar a estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno atmosférico, denominadas vesículas, cuya función es aislar a la nitrogenasa del oxígeno. La posición filogenética de *Frankia* es complicada, si bien en la actualidad se acepta la clasificación propuesta por Normand *et al.* (1996), de cuatro grupos establecidos en base a su capacidad para nodular diferentes grupos de plantas actinorrizas:

Grupo 1: cepas que nodulan *Myricaceae*, *Betulaceae* y *Casuarinaceae*.

Grupo 2: cepas no cultivables presentes en nódulos de las familias *Rosaceae*, *Coriariaceae* y *Datisceae*.

Grupo 3: cepas que nodulan *Elaeagnaceae* y *Casuarinaceae*.

Grupo 4: cepas “atípicas” *nif⁻* aisladas de nódulos de diversas plantas.

Hasta la fecha, el grupo de las plantas actinorrizas engloba a más de 200 especies de árboles y arbustos, distribuidas en ocho familias botánicas. En general, se trata de plantas de crecimiento rápido, adaptadas a suelos marginales, que habitan muy diversos ecosistemas y se adaptan a condiciones ambientalmente extremas. Su principal interés económico es maderero, en la recuperación de suelos degradados y en jardinería y ornamentación, careciendo prácticamente de interés agrícola (Valdés, 2002).

En la actualidad esta simbiosis se conoce en profundidad, si bien aún quedan numerosos aspectos por estudiar, muchos de ellos debido a las dificultades encontradas hasta la fecha a la hora de obtener cepas mutantes de *Frankia*, la imposibilidad de desarrollar métodos de cultivo que permitan aislar todo tipo de *Frankia*, etc.

Figura 3.- La simbiosis *Frankia-Alnus*.

Hifas y vesículas en cultivo puro de *Frankia alni* (Benson & Silvester, 1993) (a); nódulo radical formado por *Frankia alni* en *Alnus glutinosa* (b); hojas y frutos de *Alnus glutinosa* (c).

LOS RHIZOBIA Y LAS LEGUMINOSAS

El grupo de los rhizobia esta formado por bacterias Gram negativas englobadas dentro del filo *Proteobacteria*. Su capacidad para formar simbiosis con algunas plantas de la familia *Leguminosae* fue descrita por Frank (1889), caracterizando con ello a la bacteria simbiótica *Rhizobium leguminosarum*. Estas bacterias fijan nitrógeno atmosférico para su planta hospedadora en nódulos similares a los de las plantas actinorrizas,

generalmente ubicados en las raíces de las plantas. El proceso de infección y nodulación en este grupo bacteriano es bien conocido, gracias, en parte, a la facilidad de cultivo de las bacterias que lo forman y a la amplia variedad de mutantes existentes, que posibilitan un estudio detallado del proceso.

La mayor parte de los rhizobia se engloban dentro de la clase *Alphaproteobacteria*, con siete géneros: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium* y *Rhizobium*. Los otros dos géneros del grupo (*Burkholderia* y *Wautersia*) pertenecen a la clase *Betaproteobacteria*.

La familia *Leguminosae*, de distribución cosmopolita, es la más numerosa de las plantas con flores, formada por unos 700 géneros y alrededor de 19000 especies (Castroviejo & Pascual, 1999). Dentro de esta variada familia se encuentran plantas herbáceas, arbóreas y arbustivas, tanto anuales o bianuales como perennes. Pueden presentar hojas de morfología muy variada. Una de las más importantes características son las flores, hermafroditas, de corola papilionácea (en la mayoría de los casos), formada por cinco pétalos libres y diferenciados, siendo el superior el más desarrollado, denominado estandarte o vexilo, dos laterales o alas de menor tamaño y dos inferiores, que pueden estar soldados, formando la quilla o carena. Otra destacada característica de la familia *Leguminosae* son los frutos, de tipo legumbre, que da el nombre a la misma, y generalmente contienen varias semillas en su interior.

Muchas de las plantas que forman la familia son capaces de establecer una simbiosis con bacterias de tipo rhizobia, formándose los característicos nódulos radicales, en los que se fija el nitrógeno atmosférico (Figura 4). Esta relación otorga a las plantas que la desarrollan una gran capacidad colonizadora, permitiéndolas colonizar suelos pobres, en los que la mayoría de las especies vegetales no podrían establecerse.

Figura 4.- Distintas leguminosas y sus nódulos.

Planta de *Phaseolus vulgaris* (a) y los nódulos característicos de su simbiosis con *Rhizobium* (b) (Rivas *et al.*, 2009). Planta de *Medicago sativa* (c) y los nódulos resultantes de la simbiosis con *Ensifer* (d) (Rivas *et al.*, 2009). Planta de *Pisum sativum* (e) y los nódulos formados por su relación con *Rhizobium* (f) (Carro, 2009).

La importancia de este grupo de plantas para el hombre es muy grande. Las leguminosas han sido, y aún lo son en muchos casos, la base de la alimentación humana desde hace miles de años. Ello se debe en parte a su gran distribución a nivel mundial, pero también al elevado contenido proteico presente en el grano de muchas especies de la familia, siendo por ello la principal fuente de proteínas para la mayor parte de herbívoros y omnívoros, incluido el hombre. Como dato indicativo, mientras que las semillas de leguminosas tienen un valor energético similar al de los cereales, su contenido en proteínas llega a ser hasta 4 veces mayor (Jambrina, 1996).

CAPÍTULO II:

Estudio de la Diversidad Microbiana Presente en Nódulos de *Lupinus*

EL GÉNERO *Lupinus*

Introducción

El género *Lupinus* (del latín *lupinus*, perteneciente o relativo al lobo, según Virgilio, debido a la amargura de sus semillas) pertenece a la familia *Leguminosae* e incluye más de 275 especies de plantas herbáceas, anuales o perennes, rara vez arbustos (Figura 5). El género está formado por cientos de especies, mayoritariamente procedentes del continente americano, existiendo tan sólo una docena de especies originarias de Europa y África (Gladstones, 1970).

Estas plantas poseen tallos erectos y ramificados que llegan a alcanzar más de un metro de altura. Las hojas son compuestas, alternas, estipuladas, largamente pecioladas, digitadas y persistentes. El número de folíolos varía de 5 a 12, siendo 7 y 9 los más frecuentes. Las plantas presentan inflorescencias en racimos, compuestas de numerosas flores de cáliz bilabiado, dividido casi hasta la base. Presentan corola papilionácea, azul, violácea, blanca o amarilla, de estandarte erecto, alas oblongas soldadas en el ápice y quilla semicurvada. Frutos en legumbres dehiscentes, con semillas de hasta 14 mm de morfología variada. Cada vaina puede contener de 2 a 9 semillas (Castroviejo & Pascual, 1999).

El sistema radicular de este tipo de plantas es pivotante y profundo, existiendo grandes diferencias entre las distintas especies en lo que respecta a la longitud del mismo. Al igual que otros muchos géneros de la familia *Leguminosae*, los lupinos establecen asociaciones simbióticas con bacterias de tipo rhizobia, formándose en sus raíces nódulos radicales para la fijación de nitrógeno. Poseen raíces proteoides, que les ayudan a extender su sistema radicular, haciéndolo más eficiente en la absorción de nutrientes, siendo fundamental para los lupinos, ya que son una de las pocas leguminosas que no forman micorrizas.

Todas las especies incluidas en el género contienen alcaloides tóxicos y amargos (especialmente esparteína, lupinina, ácido lupínico y lupanina), lo que hace que en

general no sean ampliamente empleadas en la alimentación humana ni animal, a pesar de que su contenido proteico es muy elevado (en torno a 30-50%). Por esta razón, desde los años 30 se han obtenido variedades sin alcaloides, de mucho mayor interés agronómico (Castroviejo & Pascual, 1999).

Figura 5.- Principales características de los lupinos.

Semillas de diferentes tamaños (a) y el fruto en legumbre que las contiene (b). Estructura esquemática de la planta (c) y detalle de las hojas (d) y de la inflorescencia en racimo (e). Nódulos fijadores de nitrógeno resultantes de la simbiosis con *Bradyrhizobium* sp.

Los lupinos se han empleado de forma extensa como abono verde, especialmente en zonas de baja productividad agrícola, gracias a su capacidad para desarrollarse en suelos pobres e incluso ácidos y en climas áridos. En España y Portugal el cultivo del altramuza dulce ha sido tradicionalmente desarrollado para consumo humano de las semillas, al igual que en otros países de Europa del Este, Australia, Sudáfrica y Estados Unidos. Existe constancia de este cultivo desde los tiempos de la época clásica de griegos y romanos, destacando el lupino blanco (*Lupinus albus*), el de hoja estrecha y flores

blancas o azules (*Lupinus angustifolius*) y el lupino amarillo (*Lupinus luteus*) (Jambrina, 1996). Las semillas presentan una interesante calidad nutritiva, especialmente por su elevada proporción proteica (Tabla 1).

Tabla 1. Valor nutricional de las semillas de lupino.

<u>Cada 100 gramos de semillas contiene:</u>	
Proteínas	39 g
Hidratos de carbono	23 g
Lípidos (ácidos grasos insaturados)	15 g
Fibra vegetal	23 g
Calcio	180 mg
Hierro	7,6 mg
Zinc, potasio, fósforo, magnesio, vitaminas del grupo B y vitamina E	Elementos minoritarios

Información nutricional de las semillas de *Lupinus albus* (por cada 100 gramos).
Datos ofrecidos por la Asociación Española de Dietistas-Nutricionistas.

Las especies del género *Lupinus* poseen una extraordinaria capacidad de adaptación a diferentes tipos de factores abióticos, considerándose en este sentido uno de los grupos mejor adaptados dentro de las leguminosas. De esta forma son capaces de resistir estrés provocado por nitratos, salinidad, herbicidas, sequías, acidez, etc. (de Felipe, 2007), llegando a desarrollarse plenamente en suelos muy pobres, incluso en zonas desérticas. Esto hace que tengan una gran importancia como regeneradores de suelos degradados y empobrecidos.

Lupinus angustifolius

También conocido como altramuz de hoja estrecha, debido a la morfología de sus foliolos. Los individuos de esta especie se caracterizan por ser herbáceas anuales que pueden alcanzar los 100 cm de altura. El tallo suele estar ramificado desde la base o desde poca altura. Las hojas tienen entre 5 y 9 foliolos, glabros por el haz y pubescentes por el envés, con peciolo de entre 2 y 7 cm. Las inflorescencias se agrupan en vistosos racimos que pueden alcanzar los 20 cm de longitud, formados por hasta 30 flores que

varían desde el blanco o rosa hasta el azul intenso. Las vainas de los frutos miden entre 40 y 70 mm, conteniendo de 3 a 6 semillas de pequeño tamaño, de color crema, generalmente con manchas grises.

Se trata de uno de los lupinos más abundantes en la Península Ibérica, en buena parte debido a que es una planta que se adapta perfectamente a un gran número de suelos, tanto arenosos como arcillosos, estando presente en prácticamente todas las provincias. Suele crecer en cultivos abandonados, eriales, bordes de caminos, matorrales y, como mala hierba, en campos de cereales y olivos (Castroviejo & Pascual, 1999).

Contiene una elevada proporción de alcaloides tóxicos, derivados de la lupinina y la angustifolina, y en general baja productividad agrícola. En cambio, es poco exigente en cuanto a requisitos edáficos y muy tolerante al frío y a la clorosis. Por este motivo, algunas variedades bajas en alcaloides se emplean como forraje.

Lupinus gredensis

Planta herbácea, anual, de hasta 80 cm de altura. El tallo, muy piloso, suele aparecer ramificado desde la base, con ramas postrado-ascendentes. Las hojas son largamente pecioladas, formadas por entre 4 y 9 folíolos, de haces glabros salvo en los bordes y el envés piloso. Las inflorescencias están formadas por entre 5 y 11 verticilos de 5 flores, de color amarillo pálido o blanco sucio en el caso de los verticilos superiores, rosado o lila en los intermedios y azul en los inferiores. Presentan frutos vellosos en legumbre de hasta 50 mm, terminada en pico punzante y curvo, conteniendo entre 5 y 7 semillas, generalmente lenticulares y de coloración diversa (Castroviejo & Pascual, 1999).

Crece generalmente en cultivos abandonados, cunetas y matorrales degradados, adaptándose a múltiples medios, desde el litoral atlántico hasta zonas de montaña del Sistema Central (hasta 1500 m).

Esta especie se ha empleado tradicionalmente, especialmente en el este de Europa, para realizar cruces con *Lupinus luteus*, de mayor interés agronómico, consiguiendo plantas resistentes al frío y al exceso de humedad.

La asociación *Lupinus-Bradyrhizobium*

La simbiosis establecida entre bacterias del grupo de los rhizobia y las plantas del género *Lupinus* es conocida desde hace más de 100 años, siendo estas bacterias inicialmente descritas como *Phytomyxa lupini* (Schroeter, 1886a). La posición taxonómica de las bacterias responsables de la nodulación en lupinos ha ido variando notablemente a lo largo de los años, siendo en 1931 el año en que se realizó el primer estudio exhaustivo de estos microsimbiontes, pasando a denominarse, de acuerdo a las reglas de nomenclatura de la época, *Rhizobium lupini*, describiéndose como un rhizobio de crecimiento lento (Eckhardt *et al.*, 1931). Este nombre se ha mantenido hasta la actualidad, aunque su posición taxonómica es muy dudosa.

Actualmente se acepta que las plantas de este género son noduladas de forma efectiva por rhizobios de crecimiento rápido y por rhizobios de crecimiento lento (Stepkowski *et al.*, 2007). El primer grupo está muy poco estudiado y, en general, se considera poco extendido a nivel global (Schlinkert-Miller & Pepper, 1988; Pudelko & Madnak, 1996) y salvo excepciones, como la especie *Ochrobactrum lupini* (Trujillo *et al.*, 2005b), se han descrito muy pocas bacterias de este tipo. El segundo grupo es mucho más numeroso e importante, está ampliamente estudiado, y abarca varias especies del género *Bradyrhizobium*, las más extendidas son *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium canariense* (Barrera *et al.*, 1997; Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2003; Vinuesa *et al.*, 2005).

Los nódulos formados en la simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* poseen unas características propias que los diferencian de los formados por otras leguminosas. Se trata de un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados (Bergersen, 1982), denominado nódulo lupinoide o en collar. Básicamente carecen de meristemo terminal, presentando una localización basal-lateral, y comparten características tanto con los nódulos determinados (como la morfología esférica) como con los indeterminados (como algunos aspectos de la distribución zonal). Además, el proceso de infección de las células vegetales no se produce mayoritariamente mediante canales de infección, como en la mayoría de los rhizobia, sino que se consigue mediante la división celular de las propias células infectadas (de Felipe, 2007; Fedorova *et al.*, 2007). La Figura 6 muestra el proceso completo de división de las células vegetales infectadas.

Figura 6.- División de células nodulares de *Lupinus albus* infectadas (Fedorova et al., 2007).

(A) Nódulo en el que se aprecian las células vegetales en división, tanto infectadas (i) como no infectadas (ni). (B–F) Serie de imágenes que muestran diferentes estadios de división mitótica (señaladas con asteriscos) de células vegetales infectadas: metafase (B), anafase (C), telofase (D,E) y células recién divididas (F). Las flechas indican los simbiosomas, que se localizan detrás del núcleo en formación y se mueven hacia el cortex celular tras la citoquinesis. Barra A=75 µm; B-F =10 µm.

En los nódulos lupinoides el nitrógeno es transportado desde los nódulos hacia la parte aérea de la planta en forma de amidas, siendo un caso único dentro de las leguminosas de climas templados. Se considera que este tipo de nódulos poseen una de las mayores eficiencias en la fijación de nitrógeno de todos los existentes, llegando a rendimientos medios superiores a los 250 kg por hectárea y año (de Felipe, 2007).

La presencia de *Micromonospora* en nódulos de *Lupinus angustifolius*

Recientes estudios realizados en nuestro grupo de investigación han demostrado la presencia, abundante y sistemática, de bacterias pertenecientes al género *Micromonospora* en el interior de los nódulos fijadores de nitrógeno de una gran

cantidad de leguminosas (Trujillo *et al.*, 2010). Esta presencia se comprobó también en nódulos de *Lupinus angustifolius*, en los que las poblaciones de *Micromonospora* fueron además localizadas mediante el empleo de sondas de ADN marcadas con moléculas fluorescentes, utilizando la técnica de hibridación *in situ* o FISH (Rodríguez, 2008).

ESTUDIOS DE ECOLOGÍA MICROBIANA

La ecología microbiana

El mundo microbiano es uno de los campos más desconocidos de la biología, en buena parte debido a la complejidad técnica que requiere su estudio. Este hecho hizo que la microbiología, como ciencia, tuviese un origen tardío respecto a otras ramas de la biología y que actualmente sea una de las áreas de conocimiento en mayor expansión y desarrollo. El avance de los estudios de ecología microbiana y la exploración de nuevos hábitats hacen que la descripción de nuevas especies, el descubrimiento de nuevos compuestos de interés económico y el desarrollo de procesos metabólicos de interés biotecnológico sean constantes.

Los primeros estudios de ecología microbiana se basaron en la observación al microscopio de los microorganismos, no pudiendo ir más allá de meras descripciones morfológicas. El verdadero desarrollo de la ecología microbiana tuvo lugar en el siglo XIX, con la mejora de los métodos de esterilización y la obtención de cultivos puros. Durante mucho tiempo la ecología microbiana se basó en técnicas de estudio basadas en el cultivo de los microorganismos, quedando excluidos los organismos que no podían ser aislados en laboratorio. Se considera que entre el 0,001% (en agua de mar) y el 3% (en estuarios naturales) de la diversidad microbiana presente en ecosistemas más o menos complejos puede ser cultivada (Amann *et al.*, 1995). La aparición en los últimos años de nuevas técnicas moleculares, generalmente basadas en el gen que codifica para el ARNr 16S, han posibilitado una exploración más profunda del mundo microbiano, desarrollándose métodos de análisis de la diversidad independientes de cultivo.

Técnicas de estudio independientes de cultivo

El descubrimiento por parte de Carl Woese en 1977 del valor de la molécula del ARNr 16S como cronómetro evolutivo, abrió paso al desarrollo de nuevas técnicas de estudio de la diversidad microbiana desde aproximaciones no dependientes del cultivo de los microorganismos (Woese, 1987). Se inicia así el campo de la metagenómica, que engloba al conjunto de técnicas basadas en el estudio del ADN global (o ADN metagenómico) de una comunidad microbiana, sin necesidad de llevar a cabo el aislamiento individual de cada uno de sus componentes. Existen numerosas técnicas que permiten llevar a cabo este tipo de estudios, como la construcción de genotecas mediante clonación (Pace *et al.*, 1985), la separación de marcadores genéticos en gradientes desnaturizantes mediante DGGE o TGGE (Muyzer *et al.*, 1993), el estudio de los diferentes productos de la digestión del gen ARNr 16S mediante T-RFLP (Liu *et al.*, 1997), etc.

El estudio de las comunidades microbianas mediante el empleo de sondas de ácidos nucleicos marcadas con moléculas fluorescentes ha permitido la detección *in situ* de microorganismos en muestras ambientales, sin necesidad de llevar a cabo su aislamiento, empleando sólo un pequeño fragmento de su ADN-ARN conocido (Giovannoni *et al.*, 1988).

Este conjunto de técnicas han dado la posibilidad de explorar la diversidad microbiana de una forma hasta entonces desconocida, demostrando con ello la enorme importancia de llevar a cabo estudios ecológicos mediante aproximaciones independientes del cultivo de los microorganismos. Así, en la actualidad, tan sólo el 50% de los phyla conocidos dentro el dominio *Bacteria* poseen representantes que hayan podido ser cultivados (Rappe & Giovannoni, 2003).

El DGGE ("Denaturing Gradient Gel Electrophoresis")

La técnica de DGGE o electroforesis en gel con gradiente desnaturizante, se basa en que moléculas del mismo tamaño de ADN o ARN, pero con variaciones en su secuencia, responden de manera distinta a la acción de agentes desnaturizantes. Los

enlaces que se establecen entre guaninas y citosinas son más fuertes que aquellos establecidos entre adeninas y timinas (ADN) o entre adeninas y uracilos (ARN). Esto tiene como consecuencia que las regiones del ADN en las que predominan G-C son más resistentes a la desnaturalización que otras con menos proporción de las mismas.

En el caso del DGGE, se emplea un gradiente en geles verticales de poliacrilamida formado por diferentes concentraciones de urea y formamida, más concentrado en la parte inferior del gel. A medida que las muestras de ADN avanzan a través de la poliacrilamida, el poder de desnaturalización al que se enfrentan es mayor, por lo que la doble hélice comienza a separarse en hebras sencillas en unos puntos determinados llamados "melting domains" o dominios de desnaturalización (Fischer & Lerman, 1980). Una vez que uno de estos dominios alcanza la posición en el gel en la cual la concentración de urea y formamida es suficientemente elevada como para desnaturalizarlo, la separación de las dos hebras de ADN hace que el avance se detenga, quedando la molécula prácticamente parada en esa posición.

El DGGE, al igual que el TGGE, se han empleado desde hace décadas para analizar mutaciones en cualquier fragmento de ADN estudiado, pudiendo detectar variaciones de una sola base en una secuencia de más de 500 nucleótidos (Fischer & Lerman, 1983). El biólogo holandés Gerard Muyzer aplicó por primera vez esta técnica en estudios de ecología bacteriana (Muyzer *et al.*, 1993), ya que permite un análisis detallado de la diversidad microbiana presente en una muestra, por compleja que sea, así como la obtención de "huellas" identificativas de cada comunidad, permitiendo con ello el estudio rápido de los cambios poblacionales sufridos por esa comunidad al variar otros factores condicionantes (series temporales, sensibilidad a la contaminación, sequía, etc.).

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA PRESENTE EN NÓDULOS DE *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*

Recogida y análisis de las muestras

El muestreo de las plantas se llevó a cabo en la localidad salmantina de Cabrerizos (ver Materiales y Métodos), seleccionando al azar ejemplares de las especies de lupinos que crecen allí de forma espontánea, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*. Se extrajeron un total de 26 plantas, repartidas de la siguiente forma:

- 14 plantas de *Lupinus angustifolius*
- 12 plantas de *Lupinus gredensis*

A cada planta se le asignó un código identificativo y se llevó a cabo la medición de su altura, profundidad de la raíz y número de nódulos. Las plantas P3, P7, P9 y P21 se descartaron debido a que no presentaban nódulos, al igual que las plantas P23, P24 y P26 dado que presentaban nódulos senescentes de color negruzco. Del resto de plantas se realizaron aislamientos, excepto de las plantas P4, P11, P12, P14 y P15, de las que todos los nódulos se guardaron en glicerol, para ser empleados posteriormente en caso de que fuese necesario (Tabla 2).

Los muestreos fueron realizados en tres momentos diferentes del desarrollo de las plantas, en la fase inicial de crecimiento, en la fase intermedia y en la etapa de floración. Los resultados de la caracterización de las plantas muestran la evolución de las mismas a lo largo del muestreo.

Tabla 2.- Plantas muestreadas para el estudio.

Código de la planta	Especie	Altura parte aérea (cm)	Profundidad raíz (cm)	Número de nódulos	Época de recolección	
P1	<i>L. gredensis</i>	9	5	7	5 de abril de 2006	✓
P2	<i>L. angustifolius</i>	12	14	26		✓
P3	<i>L. gredensis</i>		Sin nódulos			
P4	<i>L. angustifolius</i>	16	10	21		G
P5	<i>L. angustifolius</i>	17	9	30		✓
P6	<i>L. angustifolius</i>	15	9	26		✓
P7	<i>L. gredensis</i>		Sin nódulos			
P8	<i>L. gredensis</i>	8	10	6		✓
P9	<i>L. gredensis</i>		Sin nódulos			
P10	<i>L. angustifolius</i>	35	16	426		✓
P11	<i>L. angustifolius</i>	14	11	35		G
P12	<i>L. gredensis</i>	10	11	16		G
P13	<i>L. angustifolius</i>	18	14	41		✓
P14	<i>L. angustifolius</i>	12	10	16		G
P15	<i>L. angustifolius</i>	14	11	32		G
P16	<i>L. gredensis</i>	14	32	151	11 de abril de 2006	✓
P17	<i>L. angustifolius</i>	36	17	266		✓
P18	<i>L. angustifolius</i>	30	17	136		✓
P19	<i>L. angustifolius</i>	27	28	93		✓
P20	<i>L. angustifolius</i>	30	14	59		✓
P21	<i>L. angustifolius</i>		Sin nódulos		26 de abril de 2006	
P22	<i>L. gredensis</i>	15	28	21		✓
P23	<i>L. gredensis</i>		Nódulos necrosados			
P24	<i>L. gredensis</i>		Nódulos necrosados			
P25	<i>L. gredensis</i>	13	27	8		✓
P26	<i>L. gredensis</i>		Nódulos necrosados			

La tabla muestra el código de cada planta, la especie a la que pertenece, sus características y fecha de recolección, y si se realizaron aislamientos de ellas (✓) o si se guardaron todos los nódulos en glicerol (G).

Las plantas recogidas el 5 de abril, en el primer muestreo, presentaban en general un bajo número de nódulos y un escaso desarrollo del sistema radicular y de la parte aérea. Los resultados de este primer muestreo reflejaron que tres de las seis plantas de *Lupinus gredensis* recolectados no presentaban aún nódulos radiculares, mientras que los otros tres ejemplares tenían una media de 9,7 nódulos. En cambio, en todas las plantas de *Lupinus angustifolius* se contabilizaron nódulos, con una media de 28,4 por planta, al margen de la planta P10, que siendo un caso único de todas las muestreadas, presentó unas raíces excepcionalmente noduladas, con un total de 426 nódulos (Figura 7).

Figura 7.- Imágenes de la planta de *Lupinus angustifolius* P10.

Sistema radicular excepcionalmente nodulado, tanto en la raíz principal como las secundarias (a). Imagen aumentada de los nódulos (b) y de su sección (c), que muestra claramente que se trata de estructuras totalmente efectivas.

Una semana más tarde, el 11 de abril, se realizó la segunda recolección. En este caso las plantas eran mucho más vigorosas y su porte aéreo y el desarrollo radicular estaba muy avanzado. Todos los ejemplares muestreados de ambas especies presentaban nódulos en sus raíces, con 151 nódulos en el único *Lupinus gredensis* muestreado y con una media de 138,5 nódulos para los *Lupinus angustifolius* recogidos. Se aprecia por tanto una gran evolución de las plantas entre el primer y el segundo muestreo, siendo por tanto la época de mayor crecimiento, especialmente en lo que se refiere a la formación de los nódulos.

El tercer y último muestreo se realizó dos semanas después del segundo, el 26 de abril, en la etapa de floración. En este caso, aunque la apariencia de las plantas era muy buena, las raíces aparecían sin nódulos o con un reducido número de éstos, siendo en general poco efectivos e incluso senescentes. Ésto se debe a que las plantas centran todo su metabolismo en el desarrollo de las flores, con lo que los nódulos dejan de recibir nutrientes, se necrosan y mueren (Lawrie & Wheeler, 1974). El caso más claro se dio en la especie de *Lupinus angustifolius*, de la que sólo se pudo encontrar una planta con

nódulos (cuatro) que parecían poco efectivos. Los *Lupinus gredensis* aún mantenían un número apreciado de nódulos, aunque en la mayoría de los casos eran nódulos senescentes o poco efectivos.

Análisis del suelo rizosférico

Los resultados obtenidos para las dos muestras de suelo rizosférico analizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.- Características del suelo rizosférico.

<u>Muestras</u>	<u>pH</u>	<u>% Mat.</u> <u>Orgánica</u>	<u>%</u> <u>Nitrógeno</u>	<u>Ca</u> <u>asimilable</u>	<u>Mg</u> <u>asimilable</u>	<u>K</u> <u>asimilable</u>	<u>P</u> <u>asimilable</u>
S1	7.99	0.40	0.055	144	52	59	7.92
S2	7.34	0.20	0.025	42	50	28	8.46

En la tabla se muestran las principales características físico-químicas de las dos muestras de suelo analizadas. Los resultados de Ca, Mg, K y P se expresan en mg/Kg.

Se trata de un suelo de textura muy arenosa, debido al origen antropogénico del mismo, dado que está formado a partir de los materiales de construcción de la carretera y los taludes, fundamentalmente arena y grava. Por esta misma razón el suelo no presenta una zonificación en horizontes bien definidos, como es normal en los suelos naturales.

El pH del suelo es neutro o ligeramente básico (entre 7,3 y 8). Bajo estas condiciones tanto *Bradyrhizobium* (Kuykendal, 2005) como *Micromonospora* (Kawamoto, 1989) pueden desarrollarse de forma más o menos óptima.

Respecto a la proporción de materia orgánica en el suelo, los valores obtenidos son muy bajos (entre 0,2% y 0,4%), dado que se consideran valores normales entre 1,6% y 3,5% (Karma, 1993). Este dato, unido a que el suelo no posee apenas fracción arcillosa, determina que se trate de un sustrato sin apenas complejo arcillo-húmico, dando como resultado una escasa capacidad de intercambio catiónico y de retención de agua, siendo un suelo poco fértil (Sillanpää, 1982).

El nitrógeno es el elemento mineral más demandado por las plantas, considerándose adecuados para la fertilidad del suelo valores por encima de 0,1% (Pardo-García *et al.*, 2000). La cantidad de nitrógeno presente en el suelo es baja (entre 0,025% y 0,055%). Este es un dato de especial importancia, ya que una escasa disponibilidad de nitrógeno determina una gran dependencia de la fijación biológica de este elemento para la supervivencia de las plantas. Además, algunos autores han descrito un efecto inhibitorio de la nodulación en las leguminosas en condiciones de altas concentraciones de nitrógeno (fundamentalmente nitratos) en el suelo (Rawsthorne *et al.*, 1985; Wall *et al.*, 2000). Se trata por lo tanto de un suelo propenso a mantener una mayor actividad de la simbiosis rhizobia-leguminosa.

Los otros cuatro macronutrientes estudiados fueron el calcio, el magnesio, el potasio y el fósforo, siendo estos dos últimos los más importantes para el desarrollo vegetal. Las dos muestras de suelo analizadas presentaron valores de en torno a 8 mg/Kg de fósforo y entre 30 y 60 mg/Kg de potasio. Ambas cantidades están por debajo de lo que se considera como valores aceptables para la fertilidad del suelo, estando catalogados dentro de suelos con baja disponibilidad de fósforo (entre 0 y 25 mg/Kg) y de potasio (entre 0 y 60 mg/Kg). La cantidad de calcio en el suelo también es baja, dado que se consideran valores normales entre 460 y 2000 mg/Kg. La cantidad de magnesio en las muestras (alrededor de 50 mg/Kg) esta dentro de los valores normales en el suelo.

De todos estos datos se deduce que el suelo del que se recogieron las plantas de *Lupinus* es muy poco fértil, tendente a la aridez y con muy baja disponibilidad de nutrientes. Aunque se trata de un suelo con malas condiciones para el desarrollo vegetal, los lupinos crecen en él como plantas pioneras, dada su gran capacidad para colonizar terrenos degradados y de crecer en suelos pobres, con baja disponibilidad de nitrógeno (por su simbiosis con los rhizobia) y en fósforo (por su capacidad para desarrollar raíces proteoides o “cluster roots”, especializadas en la captación de este elemento mineral), y su gran resistencia a la aridez (Jambrina, 1996; Neumann *et al.*, 2000; Neumann & Martinoia, 2002; de Felipe, 2007).

Aislamiento de las bacterias presentes en los nódulos

Los aislamientos bacterianos se realizaron a partir de 42 nódulos efectivos provenientes de un total de 17 plantas (12 ejemplares de *L. angustifolius* y 5 de *L. gredensis*).

En aproximadamente una semana aparecieron colonias de tipo rhizobia, caracterizadas por tener una morfología circular-convexa, de color blanquecino (que cambiaba a tonos marrones con el paso del tiempo) y de textura mucosa, que fueron tentativamente identificadas en base a estas características como pertenecientes al género *Bradyrhizobium*. Se seleccionó al menos una colonia como representante de cada planta, salvo en los casos en los que aparecieron colonias de aspecto diferente para la misma planta, para las cuales se tomaron varios representantes. De este modo se aislaron un total de 21 cepas, que fueron nombradas con el código CAR, para las aisladas de *L. angustifolius*, y CGR, para las que se obtuvieron de *L. gredensis*.

A partir de 10 días desde la realización de los aislamientos comenzaron a aparecer colonias que presentaban una morfología de tipo actinomiceto, la mayoría de ellas de color anaranjado, bordes irregulares y textura rugosa, con micelio que penetraba en el agar. Las características concordaban con las que suelen presentar bacterias del género *Micromonospora*. Se seleccionaron todas las colonias que aparecieron en las placas. Finalmente se obtuvieron 95 cepas, nombradas con el código MIA y MIG, de acuerdo a la procedencia de los nódulos, de *L. angustifolius* y de *L. gredensis* respectivamente.

Además de cepas de tipo *Bradyrhizobium* y *Micromonospora*, en las placas de aislamiento aparecieron de forma muy infrecuente otras bacterias, como *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus* o *Paenibacillus*, que fueron identificadas según criterios morfológicos y por la secuenciación de un pequeño fragmento del gen ARNr 16S. Por su carácter esporádico y por apenas poseer uno o dos representantes de cada género, se decidió dejarlos fuera del estudio posterior, que se centró en las dos poblaciones principales, realmente abundantes y cuya aparición era sistemática en las placas de aislamiento.

Uno de los mayores problemas al aislar microorganismos capaces de desarrollar formas de resistencia (esporas), como *Micromonospora*, es que el proceso de esterilización no

los consiga eliminar completamente. En este caso se empleó como agente esterilizante el cloruro de mercurio, que actúa inactivando las proteínas al reaccionar con los grupos sulfuro, y es ampliamente utilizado para la esterilización de tejidos vegetales (Vincent, 1970; Cosson & Pantaloni, 1977). Los nódulos radicales, al igual que otras partes de la raíz, están en continuo contacto con una gran variedad de microorganismos que habitan en la rizosfera, por lo que una incorrecta esterilización debería dar lugar al crecimiento de una elevada diversidad de hongos y bacterias en las placas de aislamiento. De hecho, esto mismo se comprobó con los nódulos que no habían sido sumergidos en cloruro de mercurio y habían sido colocados sobre placas Petri con medio de cultivo YMA, en las que a los pocos días proliferaron microorganismos alrededor de los nódulos. Sin embargo, en torno a los nódulos control que sí habían sido sometidos al proceso de esterilización, no creció ningún tipo de microorganismo (Figura 8). Otro hecho que refuerza la validez del proceso de esterilización es que en la mayoría de las placas de cultivo sólo aparecían colonias de tipo *Bradyrhizobium* y *Micromonospora*, y sin embargo no crecían colonias de otro tipo de microorganismos esporulados mucho más frecuentes en el suelo, como hongos o bacterias de los géneros *Streptomyces* y *Bacillus* (Figura 9).

Figura 8.- Nódulos control

En la parte superior de la imagen se muestra un nódulo sometido al proceso de esterilización en superficie y colocado sobre medio YMA, sin que haya crecido ningún microorganismo a su alrededor. En la parte inferior se muestra un nódulo en las mismas condiciones, pero sin haber sido esterilizado, por lo que han proliferado numerosos microorganismos en torno a él.

Figura 9.- Placas de aislamiento

Dos placas de aislamiento de nódulos de *Lupinus angustifolius*, en medio YMA (imagen superior) y en Ácido Húmico (imagen inferior). En ambos casos se indican las colonias de tipo *Micromonospora* (flechas naranjas) y de tipo *Bradyrhizobium* (flechas azules).

Tabla 4.- Cepas de tipo *Bradyrhizobium* aisladas de nódulos de *L. angustifolius* y *L. gredensis*

Cepa	Código Planta/Nódulo	Medio de Aislamiento	Planta de Aislamiento
CAR 02	P19 / N1	HA	<i>Lupinus angustifolius</i>
CAR 03	P19 / N3	HA	
CAR 04	P5 / N2	HA	
CAR 05	P5 / N3	HA	
CAR 06	P10 / N0	HA	
CAR 08	P18 / N3	HA	
CAR 09	P6 / N2	HA	
CAR 10	P6 / N3	HA	
CAR 11	P19 / N2	HA	
CAR 12	P10 / N2	HA	
CAR 13	P2 / N1	HA	
CAR 15	P17 / N3	HA	
CAR 16	P13 / N2	HA	
CAR 17	P13 / N3	HA	
CAR 22	P13 / N1	HA	
CAR 23	P20 / N1	HA	
CGR 09	P16 / N2	HA	<i>Lupinus gredensis</i>
CGR 10	P16 / N2	HA	
CGR 11	P16 / N1	HA	
CGR 12	P1 / N2	HA	
CGR 13	P1 / N3	HA	

Tabla 5.- Cepas de tipo *Micromonospora* aisladas de nódulos de *L. gredensis*

Cepa	Código Planta/Nódulo	Medio de Aislamiento	Planta de Aislamiento
MIG 01	P1 / N3	HA	<i>Lupinus gredensis</i>
MIG 02	P8 / N0	HA	
MIG 03	P16 / N3	HA	
MIG 04	P16 / N3	HA	
MIG 05	P16 / N3	HA	
MIG 06	P8 / N1	HA	
MIG 07	P1 / N3	HA	
MIG 08	P1 / N3	HA	
MIG 09	P8 / N1	YMA	
MIG 10	P1 / N2	YMA	
MIG 11	P1 / N2	YMA	
MIG 12	P8 / N1	HA	
MIG 13	P16 / N1	HA	
MIG 14	P16 / N2	HA	
MIG 15	P16 / N2	HA	
MIG 16	P1 / N3	HA	
MIG 17	P1 / N3	HA	
MIG 18	P16 / N2	HA	
MIG 19	P8 / N1	HA	
MIG 20	P8 / N1	HA	
MIG 21	P1 / N2	HA	

Tabla 6.- Cepas de tipo *Micromonospora* aisladas de nódulos de *L. angustifolius*

Cepa	Código Planta/Nódulo	Medio de Aislamiento	Planta de Aislamiento
MIA 01	P2 / N3	HA	<i>Lupinus angustifolius</i>
MIA 02	P19 / N1	HA	
MIA 03	P2 / N1	HA	
MIA 04	P2 / N1	HA	
MIA 05	P19 / N1	HA	
MIA 06	P19 / N1	HA	
MIA 07	P10 / N0	HA	
MIA 08	P2 / N1	HA	
MIA 09	P19 / N1	HA	
MIA 10	P13 / N3	HA	
MIA 11	P19 / N1	HA	
MIA 12	P19 / N0	HA	
MIA 13	P19 / N1	HA	
MIA 14	P19 / N0	HA	
MIA 15	P10 / N4	HA	
MIA 16	P19 / N0	HA	
MIA 17	P19 / N0	HA	
MIA 18	P19 / N1	HA	
MIA 19	P19 / N1	HA	
MIA 20	P19 / N1	HA	
MIA 21	P19 / N1	HA	
MIA 22	P2 / N1	HA	
MIA 23	P2 / N3	HA	
MIA 24	P2 / N3	HA	
MIA 25	P2 / N1	HA	
MIA 26	P2 / N1	HA	
MIA 27	P19 / N2	HA	
MIA 28	P19 / N3	HA	
MIA 29	P19 / N1	HA	
MIA 30	P19 / N1	HA	
MIA 31	P19 / N1	HA	
MIA 32	P19 / N1	HA	
MIA 33	P18 / N1	HA	
MIA 34	P19 / N1	HA	
MIA 35	P13 / N3	HA	
MIA 36	P13 / N1	HA	
MIA 37	P19 / N1	HA	
MIA 38	P2 / N1	HA	
MIA 39	P2 / N1	HA	
MIA 40	P19 / N1	HA	
MIA 41	P13 / N3	HA	
MIA 42	P10 / N1	HA	
MIA 43	P10 / N3	HA	
MIA 44	P18 / N2	HA	
MIA 45	P18 / N1	HA	
MIA 46	P2 / N1	HA	

Continúa...

Cepa	Código Planta/Nódulo	Medio de Aislamiento	Planta de Aislamiento
MIA 47	P13 / N3	HA	<i>Lupinus angustifolius</i>
MIA 48	P19 / N1	HA	
MIA 49	P19 / N1	HA	
MIA 50	P2 / N1	HA	
MIA 51	P18 / N1	HA	
MIA 52	P10 / N2	HA	
MIA 53	P19 / N1	HA	
MIA 54	P19 / N1	HA	
MIA 55	P2 / N1	HA	
MIA 56	P2 / N3	HA	
MIA 57	P19 / N1	HA	
MIA 58	P2 / N1	HA	
MIA 59	P19 / N1	HA	
MIA 60	P20 / N0	YMA	
MIA 61	P19 / N1	HA	
MIA 62	P2 / N1	HA	
MIA 63	P19 / N1	HA	
MIA 64	P19 / N2	HA	
MIA 65	P2 / N1	HA	
MIA 66	P19 / N1	HA	
MIA 67	P19 / N1	HA	
MIA 68	P2 / N3	HA	
MIA 69	P18 / N2	HA	
MIA 70	P19 / N1	HA	
MIA 71	P2 / N3	HA	
MIA 72	P19 / N1	HA	
MIA 73	P2 / N3	HA	
MIA 74	P2 / N1	HA	

Con la finalidad de realizar estudios comparativos entre la diversidad encontrada en los nódulos de *Lupinus angustifolius*, frente a la encontrada en nódulos de *Lupinus gredensis*, así como para establecer comparaciones dentro de la misma especie, e incluso de distintos nódulos de una misma planta, el origen de todos los aislados fue anotado (Tablas 4, 5 y 6). De esta forma fue posible conocer no sólo la especie de lupino de la que se aislaron, sino también de qué individuo de los muestreados y de qué nódulo en concreto. Cada cepa va acompañada de un código formado por dos identificadores, de modo que el primer código identifica a la planta de la que fue aislada (p. ej. P10) y el segundo al nódulo de esa planta (p. ej. N1).

El análisis de los resultados obtenidos en los aislamientos de cepas de tipo actinomiceto, presumiblemente pertenecientes al género *Micromonospora*, muestra una distribución

desigual, tanto en nódulos de *Lupinus angustifolius* como en nódulos de *Lupinus gredensis* (Figuras 10 y 11). Por un lado, existen nódulos de los que se han aislado numerosas cepas de este tipo, como es el caso del P1/N3 y del P8/N1 de *Lupinus gredensis* (con 5 y 6 aislados respectivamente) o los nódulos P2/N1 y P2/N3 de *Lupinus angustifolius* (con 15 y 7 colonias respectivamente). Un caso excepcional en todo el muestreo es el nódulo P19/N1, del que se aislaron un total de 29 cepas de tipo actinomiceto, es decir, más del 31% del total de aislados provenían de un mismo nódulo. Por otro lado, se encontró que en los aislamientos realizados para 20 de los 42 nódulos analizados no apareció ninguna colonia que respondiese a las características propias del género *Micromonospora*, o lo que es lo mismo, tan sólo se pudieron aislar este tipo de bacterias en el 52% de los nódulos muestreados. Los diecisiete nódulos restantes dieron lugar a placas de aislamiento con entre 1 y 4 colonias que encajaban con la morfología buscada.

PLANTA	NÓDULO	Actinomicetos por nódulo	Actinomicetos por planta	Media actinomicetos por nódulo
P1	N1	0		
	N2	3	8	2,7
	N3	5		
P8	N1	6	6	6
	N1	1		
P16	N2	3	7	2,3
	N3	3		
	N1	0		
P22	N2	0	0	0
	N3	0		
	N4	0		
	N1	0		
P25	N1	0	0	0
	N2	0

PLANTA	NÓDULO	Actinomicetos por nódulo	Actinomicetos por planta	Media actinomicetos por nódulo
P2	N1	15	22	7,3
	N2	0		
	N3	7		
P5	N1	0	0	0
	N2	0		
	N3	0		
P6	N1	0	0	0
	N2	0		
	N3	0		
P10	N0	1	5	1
	N1	1		
	N2	1		
	N3	1		
	N4	1		
P13	N1	1	5	1,7
	N2	0		
	N3	4		
P17	N1	0	0	0
	N2	0		
	N3	0		
P18	N1	3	5	1,7
	N2	2		
	N3	0		
P19	N0	4	36	9
	N1	29		
	N2	2		
	N3	1		
P20	N0	1	1	0,5
	N1	0

Figura 10 (página anterior).- Distribución de las cepas aisladas de tipo *Micromonospora* de nódulos de *L. gredensis*.

Figura 11 (sobre estas líneas).- Distribución de las cepas aisladas de tipo *Micromonospora* de nódulos de *L. angustifolius*.

En lo que respecta a la distribución de cepas de tipo *Micromonospora* encontradas en las diferentes plantas, se determinó que de cinco de las catorce plantas muestreadas (en torno al 37%) no se pudo aislar ninguna colonia de este tipo. El porcentaje de plantas en las que no se obtuvieron aislados fue mayor en el caso de *Lupinus gredensis* (2 de los 5 ejemplares, un 40%) que en *Lupinus angustifolius* (3 de las 9 plantas muestreadas, un 33%). Además, es destacable el hecho de que dos ejemplares de *Lupinus angustifolius*, las plantas P2 y P19, aportaron el 61% de los aislados, con 22 y 36 cepas respectivamente.

Los resultados revelan una distribución muy desigual de unas plantas a otras e incluso dentro de los nódulos de una misma planta. Dos nódulos recogidos de una planta de lupino pueden dar lugar a placas de aislamiento muy distintas. Los ejemplos más claros de este hecho son los nódulos N1 y N2 de la planta P2, de los que se aislaron 15 y 0 cepas de *Micromonospora* respectivamente, y los nódulos N1 y N3 de la P19 con 29 y 1 cepas aisladas respectivamente (Figura 12).

Figura 12.- Distribución desigual de *Micromonospora* en los nódulos de las plantas P2 y P19.

El gráfico muestra el número de cepas de tipo *Micromonospora* que se aislaron de cada nódulo muestreado de las plantas P2 (en azul) y P19 (en rojo) de *Lupinus angustifolius*. Obsérvense las grandes variaciones existentes entre distintos nódulos de una misma planta

Estudiando la evolución del número de cepas de tipo *Micromonospora* aisladas a lo largo del tiempo, en los tres muestreos realizados, vemos que en las primeras muestras recogidas, de ejemplares jóvenes de lupinos, las micromonosporas ya se encuentran en el interior de los nódulos. Entre el primer y el segundo muestreo se aprecia una

evolución al alza en el número de cepas de tipo *Micromonospora* aisladas, coincidiendo con una etapa de máximo crecimiento vegetal. Posteriormente, en la etapa de floración, en la que la mayoría de las plantas recogidas no presentaban nódulos o eran senescentes, *Micromonospora* no puede aislarse de su interior. Los datos de esta serie temporal se muestran en la Figura 13.

Figura 13.- Distribución temporal de *Micromonospora* en los nódulos de *Lupinus*.

El gráfico muestra el número de cepas de tipo *Micromonospora* que se aislaron de media por nódulo (en azul) y por planta (en rosa), en cada uno de los tres muestreos realizados.

En base a los datos recogidos, se puede concluir que la presencia de *Micromonospora* en los nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus* es inequívoca, pudiendo ser aisladas cepas de este tipo desde los primeros estadios de desarrollo de las plantas. Sin embargo, la abundancia de *Micromonospora* en estos orgánulos es muy variable, tanto entre distintas plantas como entre nódulos de una misma planta, siendo mayor en plantas de *L. angustifolius* que de *L. gredensis*. Además, la mayor parte de las cepas aisladas provienen de unos pocos nódulos, en los que se concentran grandes poblaciones de *Micromonospora*, mientras que en la mayoría de los nódulos estudiados su presencia es más bien escasa.

Estudio de la diversidad bacteriana mediante DGGE

La aproximación independiente de cultivo para estudiar la diversidad bacteriana presente en nódulos de lupino se llevó a cabo mediante DGGE. Esta técnica permite la separación de moléculas de ADN de igual peso molecular pero diferente secuencia, en base a los denominados “dominios de desnaturalización”. De esta forma, secuencias de ADN con alto contenido en guanina y citosina serán menos sensibles a la acción desnaturalizante de una combinación de urea y formamida.

En este caso, el ADN metagenómico obtenido a partir de nódulos individuales de lupino se empleó para amplificar un fragmento del gen ribosómico 16S (ver Materiales y Métodos). Este gen es el más indicado para estudios independientes de cultivo, dado que permite una rápida y fácil identificación de las especies bacterianas encontradas a través de las secuencias correspondientes depositadas en las bases de datos.

Inicialmente, la selección de los oligonucleótidos empleados en la amplificación del gen ARNr 16S se realizó a partir de combinaciones previamente descritas en la bibliografía, teniendo en consideración que se tratase de oligonucleótidos universales para el dominio *Bacteria*. El set elegido fue 968F-1401R, dado que había sido ampliamente empleado en este tipo de estudios de ecología microbiana (Heuer & Smalla, 1997).

Las condiciones empleadas para la realización de ensayos de DGGE deben ser evaluadas previamente, determinando cuáles dan lugar a la obtención de los mejores perfiles. En el caso de este trabajo se realizaron diferentes ensayos, alterando las condiciones de PCR, el gradiente de urea y formamida empleado, la concentración de acrilamida, las condiciones de electroforesis y diferentes métodos de tinción de ADN. Los mejores resultados se obtuvieron para las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos.

Una vez establecidos los parámetros anteriores, se realizaron los ensayos de DGGE a partir de ADN de cultivos puros (*Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 y varias cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos) y del ADN metagenómico extraído de varios nódulos de *Lupinus angustifolius*, dado que de esta planta se aislaron muchas más cepas

de *Micromonospora* que de *L. gredensis*. Los perfiles obtenidos eran muy sencillos, con dos claras bandas o grupos de bandas, que fueron secuenciadas e identificadas como *Bradyrhizobium canariense*, en el caso de las bandas situadas en la parte superior del gel, y como plastos vegetales, en el caso de las inferiores (Figura 14).

Figura 14.- Ensayo de DGGE con oligonucleótidos 968F-GC y 1401R.

Marcador VI (líneas 1 y 7). Cultivo puro de *Bradyrhizobium canariense* ISLU65 (línea 2), *Micromonospora* sp. MIG 18 (línea 3), *Micromonospora* sp. MIA 15 (línea 12) y *Micromonospora* sp. MIA 17 (línea 4). Diferentes nódulos de *Lupinus angustifolius* (líneas 5, 6, 8, 9, 10 y 11).

Por el análisis de los resultados obtenidos se pudo comprobar que, empleando los oligonucleótidos 968F-1401R, el fragmento de ADN correspondiente al gen ribosómico 16S de *Micromonospora* quedaba prácticamente solapado por el mismo fragmento correspondiente a los plastos vegetales. Por este motivo se realizó una nueva selección de oligonucleótidos, siguiendo los mismos criterios expuestos anteriormente. En base a

ello se eligió el set 341F-907R (Muyzer *et al.*, 1993). Siguiendo la misma metodología, se llevaron a cabo diferentes ensayos de DGGE, tanto con ADN de cultivos puros como con el ADN metagenómico de nódulos. Esta combinación generaba una separación de bandas mucho mejor, pareciendo ser más adecuada en este sentido. Sin embargo, con los oligonucleótidos 341F-907R, existía una mayor tendencia a la aparición de bandas dobles o incluso triples (especialmente en el caso de *Bradyrhizobium*), dificultando la interpretación de los resultados. La aparición de dos o incluso más bandas en los perfiles de DGGE correspondientes a cultivos puros es uno de los problemas que han sido descritos para esta técnica (Nubel *et al.*, 1996; Heuer & Smalla, 1997). A pesar de los cambios introducidos, no fue posible detectar la presencia de *Micromonospora* a partir del ADN extraído de nódulos de lupino (Figura 15).

Figura 15.- Ensayo de DGGE, comparativa entre oligonucleótidos 968F-1401R y 341F-907R. Marcador VI (líneas 1 y 12). Cultivo puro de *Bradyrhizobium canariense* ISLU65 (líneas 2 y 13). *Micromonospora* sp. MIA 17 (líneas 3 y 14). Mezcla de ADN de nódulo y *Micromonospora* sp. MIA 17 (líneas 5 y 15). Diferentes nódulos de *Lupinus angustifolius* (líneas 4, 6-11, 15 y 17-21).

En ningún caso apreciaron bandas que pudieran corresponder al gen ARNr 16S de *Micromonospora*, cuando lo esperable por los resultados de los aislamientos era que, al

menos, se pudiese detectar la presencia de *Bradyrhizobium* y *Micromonospora* en los nódulos mediante DGGE.

A raíz de estos resultados se decidió introducir modificaciones en la extracción de ADN de nódulos respecto a la descrita por Ramírez (1999), añadiendo tratamientos enzimáticos del tejido vegetal con proteinasa K y lisozima, tratando de mejorar la lisis de células bacterianas Gram positivas, desde el planteamiento de que ese podría ser el problema de la no detección del ADN de *Micromonospora*. Los perfiles de los nódulos con la extracción modificada presentaron el mismo patrón que con la anterior extracción, apareciendo sólo las bandas correspondientes a *Bradyrhizobium* y a los plastos que contienen las células vegetales de la raíz.

Diferentes estudios muestran que empleando la técnica de DGGE para obtener perfiles de comunidades microbianas, existe un umbral de detección por debajo del cual un microorganismo no puede ser detectado por DGGE, y sitúan este umbral en torno al 1% del total de ADN analizado (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1996). Esto significaría que si se obtiene el ADN metagenómico de un nódulo, y en él la fracción correspondiente a *Micromonospora* está por debajo del 1%, no sería posible su detección mediante esta técnica. Ésta podría ser una de las causas que explicarían la ausencia de *Micromonospora* en los perfiles obtenidos. Si además se tienen en cuenta los datos resultantes del análisis de la presencia de *Micromonospora* en nódulos a través de técnicas dependientes de cultivo, se aprecia que la cantidad de colonias obtenidas de *Micromonospora* de la mayoría de los nódulos de *Lupinus* muestreados es bastante baja, no habiendo podido aislarse ninguna cepa de casi el 50% de los nódulos analizados. Todo ello reflejaría que, aunque *Micromonospora* esté presente en nódulos de leguminosas, solo en unos pocos tiene una presencia significativamente abundante, por lo que sería necesario analizar bastantes decenas de nódulos para poder obtener uno a partir de cuyo ADN se pudiese obtener un perfil de DGGE que incluyese una banda perteneciente a *Micromonospora*.

Por otro lado, la amplificación del gen ARNr 16S de los plastos, que se obtenía sistemáticamente, ha supuesto un grave inconveniente para obtener buenos resultados con el DGGE. Esto es debido a que, al trabajar con tejidos vegetales, la cantidad de plastos presentes en las muestras es muy grande y, al realizar extracciones de ADN a

partir de ellas, irremediablemente se obtiene una gran proporción de ADN de plastos vegetales. Este problema fue resuelto por Chelius *et al.* (2001) mediante el diseño de oligonucleótidos más específicos, que evitasen la amplificación del ARNr 16S de los plastos presentes en tejidos vegetales de plantas de *Zea mays*. Esta misma estrategia fue seguida por Sun *et al.* (2008) al estudiar la diversidad bacteriana presente en el interior de tejidos radicales de *Oryza sativa*. Sin embargo este tipo de aproximaciones conllevan, irremediablemente, una pérdida de biodiversidad, puesto que los oligonucleótidos no son totalmente universales para el dominio *Bacteria*.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el aislamiento de bacterias de tipo *Micromonospora* en el interior de nódulos, se puede afirmar que, como se ha demostrado en otros trabajos (Cerdeña, 2008; Rodríguez, 2008; Carro, 2009), la presencia de estos microorganismos en los nódulos es inequívoca. El papel que las micromonósporas desempeñan en estas estructuras es aún desconocida, esencialmente porque el descubrimiento de la relación leguminosa-*Micromonospora* es muy reciente y se encuentra en una fase inicial de su estudio. Con los datos recogidos hasta la fecha, se ha descrito la presencia de estas bacterias en varias especies de leguminosas, tanto en zonas de cultivo (*Lens culinarium*, *Cicer arietinum*, *Arachis hypogaea*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, etc.), como silvestres (*Vicia* sp., *Ornithopus* sp., *Lupinus angustifolius*, *Lupinus gredensis*, etc.) (Trujillo *et al.*, 2007a). También se han descrito cepas aisladas de *Micromonospora* en el interior de nódulos de plantas actinorrícicas, en concreto de *Casuarina equisetifolia* (Niner *et al.*, 1996; Valdés *et al.*, 2005) y de *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006). La distribución de las zonas en las que se ha detectado la presencia de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno es muy amplia, y abarca España, Ecuador, Nicaragua y México. Todos estos datos van en la misma dirección, en lo que se podría definir como un redescubrimiento de los nódulos radicales, dado que la concepción clásica de estas estructuras tendía a limitar la relación establecida en los nódulos a leguminosa-rhizobia y planta actinorriza-*Frankia*.

La distribución de *Micromonospora* en los nódulos parece ser muy irregular, concentrándose una gran cantidad de células viables en unos pocos nódulos, mientras que casi la mitad de las estructuras nodulares muestreadas no dieron lugar al aislamiento de ninguna colonia que morfológicamente pudiera identificarse como actinomiceto. Por el contrario, las cepas de *Bradyrhizobium*, responsables directas de la nodulación en las plantas de lupinos recogidas, crecían de forma sistemática en todas las placas de aislamiento. Todo ello parece indicar que la funcionalidad de los nódulos como estructuras de fijación de nitrógeno es independiente a la presencia de *Micromonospora* en los mismos, si bien estas bacterias podrían mejorar de algún modo el rendimiento de la simbiosis. De hecho, anteriores estudios han demostrado un efecto promotor de la nodulación y un incremento del desarrollo foliar al realizar ensayos de coinoculación *Micromonospora-Bradyrhizobium-Lupinus* (Cerdeira, 2008) y *Micromonospora-Frankia-Discaeria* (Solans, 2007).

Dado que este es el primer estudio que trata de describir la distribución real de *Micromonospora* a lo largo de los nódulos radiculares de las leguminosas, no existen trabajos previos sobre los que contrastar los resultados obtenidos. Sería interesante, de cara al futuro, la realización de nuevos muestreos y aislamientos, tanto en lupinos como en otras especies de leguminosas, que aportasen nuevos datos sobre la distribución poblacional de *Micromonospora* en los mismos. Lo que sí parece claro es que, al menos en parte, las células de *Micromonospora* que infectan los nódulos se mantienen viables, ya sea en forma de esporas o de células vegetativas, en una gran parte de los nódulos de plantas de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*.

La aproximación metagenómica para llevar a cabo estudios de diversidad bacteriana en nódulos fijadores de nitrógeno, a través de la técnica de DGGE, muestra numerosos inconvenientes técnicos, especialmente relacionados con la interferencia provocada por el ADN proveniente de los plastos de las células vegetales de los nódulos y la probable escasa abundancia de ADN correspondiente a *Micromonospora* (en comparación con el de *Bradyrhizobium* y plastos vegetales). De este modo, los perfiles de bandas obtenidos mediante DGGE son muy sencillos, y permiten solo la detección de estos dos “organismos” mayoritarios en la muestras. Esto da lugar a una aparente contradicción respecto a los datos recogidos en la bibliografía, y es que, en la aproximación al estudio de diversidad bacteriana en los nódulos, los métodos dependientes de cultivo recogen

una mayor diversidad que los independientes de cultivo. La explicación podría encontrarse en el hecho de que los nódulos fijadores de nitrógeno son una comunidad muy específica y característica y que, en base a los resultados obtenidos, presentan una baja complejidad en que se refiere a la comunidad bacteriana que albergan. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas independientes de cultivo, que resuelvan los problemas planteados con el DGGE, podrían descubrir la presencia de nuevas bacterias que, aún siendo minoritarias, pudiesen encontrarse en este nicho ecológico.

CAPÍTULO III:

Análisis de las Cepas de *Bradyrhizobium* Aisladas de Nódulos de *Lupinus*

EL GÉNERO *Bradyrhizobium*

Situación taxonómica

El género *Bradyrhizobium* pertenece a la familia *Bradyrhizobiaceae* (Figura 16), dentro del orden *Rhizobiales*, y fue descrito por Jordan (1982), proponiendo este nombre en referencia al crecimiento más lento que exhibían estas bacterias respecto a las englobadas en el género *Rhizobium*, reclasificando con ello la especie *Rhizobium japonicum* en *Bradyrhizobium japonicum*.

En la actualidad el género está formado por nueve especies: *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendal *et al.*, 1993), *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu *et al.*, 1995), *Bradyrhizobium yuanmingense* (Yao *et al.*, 2002), *Bradyrhizobium betae* (Rivas *et al.*, 2004), *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa *et al.*, 2005), *Bradyrhizobium iriomotense* (Islam *et al.*, 2008), *Bradyrhizobium jicamae* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2009) y *Bradyrhizobium pachyrhizi* (Ramirez-Bahena *et al.*, 2009), siendo *B. japonicum* la especie tipo.

Se trata de un grupo heterogéneo de bacterias, cuyas relaciones taxonómicas no están completamente definidas, hasta el punto de que la especie tipo del género, *Bradyrhizobium japonicum*, está formada por dos grupos bacterianos lejanamente relacionados (Stanley *et al.*, 1985; Kuykendal *et al.*, 1988).

Dentro de este grupo existe una gran controversia con la especie *Rhizobium lupini*. Schroeter (1886b) propuso el nombre de “*Phytomyxa lupini*” para las bacterias capaces de formar nódulos en *Lupinus luteus* y *Lupinus angustifolius*, siendo una de las primeras especies descritas del grupo que hoy se conoce como rhizobia. Tras varios cambios en la nomenclatura de la especie, finalmente Eckhardt (1931) propuso el nombre actualmente aceptado de *Rhizobium lupini*, describiéndolo como una bacteria de crecimiento lento capaz de formar nódulos en *Lupinus* y similar en sus características a “*Rhizobium japonicum*” (*Bradyrhizobium japonicum*). De esta especie existen dos cepas que fueron originariamente depositadas en la colección de cultivos ATCC por L.

W. Erdman (www.atcc.org), la ATCC 10319^T (= DSM 30140^T) y la ATCC 10318 (= DSM 30134), ambas provenientes de la colección de cultivos de la USDA. Diferentes estudios posteriores apuntan hacia una posible contaminación de los cultivos originales, dado que las cepas actualmente conservadas en la colección americana de cultivos son muy próximas a *Bradyrhizobium japonicum*.

Figura 16.- Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S de la familia *Bradyrhizobiaceae*, empleando el método Neighbor-Joining y el algoritmo de Maximum Composite Likelihood.

Principales características y descripción morfológica

Las especies del género *Bradyrhizobium* son bacterias aerobias Gram negativas que se caracterizan por ser bacilos de entre 0,5-0,9 x 1,2-3,0 µm, no esporulados y móviles por un flagelo polar o subpolar. Forman pequeñas colonias circulares, convexas, generalmente opacas y de color blanco, que con el paso del tiempo tienden a un color marrón claro en función de la composición de los medios de cultivo. La temperatura de

crecimiento óptimo oscila entre 25 y 30°C. La mayoría de las cepas crecen en un rango amplio de pH, pudiendo desarrollarse desde pHs ácidos (incluso unas pocas crecen a pH 3,5) hasta entornos relativamente alcalinos (no tolerando valores por encima de 9). Su tiempo de generación oscila entre 9 y 18 horas, por lo que se consideran bacterias de crecimiento lento dentro del grupo de los rhizobia (Kuykendal, 2005).

La formación de polisacáridos extracelulares es común en *Bradyrhizobium*, especialmente en medios con altas concentraciones de carbohidratos como glicerol, gluconato o manitol (Jain *et al.*, 1990). Las células también tienden a acumular grandes cantidades de poly- β -hidroxibutirato (PHB), una sustancia de reserva que es empleada como fuente de energía en condiciones adversas, como aridez o escasez de nutrientes, y que son fácilmente visibles por microscopía (Mercan *et al.*, 2002; Kuykendal, 2005).

Dentro de los nódulos las bacterias dejan de ser viables, perdiendo parte de sus envolturas celulares, por lo que adquieren formas pleomórficas, generalmente de tipo bacilo, pasando a ser prácticamente un orgánulo más de las células vegetales. Los bacteroides suelen contener inclusiones de polifosfato y acumulaciones de poly- β -hidroxibutirato.

Simbiosis *Bradyrhizobium*-leguminosas

Una de las características más destacadas de las bacterias del género *Bradyrhizobium* es su capacidad para establecer simbiosis con algunas plantas de la familia *Leguminosae*, de forma similar a otros géneros dentro del grupo de los rhizobia.

Tres de las especies del género, *B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense*, fueron aisladas inicialmente de nódulos de *Glycine*. *Bradyrhizobium canariense* es capaz de inducir la nodulación en plantas de la tribu Genisteeae, al igual que algunas cepas de la especie *B. japonicum*. La especie *B. yuanmingense* se asocia con plantas de *Lespedeza*, mientras que *B. jicamae* y *B. pachyrhizi* fueron recientemente aisladas de *Pachyrhizus erosus*. Un caso excepcional es *B. betae*, que carece de los genes simbióticos clásicos

nodD y *nifH*, y que fue aislada de plantas de *Beta vulgaris*, en la que produce deformaciones tumorales.

De todas las interacciones establecidas por las bacterias del género *Bradyrhizobium* con las leguminosas, la más importante es la formada con plantas de soja, fundamentalmente por la importancia económica de este cultivo a nivel mundial.

CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS

Análisis por TP-RAPD

La técnica TP-RAPD se basa en la amplificación de zonas del genoma bacteriano mediante el empleo de dos oligonucleótidos contruidos a partir de zonas conservadas (y por tanto universales) del gen codificante para el ARN ribosómico 16S. Con este método se obtiene un determinado patrón de bandas que, en base a la bibliografía existente, puede llegar a diferenciar cepas a nivel de especie o subespecie, y ha sido ampliamente utilizado en bacterias pertenecientes al grupo de los rhizobia (Rivas *et al.*, 2001b). De esta forma se puede obtener una primera aproximación para estimar la diversidad existente entre las cepas aisladas.

En el caso de este estudio se empleó la técnica de TP-RAPD para obtener perfiles genéticos de todas las cepas de tipo *Bradyrhizobium* que permitieran establecer grupos entre cepas próximas (Figuras 17 y 18). Se utilizaron a modo de control las cepas de *Bradyrhizobium canariense* (BTA-1^T e ISLU65) y de *Bradyrhizobium japonicum* (USDA6^T).

Los perfiles obtenidos (Figuras 17 y 18) muestran una banda común en todas las cepas, de alrededor de 650 pares de bases, y que se corresponde con el fragmento amplificado del gen ARNr 16S. Se trata además del fragmento de ADN amplificado de mayor tamaño en la mayoría de los perfiles. A simple vista se observa un perfil que predomina

sobre los demás y que es claramente diferente del obtenido para las tres cepas control de *Bradyrhizobium*.

El programa Bionumerics se empleó para llevar a cabo el análisis de los perfiles obtenidos, agrupándolos en función de su similitud según el coeficiente de correlación de Pearson y el método UPGMA (Figura 19). El dendrograma generado de este modo permite llevar a cabo una mejor agrupación de las cepas estudiadas (Figura 19). Al incluir en el estudio varios controles, que se repiten en cada uno de los geles (líneas 2, 3 y 4), es posible minimizar las diferencias en los perfiles que se deben únicamente a los cambios originados entre los distintos geles. El porcentaje de similitud seleccionado para establecer la diferenciación de los distintos grupos se obtiene tomando como referencia estas mismas cepas control y corresponde con un 75%. Hay que tener en cuenta que se trata de un valor orientativo, cuya única función es establecer una agrupación de los organismos estudiados, que permitan realizar una estimación de la diversidad bacteriana existente entre los simbioses que nodulan lupinos en la zona de muestreo. De este modo es posible establecer siete grupos diferentes en base a los perfiles de TP-RAPD. Los grupos 1 y 3 están formados por los dos controles empleados de las cepas tipo de *Bradyrhizobium canariense* y *Bradyrhizobium japonicum* respectivamente. El grupo 2 está formado por uno de los perfiles obtenidos para la cepa ISLU 65 de *B. canariense*, dado que la segunda repetición quedó englobada en el grupo 4. El grupo 4 es el más numeroso e incluye, además del perfil de *B. canariense* mencionado, otros diez perfiles correspondientes a las cepas CGR 09, CGR 10, CGR 11, CGR 12, CGR 13, CAR 02, CAR 03, CAR 04, CAR 05 y CAR 06. El grupo 5 es el segundo más grande, englobando un total de nueve de los perfiles analizados, correspondientes a las cepas CAR 09, CAR 11, CAR 12, CAR 13, CAR 15, CAR 16, CAR 17, CAR 22 y CAR 23. Los grupos 6 y 7 tienen una cepa cada uno, CAR 08 y CAR 10 respectivamente.

En el dendrograma las dos repeticiones correspondientes a cada una de las cepas control de *B. canariense* BTA-1^T y de *B. japonicum* USDA6^T aparecen correctamente agrupadas en el primer y tercer grupo. Sin embargo, a pesar de ser repeticiones de la misma cepa, empleando el mismo ADN en la amplificación de TP-RAPD, el Bionumerics los identifica como perfiles muy cercanos pero no idénticos, con porcentajes de similitud del 80% y del 88%. Aún más excepcional es el caso de los

perfiles obtenidos para la cepa control de *B. canariense* ISLU 65, que quedan englobados en dos grupos diferentes (el 2 y el 4). Esto muestra las diferencias que existen entre los dos geles empleados para obtener los perfiles de todas las cepas estudiadas y que, aún manteniéndose las mismas condiciones de PCR, perfiles que deberían ser idénticos de un gel a otro, no lo son. Por lo tanto, los resultados del agrupamiento deben ser tomados con cautela y ser considerados estimaciones iniciales que deben ser confirmadas mediante la secuenciación de marcadores filogenéticos del grupo, como es el caso del espacio intergénico ITS1 para el género *Bradyrhizobium*.

Los dos grupos más grandes, el 4 y el 5, presentan un perfil muy similar y una similitud mínima de alrededor del 70%. Esto parece mostrar una baja diversidad entre la mayoría de las cepas de *Bradyrhizobium* presentes en nódulos de *Lupinus* en Cabrerizos, dado que casi todos los aislados están muy relacionados. Es destacable también el hecho de que en el grupo 4 se entremezclan cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* y de *Lupinus gredensis*, pareciendo indicar que las mismas bacterias son capaces de inducir la nodulación en ambas especies de lupinos. Al igual que sucedía con las cepas control, en la agrupación de las cepas de los grupos 4 y 5 parece existir una importante “componente gel”, que hace que tiendan a agruparse juntos los perfiles provenientes de un mismo gel. Se debe tener en cuenta que el tratamiento de las imágenes obtenidas mediante programas como el Bionumerics, aunque tiene la gran ventaja de aportar análisis objetivos de los perfiles, puede dar lugar a este tipo de problemas al trabajar con patrones provenientes de varios geles. Aunque el software incluye herramientas para mitigar estas diferencias, en muchas ocasiones es imprescindible una inspección ocular de los patrones para analizar los resultados obtenidos. En base a ello se puede considerar que los grupos 4 y 5 son en realidad un mismo grupo más o menos homogéneo.

Los grupos 6 y 7 son los minoritarios, conteniendo cada uno una sola cepa, cuyos perfiles de TP-RAPD aparecen lejanamente relacionados, con una similitud en torno al 58% y claramente diferenciadas del resto de los *Bradyrhizobium* estudiados. En ambos casos se trata de cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*.

Figura 17.- Perfiles de TP-RAPD (1º gel).

Marcador VI (líneas 1, 9 y 17). Cepas control de *B. japonicum* USDA6^T (línea 2) y *B. canariense* BTA-1^T (línea 3) e ISLU65 (línea 4). Cepas de estudio CGR 09 (línea 5), CGR 10 (línea 6), CGR 11 (línea 7), CGR 12 (línea 8), CGR 13 (línea 10), CAR 02 (línea 11), CAR 03 (línea 12), CAR 04 (línea 13), CAR 05 (línea 14), CAR 06 (línea 15) y CAR 08 (línea 16).

Figura 18.- Perfiles de TP-RAPD (2º gel).

Marcador VI (líneas 1, 9 y 16). Cepas control de *B. japonicum* USDA6^T (línea 2) y *B. canariense* BTA-1^T (línea 3) e ISLU65 (línea 4). Cepas de estudio CAR 09 (línea 5), CAR 10 (línea 6), CAR 11 (línea 7), CAR 12 (línea 8), CAR 13 (línea 10), CAR 15 (línea 11), CAR 16 (línea 12), CAR 17 (línea 13), CAR 22 (línea 14) y CAR 23 (línea 15).

Figura 19.- Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de TP-RAPD.

Dendrograma de las cepas de *Bradyrhizobium* analizadas por TP-RAPD utilizando el método UPGMA y el coeficiente de Pearson, mediante el programa Bionumerics.

Situación taxonómica de los aislados de *Bradyrhizobium* en base al ITS1

Las secuencias de ADN que conforman los espacios intergénicos del operón de ARN ribosómico han sido estudiadas en profundidad en los últimos años, dado su alto valor como marcadores filogenéticos. La elevada tasa mutacional de estas regiones hacen que la variabilidad específica sea más alta que la encontrada en los propios genes ribosómicos, conteniendo una gran información filogenética (Whiley *et al.*, 1995; Scheinerta *et al.*, 1996).

La región de ADN que se encuentra entre el gen ARNr 16S y el gen ARNr 23S, también denominada ITS1, ha sido ampliamente utilizada para establecer las diferentes relaciones filogenéticas de las especies del género *Bradyrhizobium* (Willems *et al.*, 2003). Además, se ha comprobado que los valores de similitud en el gen ARNr 16S a lo largo del género son bastante altos, manteniéndose una elevada tasa de conservación, lo cual complica los análisis realizados en base a dicho gen (Willems, 2006). Un claro ejemplo de ello es la especie, recientemente descrita, *Bradyrhizobium pachyrhizi*, que aún teniendo un 99,8% de similitud en el gen ARNr 16S con *Bradyrhizobium elkanii*, se demostró que era una nueva especie (Ramirez-Bahena *et al.*, 2009). Por esta razón, el ITS1 fue el marcador genético seleccionado para conocer la situación filogenética de los aislados de tipo *Bradyrhizobium*. Se seleccionaron un total de siete cepas en base a los análisis obtenidos de los perfiles de TP-RAPD, dos de las bacterias aisladas de *Lupinus gredensis* (CGR 11 y CGR 12) y cinco de las cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* (CAR 02, CAR 03, CAR 08, CAR 09 y CAR 10).

Todas las cepas estudiadas presentan la mayor similitud en el ITS1 con *Bradyrhizobium canariense*, con un valor mínimo de 97,40%, respecto a la cepa CAR 08, y un valor máximo del 99,61%, correspondiente a la cepa CAR 09. *Bradyrhizobium betae* es la siguiente especie más próxima, pero los valores de similitud obtenidos frente a la cepa tipo PL7HG1^T son inferiores al 96%. En base a estudios llevados a cabo por Willems *et al.* (2003), se puede inferir que valores de similitud del espacio intergénico ITS1 por encima del 97%, se corresponden con valores superiores al 70% en ensayos de hibridación ADN-ADN. Por lo tanto, todos los aislados estudiados de tipo

Bradyrhizobium pertenecen efectivamente a este género, y más concretamente a la especie *Bradyrhizobium canariense*, la cual ya se ha descrito previamente como la especie responsable de la simbiosis con plantas del género *Lupinus* en varios puntos de la geografía española, como Canarias o Sevilla (Vinuesa *et al.*, 2005).

Los valores de similitud obtenidos para el espacio intergénico ITS1 entre las cepas estudiadas (Tabla 7) son bastante altos, y se encuentran entre 97,7% y 99,9%, presentando por lo tanto una gran similitud entre ellas.

Tabla 7.- Similitud del espacio intergénico ITS1 entre las cepas de *Bradyrhizobium* analizadas.

	CAR09	CGR11	CAR08	CAR02	CAR10	CAR03	CGR12	ISLU65	BTA1 ^T
CAR09	---	12/747	14/746	13/747	14/747	2/762	15/747	13/747	3/760
CGR11	98.39	---	2/746	4/772	2/747	14/746	4/774	1/747	13/744
CAR08	98.12	99.73	---	1/746	4/746	14/762	5/746	1/746	20/769
CAR02	98.26	99.48	99.87	---	3/747	15/746	6/772	0/747	12/744
CAR10	98.13	99.73	99.46	99.60	---	16/746	1/747	3/747	15/744
CAR03	99.74	98.12	98.16	97.99	97.86	---	17/746	15/746	7/777
CGR12	97.99	99.48	99.33	99.22	99.87	97.72	---	4/747	16/744
ISLU65	98.26	99.87	99.87	100.00	99.60	97.99	99.46	---	12/744
BTA1 ^T	99.61	98.25	97.40	98.39	97.98	99.10	97.85	98.39	---

Los resultados muestran los porcentajes de similitud (diagonal inferior) y las diferencias en nucleótidos (diagonal superior) para todos los cruces posibles entre las cepas estudiadas de *Bradyrhizobium* y las cepas control.

El árbol filogenético construido en base a las secuencias del ITS1 muestra una clara agrupación de las cepas de estudio dentro de la especie *Bradyrhizobium canariense* (Figura 20), como ya se había comprobado a partir de los porcentajes de similitud de las secuencias. También se aprecia claramente la separación de las cepas en dos grupos bien diferenciados. El grupo I es el de mayor tamaño y engloba a cinco de las bacterias estudiadas (CGR 11, CGR 12, CAR 02, CAR 08 y CAR 10), que fueron aisladas de ambas especies de lupino, estando muy próximas a la cepa ISLU 65 de *B. canariense*. El grupo II esta formado por las otras dos cepas analizadas (CAR 03 y CAR 09), ambas aisladas de *Lupinus angustifolius*, y quedan agrupadas junto a la cepa BTA1^T de *B. canariense*.

Figura 20.- Árbol filogenético basado en el espacio intergénico ITS1 de las cepas estudiadas y las cepas tipo del género (junto con la cepa ISLU 65). Obtenido empleando el método Neighbor-Joining y el algoritmo de Maximum Composite Likelihood.

Los resultados obtenidos confirman que existe una baja diversidad entre los aislados, como ya se estimó inicialmente a través de los perfiles de TP-RAPD. Además, no se observan diferencias entre las cepas que nodulan *Lupinus angustifolius* y las que nodulan *Lupinus gredensis*, apareciendo entremezcladas en el grupo I.

Al comparar los grupos resultantes de los análisis de TP-RAPD y los obtenidos de las secuencias del ITS1, se aprecian algunas discrepancias. Las cepas CAR 08 y CAR 10 son las que presentan unos perfiles de TP-RAPD más diferentes, y quedan agrupadas en una rama claramente separada respecto a las otras cepas. Sin embargo, en el análisis de los ITS1, estas dos cepas aparecen englobadas en el grupo I. El caso opuesto es el encontrado para las cepas CAR 03 y CAR 09, que aparecen dentro de los grupos mayoritarios de TP-RAPD (4 y 5 respectivamente) y en el análisis filogenético basado en el ITS1 forman el grupo II, separadas del resto de las cepas.

Ensayos de nodulación en *Lupinus albus* y *Glycine max*

Tradicionalmente, en la taxonomía de los rhizobia, se ha dado gran importancia a las relaciones simbióticas que establecen las diferentes especies del grupo con plantas de la familia *Leguminosae*. Las cepas englobadas dentro de la especie *Bradyrhizobium canariense* son capaces de nodular diferentes leguminosas de las tribus Genisteeae y Loteae, pero no Glycineae (Vinuesa *et al.*, 2005). En este caso, las cepas fueron aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*, englobadas dentro de la tribu Genisteeae. Por esta razón se decidió llevar a cabo estudios de nodulación en plantas de *Lupinus albus*, dado que se trata del lupino que presenta una mejor capacidad de germinación de semillas y de crecimiento en condiciones controladas, empleándose para ello las siete cepas que habían sido anteriormente seleccionadas para la secuenciación del espacio intergénico ITS1. Estas mismas cepas fueron también inoculadas en plantas de *Glycine max* (perteneciente a la tribu Glycineae). En este estudio se incluyeron las cepas *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 y *Rhizobium lupini* DSM 30140^T.

Los resultados muestran que todas las cepas aisladas fueron capaces de inducir la formación de nódulos efectivos en plantas de *Lupinus albus*. Los nódulos presentaban la morfología característica de *Bradyrhizobium canariense* en *Lupinus*, siendo redondeados y localizándose principalmente en la zona de la raíz más próxima al tallo, de forma similar a los encontrados en los controles inoculados con la cepa ISLU 65 (Figura 21a). Las plantas de *Lupinus albus* inoculadas con las cepas *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y *Rhizobium lupini* DSM 30140^T no presentaron ningún tipo de nódulo, al igual que los controles negativos, que no habían sido inoculados con ninguna cepa.

Ninguno de los aislados fue capaz de inducir la nodulación en las plantas de *Glycine max*, como tampoco lo hizo la cepa ISLU 65 de *B. canariense*. Sin embargo, las cepas USDA 110 y DSM 30140^T, indujeron la formación de nódulos efectivos, de morfología redondeada y de color rosado, con aristas casi blancas (Figura 21b). Los controles negativos no presentaron nódulos.

El análisis de los datos obtenidos en los ensayos de inoculación para todas las cepas aisladas muestra unos resultados previsibles. Dado que todos los aislados habían sido obtenidos de nódulos efectivos de lupinos, todos ellos fueron capaces de nodular este tipo de plantas. Además, las cepas capaces de establecer simbiosis con plantas de la tribu Genisteae (*Lupinus*) no lo hacen con plantas de la tribu Glycineae (*Glycine*).

El resultado más sorprendente se encontró para la cepa DSM 30140^T de *Rhizobium lupini*, depositada en la colección alemana de cultivos (DSMZ) como la cepa tipo de la especie *Rhizobium lupini*, bacteria capaz de inducir la nodulación en plantas del género *Lupinus*. Sin embargo, en nuestro estudio esta cepa no ha sido capaz de formar nódulos en este tipo de plantas, y sin embargo sí fue capaz de establecer simbiosis con la soja. Esto plantea un serio interrogante sobre la situación taxonómica de la especie *Rhizobium lupini*, ya que aunque anteriores trabajos la situaban dentro del género *Bradyrhizobium* (Kuykendal *et al.*, 2005), lo más lógico sería pensar que podría nodular plantas de la tribu Genisteae, como lo hacen algunos *B. japonicum* y *B. canariense*. Es necesario un trabajo más profundo para aclarar situación actual de la especie *R. lupini*.

Figura 21.- Nódulos de los ensayos de inoculación.

Imagen de los nódulos formados por *Lupinus albus* en presencia de la cepa *Bradyrhizobium* sp. CAR 08 (a). Imagen de los nódulos formados por *Glycine max* al establecer simbiosis con la cepa *Rhizobium lupini* DSM 30140^T (b).

ANÁLISIS DE LA SITUACIÓN TAXONÓMICA DE *Rhizobium lupini*

A pesar de que la especie *Rhizobium lupini* fue una de las primeras especies descritas del grupo de los rhizobia, se ha ido quedando fuera de las diferentes reclasificaciones y actualmente mantiene la misma posición taxonómica definida por Eckhardt (1931) hace casi 80 años. Dado que, en principio, eran cepas capaces de inducir la nodulación en *Lupinus*, decidimos incluir en el estudio dos de las cepas originales que se encuentran depositadas en la colección alemana de cultivos, nombradas como DSM 30140^T y DSM 30134. Se decidió llevar a cabo una serie de pruebas identificativas para ambas cepas, con el fin de confirmar su posición taxonómica.

La cepa tipo DSM 30140^T es una bacteria Gram negativa, cuyas células son bacilos móviles de pequeño tamaño. En medio YMA presenta un crecimiento lento, con colonias pequeñas, circulares y convexas y una morfología más característica del género *Bradyrhizobium* que del género *Rhizobium*, algo que ya se había descrito con anterioridad en otros trabajos (Jordan, 1984; Kuykendal *et al.*, 2005). La secuenciación del gen ARN ribosómico 16S muestra una similitud del 100% con la cepa tipo de *Bradyrhizobium japonicum*. Todo ello, añadido al hecho de que la cepa DSM 30140^T no induce la nodulación en *Lupinus* y sí en *Glycine*, lleva a pensar que la bacteria originalmente depositada como cepa tipo de *Rhizobium lupini*, dado que establecía simbiosis con plantas de lupino, no es la misma que la que actualmente se encuentra depositada en la colección alemana de cultivos como DSM 30140^T, habiéndose perdido, al menos en esta colección, la cepa original. Y que, además, la cepa DSM 30140^T pertenece a la especie *Bradyrhizobium japonicum* y, dentro de ella, a la biovariedad *glycinearum*.

La cepa DSM 30134 se caracteriza por poseer una morfología irregular, siendo bacilos de tamaño variable. Se trata de una bacteria Gram positiva cuyas colonias, en medio YMA, adquieren una textura rugosa, con los bordes irregulares y de color blanco. Ninguna de estas características encaja con las descritas para las bacterias del grupo de los rhizobia. La secuenciación parcial (de unas 450 pares de bases) del gen ARNr 16S

indica claramente que se trata de una actinobacteria perteneciente al género *Arthrobacter*, presentando una similitud del 99% con la cepa tipo de *Arthrobacter pascens*. En base a estos resultados, se puede establecer que la cepa DSM 30134, depositada en la colección alemana de cultivos como *Rhizobium lupini*, no tiene nada que ver con el grupo de los rhizobia, y se trata en realidad de un *Arthrobacter* sp. Ninguna especie de este género se ha descrito como capaz de inducir la nodulación en leguminosas y probablemente se trate de una contaminación del cultivo original.

Dado que ambas cepas fueron enviadas a la DSMZ a través de la ATCC y que esta colección los recibió directamente de los cultivos originales de la USDA, sería necesario llevar a cabo estudios similares de las cepas equivalentes depositadas en otras colecciones, con el fin de establecer de forma definitiva la situación real de la especie *Rhizobium lupini*, y si aún existe alguna cepa original que pueda ser considerada como cepa tipo de la especie. Dado que en el trabajo de la reclasificación de la especie como *Rhizobium lupini* (Eckhardt *et al.*, 1931) se hacía referencia a que se trataba de un rhizobio de crecimiento lento que compartía características con “*Rhizobium japonicum*” (actual *Bradyrhizobium japonicum*), lo más probable es que, si quedase alguna de las cepas originales, que estableciesen simbiosis con *Lupinus*, debería reclasificarse como *Bradyrhizobium lupini*. En base a las reglas de nomenclatura bacteriana, al ser *Rhizobium lupini* una especie más antigua que las otras dos especies de *Bradyrhizobium* que nodulan lupinos (*B. canariense* y *B. japonicum*), el nombre de *Bradyrhizobium lupini* tendría prioridad sobre cualquiera de los otros dos.

CAPÍTULO IV:

Análisis de las Cepas de *Micromonospora* y Otras Actinobacterias Aisladas de Nódulos de *Lupinus*

EL GÉNERO *Micromonospora*

Situación taxonómica

Micromonospora es un género de actinobacterias perteneciente a la familia *Micromonosporaceae*, dentro del orden *Actinomycetales*. La familia *Micromonosporaceae* está actualmente formada por 26 géneros (Figura 22), siendo los más numerosos *Micromonospora*, *Actinoplanes* y *Catellatospora*.

Figura 22.- Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S de la familia *Micromonosporaceae*, empleando el método Neighbor-Joining.

El nombre de *Micromonospora* hace referencia a la morfología y distribución de las esporas (*Mikros* = pequeño, *mono* = una y *spora* = espora), siendo descrito por primera vez por Ørskov en 1923. La especie tipo del género es *Micromonospora chalcea*, que fue reclasificada de su nombre original, “*Streptothrix chalcea*” (Foulerton, 1905). En las Listas Aprobadas de Nomenclatura de 1980 (Skerman *et al.*, 1980) el género estaba formado por 12 especies. En los últimos años el género *Micromonospora* ha ido adquiriendo mayor importancia y se han descrito un gran número de nuevas especies, hasta un total de 40 que lo forman actualmente (Tabla 8).

Las relaciones filogenéticas entre las especies del género están bien estudiadas, y la descripción de nuevas especies está condicionada al estudio de características fenotípicas, bioquímicas, quimiotaxonómicas y genéticas que las diferencien de las ya descritas. Dentro de los marcadores genéticos, el análisis del gen ARNr 16S es el más estudiado y sobre él se ha basado en gran medida la filogenia del género. En los últimos años, el estudio de otros marcadores genéticos y el análisis multilocus de los mismos ha cobrado gran importancia, siendo el gen *gyrB* el que ha demostrado tener una mayor relevancia taxonómica (Kasai *et al.*, 2000; Carro, 2009).

Principales características y descripción morfológica

Las especies del género *Micromonospora* son bacterias quimioorganotróficas, aerobias, Gram positivas y con un alto contenido en G+C en su genoma. Se caracterizan por poseer crecimiento filamentoso, en forma de hifas de alrededor de 0,5 µm de diámetro, al final de las cuales aparecen esporas únicas (Figuras 23c y d). En medio sólido forman colonias de bordes irregulares y aspecto rugoso, carecen de micelio aéreo y adquieren colores variados, generalmente dentro de la gama naranja y marrón (Figuras 23a y b), aunque existen algunas cepas con colores verdosos (como *M. olivasterospora*) o moradas (como *M. echinospora*). Al envejecer los cultivos, la mayoría de las colonias se oscurecen de forma notable, coincidiendo con la esporulación, hasta adquirir colores negros y marrones muy oscuros, y se vuelven mucosos.

Se trata de bacterias mesófilas, cuyo crecimiento óptimo oscila entre los 20°C y los 40°C, no creciendo por encima de 50°C. Presentan buena tolerancia a pH básico, pero rara vez se desarrollan en medios con pH inferior a 6. Casi todas las cepas del género crecen en medio con 3% (p/v) de cloruro de sodio, aunque rara vez lo hacen por encima del 5% (p/v) (Kawamoto, 1989).

Figura 23.- Principales características del género *Micromonospora*.

Típico crecimiento en medio sólido de las cepas *M. rosaria* DSM 803^T en YE-S (a) y MIG 07 en M65 (b). Microfotografía de las hifas de *M. rosaria* (c) y de una hifa de *M. chalybeata*, apreciándose un septo en la pared celular (Cw) y una espora (Luedemann & Casmer, 1973) (d).

Las esporas formadas por las bacterias del género son relativamente sensibles al calor, presentando una tasa de supervivencia superior al 50% tras 20 minutos a 60°C, que se reduce hasta menos del 0,5% después de ser sometidas durante 20 minutos a 80°C. La

viabilidad de las esporas de *Micromonospora* también se ve seriamente reducida en ambientes con pH ácido. Sin embargo, presentan buena resistencia a sustancias tóxicas, como acetona o formamida, y también son muy resistentes a la desecación. La germinación de las esporas es considerablemente más lenta que en otros actinomicetos, como *Streptomyces* (Kawamoto *et al.*, 1982).

Hábitat y principales fuentes de aislamiento

Las bacterias del género *Micromonospora* aparecen con relativa abundancia en muestras de suelo, aunque lo hacen en proporciones bajas si se compara con otras actinobacterias muy abundantes en el suelo, como *Streptomyces*. Jensen (1932) fue el primero en describir el suelo como uno de los hábitats fundamentales de *Micromonospora*, estudiando diferentes muestras de suelo australiano. Posteriormente, Kriss (1939) corroboró este hecho analizando distintos suelos rusos. También se han encontrado cepas del género en roca arenisca de la Antártica (Hirsch *et al.*, 2004).

El género *Micromonospora* es muy frecuente en entornos acuáticos, como lagos y charcas, lodos y sedimentos de lechos fluviales (Thawai *et al.*, 2004; Trujillo *et al.*, 2005a; Huang *et al.*, 2008), así como en ambientes marinos como arena de playa (Watson & Williams, 1974; Zhao *et al.*, 2004; Tanasupawat *et al.*, 2009) y sedimentos marinos y oceánicos (Weyland, 1969; Solovieva, 1972). Estudios poblacionales han demostrado que *Micromonospora* es muy abundante en este tipo de ambientes acuáticos, en algunos arrozales estudiados, el 14% de los actinomicetos aislados pertenecían a este género (Ishizawa *et al.*, 1969) o en lagos de Wisconsin, en los que entre el 10% y el 50% de las bacterias aisladas de muestras de agua eran *Micromonospora*, y al mismo tiempo fueron los únicos actinomicetos aislados del lecho de los lagos (Colmer & McCoy, 1943).

Más recientemente se han descrito un gran número de cepas de *Micromonospora* asociadas a organismos vegetales, mostrando una estrecha relación de estas bacterias con diferentes grupos de plantas. En este sentido se han aislado micromonósporas de nódulos fijadores de nitrógeno de plantas actinorrizas como *Casuarina equisetifolia*

(Valdés *et al.*, 2005) o *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006) y de nódulos de numerosas leguminosas como *Lupinus angustifolius* (Trujillo *et al.*, 2007b) o *Pisum sativum* (García *et al.*, 2010), entre otras, así como de hojas de *Tulbaghia violacea* (Kirby & Meyers, 2009) y de diversos tejidos vegetales esterilizados en superficie de *Triticum aestivum* (Franco *et al.*, 2007) y de *Oryza sativa* (Tian *et al.*, 2007). Todo lo anterior muestra una estrecha relación entre *Micromonospora* y una gran diversidad de plantas, cuyo interés es creciente y que está siendo objeto de numerosas investigaciones en los últimos años, señalando los tejidos vegetales, especialmente los nódulos fijadores de nitrógeno, como una de las más notables fuentes de aislamientos para las bacterias de este género.

La siguiente tabla muestra todas las especies descritas hasta la fecha del género *Micromonospora*, junto con la fuente de aislamiento de la cepa tipo y su referencia bibliográfica.

Tabla 8.- Especies del género *Micromonospora*.

ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN	AUTOR Y AÑO
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 ^T	suelo	(Sveshnikova <i>et al.</i> , 1969)
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 ^T	suelo	(Thawai <i>et al.</i> , 2004)
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 ^T	suelo	(Luedemann & Brodsky, 1964a)
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	JCM 12873 ^T	suelo	(Jongrungruangchok <i>et al.</i> , 2008a)
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 ^T	aire	(Foulerton, 1905) (Ørskov, 1923)
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 ^T	suelo	(Tomita <i>et al.</i> , 1992)
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	2-19(6) ^T	suelo arenoso	(Ara & Kudo, 2007)
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 ^T	fango de lago	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 ^T	suelo	(Jensen, 1932)
<i>Micromonospora coriariae</i>	NAR 01 ^T	nódulos radicales de <i>Coriaria</i>	(Trujillo <i>et al.</i> , 2006)
<i>Micromonospora coxensis</i>	2-30-b(28) ^T	suelo arenoso	(Ara & Kudo, 2007)
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 ^T	suelo	(Thawai <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 ^T	excremento de chukar	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 ^T	suelo	(Luedemann & Brodsky, 1964a) (Kasai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 ^T	pedra arenisca	(Hirsch <i>et al.</i> , 2004)
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 ^T	charca salina	(Weinstein <i>et al.</i> , 1968)
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819 ^T	suelo forestal	(Kawamoto <i>et al.</i> , 1974)
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM 46123 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora krabiensis</i>	JCM 12869 ^T	suelo	(Jongrungruangchok <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 ^T	nódulos radicales de <i>Lupinus</i>	(Trujillo <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	DSM 44100 ^T	suelo forestal	(Asano <i>et al.</i> , 1989) (Lee <i>et al.</i> , 1999)
<i>Micromonospora marina</i>	JCM 12870 ^T	arena de mar	(Tanasupawat <i>et al.</i> , 2009)
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 ^T	agua	(Trujillo <i>et al.</i> , 2005a)
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	JCM 12833 ^T	fango de pantano	(Thawai <i>et al.</i> , 2007)
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 ^T	charca salina	(Weinstein <i>et al.</i> , 1968) (Kasai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 ^T	arrozal	(Kawamoto <i>et al.</i> , 1983)
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 ^T	suelo	(Luedemann & Brodsky, 1964b) (Kasai <i>et al.</i> , 2000)
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	JCM 12394 ^T	manglar	(Thawai <i>et al.</i> , 2008)
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora pisi</i>	DSM 45175 ^T	nódulos radicales de <i>Pisum</i>	(García <i>et al.</i> , 2010)
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 ^T	suelo	(Waksman & Curtis, 1916) (Luedemann, 1971)
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM 44983 ^T	manglar	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 ^T	suelo	(Horan & Brodsky, 1986)
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 ^T	nódulos radicales de <i>Lupinus</i>	(Trujillo <i>et al.</i> , 2007b)
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 ^T	turba de bosque pantanoso	(Thawai <i>et al.</i> , 2006)
<i>Micromonospora tulbaghiaie</i>	DSM 45142 ^T	hojas de <i>Tulbaghia violacea</i>	(Kirby & Meyers, 2009)
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 ^T	suelo	(Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005)

Importancia del género

Las bacterias del género *Micromonospora* se caracterizan por tener un metabolismo secundario muy activo, a través del cual son capaces de producir una gran variedad de compuestos, muchos de ellos de interés económico.

Se trata de bacterias con gran actividad proteolítica, celulolítica y diastática. Algunas cepas producen pigmentos difusibles de interés industrial, como el pigmento marrón-morado de *M. echinospora* o el pigmento azul-verdoso de *M. coerulea*, que son empleados como indicadores de pH (Kawamoto, 1989).

De entre todos los metabolitos secundarios producidos por *Micromonospora*, los más importantes a nivel económico son los antibióticos, destacando los aminociclitolos, como la gentamicina (obtenida en 1958 de “*Micromonospora purpurea*”) y la sisomicina (obtenida en 1978 de *M. inyonensis*). Otros antibióticos de tipo macrólido (como la mycinamicina o la rosamicina) y de tipo polisacárido (como la evernimicina) también son producidos por estas bacterias. La cepa ATCC 39149, perteneciente a la especie *Micromonospora carbonacea*, produce grandes cantidades de evernimicina, cloramfenicol y una nueva tiostreptona, encontrándose bajo patente desde 1986 y actualmente se está trabajando en la secuenciación de su genoma.

A partir de algunas cepas del género también se han aislado nuevas moléculas con actividad antitumoral, como la calicheamicina, obtenida de *M. echinospora* (Lee *et al.*, 1987), la dinemicina A, aislada de *M. chersina* (Miyoshi-Saitoh *et al.*, 1991), la retimicina, la galtamicina y la saquayamicina, descritas a partir de la cepa *Micromonospora* sp. Tü 6368 (Antal *et al.*, 2005) o la lupinadicina, obtenida de *M. lupini* (Igarashi *et al.*, 2007).

En los últimos años se ha prestado especial atención a las numerosas relaciones establecidas entre *Micromonospora* y diferentes grupos de plantas, y se ha estudiado su posible papel como agentes de control biológico y como promotores del crecimiento vegetal (PGPR). Diferentes autores han descrito el importante potencial de *Micromonospora* como supresor del crecimiento de diferentes tipos de hongos

fitopatógenos de zanahoria (*Daucus carota*) (El-Tarabily, 1997) y trigo (*Triticum aestivum*) (Coombs & Franco, 2003). Recientemente, Conn *et al.* (2008) han descrito que la cepa de *Micromonospora* sp. EN43 es capaz de inhibir el desarrollo de fitopatógenos mediante la activación de genes clave en el sistema de resistencia adquirida (SAR) y en el sistema jasmonato/etileno (JA/ET) de *Arabidopsis thaliana*.

Desde la perspectiva del análisis de *Micromonospora* como PGPR, se ha descrito un efecto promotor del crecimiento y un aumento en la tasa de nodulación en plantas actinorrizas y leguminosas. La cepa *Micromonospora* sp. MM18 produce grandes cantidades de zeatina, ácido indol-acético y ácido giberélico (Solans *et al.*, 2006), y al ser inoculada en cultivos de la planta actinorriza *Discaria trinervis* se observa un efecto promotor del crecimiento, aumentado al ser coinoculada con cultivos de *Frankia*, en los que además se observa un aumento de la nodulación (Solans, 2007). Resultados similares fueron obtenidos por Cerda (2008) al realizar ensayos de inoculación y coinoculación en leguminosas pertenecientes a las especies de *Lupinus albus* y *Phaseolus vulgaris*, con cepas de *Micromonospora*, al igual que se ha descrito este mismo efecto en *Medicago sativa* (Solans *et al.*, 2009). Recientemente, El-Tarabily *et al.* (2008) han descrito una cepa, identificada como *M. endolithica*, capaz de solubilizar altas cantidades de fosfatos, así como de colonizar abundantemente raíces de *Phaseolus vulgaris*.

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AISLADOS

Introducción

Las técnicas de genotipado se basan en la utilización de oligonucleótidos universales que dan lugar a una amplificación de diferentes fragmentos de ADN que, al ser separados por electroforesis, generan un perfil de bandas que actúa como huella genética, permitiendo la diferenciación de distintas bacterias. Este tipo de técnicas son muy útiles en estudios de ecología microbiana ya que posibilitan una rápida estimación

de la diversidad presente entre las cepas aisladas de una determinada comunidad bacteriana, siendo especialmente útiles a la hora de trabajar con un elevado número de cepas. Existen distintas técnicas de genotipado, muchas de las cuales se basan en la molécula del ARNr 16S, dado que se considera que contiene una elevada información filogenética. Otros métodos tratan de buscar secuencias genómicas comunes, que sean capaces de inferir una clara diferenciación entre distintas especies o cepas.

En este trabajo, dado el elevado número de cepas incluidas en el estudio, se decidió realizar este tipo de estudios de genotipado, seleccionando para ello las técnicas de TP-RAPD, BOX-PCR y ARDRA. De este modo se podría estimar la diversidad de las cepas aisladas sin tener que recurrir a la identificación mediante secuenciación de cada una de ellas.

Análisis por BOX-PCR

El BOX-PCR es una técnica de genotipado englobada dentro de los métodos rep-PCR, basados en la amplificación de secuencias de ADN repetidas en los genomas de todas las bacterias. El empleo del oligonucleótido BOXA1R permite la amplificación selectiva de las regiones genómicas localizadas entre las secuencias de BOX. Los múltiples fragmentos de ADN amplificados presentan gran variedad de tamaño, por lo que pueden ser fácilmente separados mediante electroforesis, generándose perfiles genéticos específicos (Versalovic *et al.*, 1994). Se trata de una técnica ampliamente empleada en la caracterización genética de procariotas, habiéndose mostrado muy útil en grupos de actinobacterias como *Streptomyces* (Lanoot *et al.*, 2004), sirviendo incluso como una técnica de diferenciación en la descripción de nuevas especies del género (Bouizgarne *et al.*, 2009).

En este trabajo se empleó la técnica de BOX-PCR para obtener perfiles genéticos de todos los aislados de tipo actinomiceto. Dado que por el elevado número de muestras fue necesario separar los perfiles en tres geles distintos, y con el fin de evaluar la reproducibilidad de la técnica, la cepa MIA 10 fue seleccionada como control, introduciendo su perfil de BOX-PCR en los tres geles de cepas MIA (MIA 10, MIA 10a y MIA 10b).

Los perfiles obtenidos muestran, en general, una gran complejidad y variedad (Figuras 25 a 28). El número de bandas por perfil oscila, en la mayoría de los casos, entre 8 y 16, existiendo algunos por encima de estas cifras, como por ejemplo la MIA 63 con 19 bandas. Tan sólo la cepa MIA 08 presenta un patrón con una única banda. El tamaño de los fragmentos amplificados oscila entre 2,6 y 0,2 Kb.

La elevada variedad de perfiles refleja la alta diversidad existente entre las cepas de tipo actinomiceto aisladas. No se observa ningún fragmento de ADN que se repita en todos o casi todos los perfiles. Del mismo modo, no existe ningún patrón de bandas que aparezca en un número considerable de los aislados, aunque sí se repiten algunos de los perfiles en unas pocas cepas. Entre estos perfiles repetidos, los mayoritarios se observan entre las actinobacterias aisladas de *L. angustifolius* y son los que engloban, por un lado, las cepas MIA 13, MIA 14, MIA 19, MIA 29, MIA 30, MIA 33 y MIA 61 (Figura 24a), y por el otro lado, las cepas MIA 16, MIA 17, MIA 20, MIA 53 y MIA 54 (Figura 24b). Dentro de los aislados procedentes de plantas de *L. gredensis* el único perfil que se repite de forma clara es el que aparece en las cepas MIG 03 y MIG 04 (Figura 24c).

Figura 24.- Perfiles de BOX-PCR repetidos en varias cepas.

En la imagen se muestran tres de los perfiles de BOX-PCR que se repitieron en una mayor cantidad de cepas. En algunos casos son idénticos, mientras que en otros se aprecian ligeras diferencias.

Figura 25.- Perfiles de BOX-PCR de cepas MIA, primer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 02 (línea 3), MIA 03 (línea 4), MIA 04 (línea 5), MIA 05 (línea 6), MIA 06 (línea 7), MIA 07 (línea 8), MIA 08 (línea 9), MIA 09 (línea 10), MIA 10 (línea 11), MIA 11 (línea 12), MIA 12 (línea 13), MIA 13 (línea 15), MIA 14 (línea 16), MIA 15 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 18 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 22 (línea 21), MIA 23 (línea 22), MIA 24 (línea 23), MIA 25 (línea 24) y MIA 26 (línea 25).

Figura 26.- Perfiles de BOX-PCR de cepas MIA, segundo gel.

Marcador XIV (líneas 1, 15 y 28). Cepas MIA 16 (línea 2), MIA 17 (línea 3), MIA 18 (línea 4), MIA 19 (línea 5), MIA 21 (línea 6), MIA 27 (línea 7), MIA 28 (línea 8), MIA 29 (línea 9), MIA 30 (línea 10), MIA 31 (línea 11), MIA 32 (línea 12), MIA 33 (línea 13), MIA 34 (línea 14), MIA 35 (línea 16), MIA 36 (línea 17), MIA 38 (línea 18), MIA 39 (línea 19), MIA 41 (línea 20), MIA 42 (línea 21), MIA 43 (línea 22), MIA 46 (línea 23), MIA 47 (línea 24), MIA 48 (línea 25), MIA 49 (línea 26) y MIA 10b (línea 27).

Figura 27.- Perfiles de BOX-PCR de cepas MIA, tercer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 15 y 28). Cepas MIA 50 (línea 2), MIA 52 (línea 3), MIA 53 (línea 4), MIA 54 (línea 5), MIA 55 (línea 6), MIA 56 (línea 7), MIA 57 (línea 8), MIA 58 (línea 09), MIA 59 (línea 10), MIA 60 (línea 11), MIA 61 (línea 12), MIA 62 (línea 13), MIA 63 (línea 14), MIA 64 (línea 16), MIA 65 (línea 17), MIA 66 (línea 18), MIA 67 (línea 19), MIA 68 (línea 20), MIA 69 (línea 21), MIA 70 (línea 22), MIA 71 (línea 23), MIA 72 (línea 24), MIA 73 (línea 25), MIA 74 (línea 26) y MIA 10c (línea 27).

Figura 28.- Perfiles de BOX-PCR de cepas MIG.

Marcador XIV (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 14), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

El programa Bionumerics se empleó para realizar el análisis detallado de todos los perfiles de BOX-PCR, utilizando los algoritmos matemáticos del coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento UPGMA, para obtener el dendrograma de similitud correspondiente (Figura 29). Tomando como referencia la situación en el dendrograma de las cepas MIA 10 (las tres repeticiones realizadas), se seleccionó como nivel de referencia un porcentaje de similitud del 50%, para llevar a cabo la agrupación de los perfiles de BOX-PCR. De este modo se obtuvieron 20 grupos, de los cuales 16 estaban formados por entre una y tres cepas, mientras que los grupos 11, 14, 15 y 18 fueron los de mayor tamaño, englobando 10, 14, 19 y 16 cepas respectivamente. Dentro del grupo 15 se incluyen los tres perfiles repetidos de la cepa control (MIA 10; MIA 10a y MIA 10b), aunque quedan separadas en dos subgrupos diferentes.

Se aprecia en el análisis que, descontando los grupos formados por una única cepa, la mayoría de los grupos restantes engloban cepas provenientes de las dos plantas estudiadas. En concreto, los grupos 4, 5, 6, 9, 10, 15, 16, 18 y 19 contienen aislados MIA (*L. angustifolius*) y MIG (*L. gredensis*) al mismo tiempo, en ocasiones presentando perfiles prácticamente idénticos, como es el caso de las cepas MIG 08 y MIA 71. Esto parece demostrar que no existe una especificidad a nivel de cepa respecto de la planta de lupino hospedadora.

Como ya se observó a través de las fotografías de BOX-PCR, existe una alta diversidad entre las cepas aisladas en este estudio. Este hecho queda también reflejado en el dendrograma obtenido, en el que se forman un gran número de grupos, algunos de ellos bastante heterogéneos (como los grupos 15 y 18, en los que la diversidad de perfiles englobados es muy alta). Por otro lado, algunos de los grupos son muy compactos, incluyendo patrones prácticamente idénticos, siendo los casos más claros los grupos 11 y 14.

Figura 29.- Dendrograma de similitud para los perfiles de BOX-PCR obtenidos

Análisis por TP-RAPD

La técnica de TP-RAPD se basa en la utilización de dos oligonucleótidos altamente conservados en el gen ARNr 16S (879F y 1522R) para, con una temperatura de anillamiento más baja, obtener perfiles de bandas que permitan una diferenciación de las cepas a nivel de especie. Se espera por lo tanto que diferentes cepas de la misma especie den lugar a un mismo perfil, y cepas de diferentes especies den un perfil distinto (Rivas *et al.*, 2001a).

Al igual que en el caso de los perfiles de BOX-PCR, se obtuvieron perfiles genéticos de TP-RAPD para todos los aislados de tipo actinomiceto. La cepa MIA 10 fue igualmente seleccionada como control, siendo incorporada a los tres geles de cepas MIA.

Los resultados obtenidos muestran una gran diversidad de perfiles (Figuras 30 a 33), mucho mayor que la encontrada en el análisis de las cepas de *Bradyrhizobium* con esta misma técnica. El tamaño de los fragmentos de ADN resultantes de la PCR oscila entre las 1700 y 150 pares de bases, presentando una banda común de unos 650 nucleótidos, correspondiente al fragmento del ARNr 16S. La complejidad de los perfiles es variable, existiendo algunos con hasta 12 bandas (cepa MIA 57) y otros con una sola banda (cepa MIA 21). En general, los perfiles presentan una menor variabilidad que en el caso de los obtenidos con la técnica de BOX-PCR, en parte debido a que el fragmento de ADN presente en mayor cantidad se corresponde precisamente a la banda común en todos los carriles, proveniente del gen ARNr 16S. Además de este fragmento, la gran mayoría de los perfiles presentan otras bandas en común, como por ejemplo los dos fragmentos de mayor tamaño, de unos 1700 y 1300 nucleótidos, que están presentes en 53 de las 69 cepas aisladas de *Lupinus angustifolius* y en 14 de las 21 cepas aisladas de *L. gredensis*. Estos dos fragmentos se observan por lo tanto en el 74% de las bacterias. Sin embargo, parece que los fragmentos de menor tamaño son los que introducen una mayor variabilidad, estando menos conservados de unas cepas a otras.

Figura 30.- Perfiles de TP-RAPD de cepas MIA, primer gel.

Marcador VI (líneas 1, 15 y 27). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 03 (línea 3), MIA 04 (línea 4), MIA 05 (línea 5), MIA 06 (línea 6), MIA 07 (línea 7), MIA 08 (línea 8), MIA 09 (línea 9), MIA 10 (línea 10), MIA 11 (línea 11), MIA 12 (línea 12), MIA 13 (línea 13), MIA 14 (línea 14), MIA 15 (línea 16), MIA 16 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 19 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 22 (línea 21), MIA 23 (línea 22), MIA 24 (línea 23), MIA 25 (línea 24), MIA 26 (línea 25) y MIA 27 (línea 26).

Figura 31.- Perfiles de TP-RAPD de cepas MIA, segundo gel.

Marcador VI (líneas 1, 15 y 27). Cepas MIA 28 (línea 2), MIA 29 (línea 3), MIA 30 (línea 4), MIA 31 (línea 5), MIA 32 (línea 6), MIA 33 (línea 7), MIA 34 (línea 8), MIA 35 (línea 9), MIA 36 (línea 10), MIA 38 (línea 11), MIA 39 (línea 12), MIA 41 (línea 13), MIA 42 (línea 14), MIA 43 (línea 16), MIA 46 (línea 17), MIA 47 (línea 18), MIA 48 (línea 19), MIA 49 (línea 20), MIA 50 (línea 21), MIA 52 (línea 22), MIA 53 (línea 23), MIA 54 (línea 24), MIA 55 (línea 25) y MIA 10b (línea 26).

Figura 32.- Perfiles de TP-RAPD de cepas MIA, tercer gel.

Marcador VI (líneas 1, 14 y 24). Cepas MIA 56 (línea 2), MIA 57 (línea 3), MIA 58 (línea 4), MIA 59 (línea 5), MIA 60 (línea 6), MIA 61 (línea 7), MIA 62 (línea 8), MIA 63 (línea 09), MIA 64 (línea 10), MIA 65 (línea 11), MIA 66 (línea 12), MIA 67 (línea 13), MIA 68 (línea 15), MIA 69 (línea 16), MIA 70 (línea 17), MIA 71 (línea 18), MIA 72 (línea 19), MIA 73 (línea 20), MIA 74 (línea 21), MIA 10c (línea 22) y MIA 21 (línea 23).

Figura 33.- Perfiles de TP-RAPD de cepas MIG.

Marcador VI (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 13), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

A pesar de la gran variedad de perfiles genéticos obtenidos, que dan idea de la elevada biodiversidad presente en los nódulos de lupino, algunas cepas presentan perfiles prácticamente idénticos. En este sentido, existen dos perfiles mayoritarios, el primero de ellos agrupa a las cepas MIA 05, MIA 06, MIA 10, MIA 24, MIA 35 y MIA 47 (Figura 34a), y el segundo engloba a las cepas MIA 09, MIA 13, MIA 14, MIA 29, MIA 30, MIA 61 y MIA 70 (Figura 34b). Las cepas MIG 03 y MIG 04 presentan un perfil de bandas idéntico, y claramente diferente de los demás (Figura 34c).

Figura 34.- Perfiles de TP-RAPD repetidos en varias cepas.

En la imagen se muestran tres de los perfiles de TP-RAPD que se repitieron en una mayor cantidad de cepas. En algunos casos son idénticos, mientras que en otros se aprecian ligeras diferencias.

Es destacable el hecho de que las bacterias aisladas de *L. angustifolius* aparentemente presentan perfiles distintos a las aisladas de *L. gredensis*, reflejando una cierta dependencia respecto de la planta hospedadora.

El programa Bionumerics se empleó para realizar un análisis más objetivo de los perfiles de TP-RAPD obtenidos, generándose un dendrograma de similitud en base al coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupación UPGMA (Figura 35).

Al igual que en el análisis realizado en el caso de la técnica de BOX-PCR, se tomó como referencia la cepa MIA 10, para la cual se obtuvieron tres perfiles distintos que, al corresponder a la misma cepa, un análisis correcto de los mismos debería unirlos en el mismo grupo. En base a ello se estableció un nivel de similitud del 85%, a partir del cual se obtuvieron veinte grupos. La mayoría de los grupos obtenidos (12 de los 20) estaban formados por una sola cepa. De los 8 restantes, solo tres de ellos englobaban más de 3 cepas, en el caso de los grupos 8 y 11, estaban formados por 13 cepas, siendo el grupo 1 el de mayor tamaño con 41 perfiles (entre ellos los tres correspondientes a la cepa MIA 10).

En este caso, al contrario de lo que se observó en el dendrograma de BOX-PCR, la mayoría de los grupos están formados por cepas aisladas de una de las dos plantas de lupinos estudiadas, estando mezcladas cepas de ambas plantas sólo en el grupo 1. Se aprecia por lo tanto una cierta especificidad respecto de la planta hospedadora en base a los perfiles de TP-RAPD.

En cuanto a la diversidad recogida en el análisis de los perfiles de TP-RAPD se observa que es menor que la encontrada para BOX-PCR, dado que los perfiles son generalmente mucho más similares entre ellos, lo cual queda reflejado en el porcentaje de similitud establecido para la diferenciación de los grupos, mucho más alto en el caso de la técnica TP-RAPD.

Figura 35.- Dendrograma de similitud para los perfiles de TP-RAPD obtenidos

Análisis por ARDRA

El estudio de la diversidad a través de los perfiles de ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”) es una de las técnicas de genotipado más extendidas en ecología microbiana. Se basa en el empleo de diversas enzimas de restricción que digieren el gen ARNr 16S previamente amplificado, generándose fragmentos de diferentes tamaños en función de las diferencias en las secuencias del gen.

La adecuada selección de las enzimas para llevar a cabo el estudio es el aspecto más importante para obtener un buen potencial de diferenciación entre las cepas analizadas, dado que deben tener su sitio de restricción en zonas variables de la secuencia del gen. En este caso, las secuencias del gen ARNr 16S correspondientes a todas las cepas tipo del género *Micromonospora* y las cepas LUPAC (aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* en trabajos anteriores), *Salinispora arenicola* CNH-643^T y *Catellatospora citrea* 6183-E^T fueron analizadas mediante el programa WorkBench_3. Esta aplicación informática permite generar los hipotéticos fragmentos de ADN que se obtendrían al realizar la digestión del gen con cada enzima. De este modo se seleccionaron las cuatro enzimas (FspBI, Bsh1285I, Hin6I y PstI) con cuya combinación se conseguía una mejor separación a nivel de especie de las cepas estudiadas, teniendo como requisito que los productos obtenidos de la digestión tuviesen entre tres y siete fragmentos de ADN por encima de 100 pb, facilitando así el posterior análisis de los perfiles.

Para llevar a cabo el análisis de los perfiles deben tenerse en cuenta sólo las bandas nítidas, que destacan claramente sobre otras mucho más tenues, que pueden generarse porque algunos fragmentos no queden completamente digeridos, o por ligeras inespecificidades en la PCR.

*** Perfiles obtenidos con la enzima Bsh1285I**

La enzima de restricción Bsh1285I tiene un sitio de restricción de seis nucleótidos, 5'-CGRY↓CG -3', con alto contenido en G+C, por lo que, en principio, podría presentar una alta frecuencia de corte en el gen ARNr 16S de *Micromonospora*.

Del total de las 90 cepas analizadas se obtuvieron ocho tipos de perfiles diferentes (Figuras 36 a 40), formados por entre 2 y 6 fragmentos de ADN, presentando además una alta variabilidad entre los mismos. El perfil de tipo I es el mayoritario, englobando más de la mitad de las cepas estudiadas (entre ellas, los tres perfiles correspondientes a la cepa MIA 10, empleada como control). Le sigue el perfil de tipo III, con 19 cepas, el perfil de tipo II, con 8 cepas, y los perfiles VI y VII, con 6 y 5 aislados respectivamente. Los otros tres patrones de bandas obtenidos son minoritarios, agrupando las cepas MIA 05 y MIA 17 en el caso del tipo IV, la cepa MIA 21 en perfil de tipo V y la MIG 06 en el VII.

Figura 36.- Perfiles ARDRA obtenidos con la enzima Bsh1285I.

En la figura se exponen, de izquierda a derecha, el perfil correspondiente al Marcador VI (M), y los perfiles de tipo I al VIII. Los números de la parte inferior de la imagen representan el número de cepas que se obtuvieron para cada perfil.

Figura 37.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Bsh1285I, primer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 25). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 03 (línea 3), MIA 04 (línea 4), MIA 05 (línea 5), MIA 06 (línea 6), MIA 07 (línea 7), MIA 08 (línea 8), MIA 09 (línea 09), MIA 10 (línea 10), MIA 11 (línea 11), MIA 12 (línea 12), MIA 13 (línea 13), MIA 14 (línea 15), MIA 15 (línea 16), MIA 16 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 19 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 21 (línea 21), MIA 22 (línea 22), MIA 23 (línea 23), MIA 24 (línea 24) y MIA 25 (línea 26).

Figura 38.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Bsh1285I, segundo gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 26 (línea 2), MIA 27 (línea 3), MIA 28 (línea 4), MIA 29 (línea 5), MIA 30 (línea 6), MIA 31 (línea 7), MIA 32 (línea 8), MIA 33 (línea 09), MIA 34 (línea 10), MIA 35 (línea 11), MIA 36 (línea 12), MIA 38 (línea 13), MIA 39 (línea 15), MIA 41 (línea 16), MIA 42 (línea 17), MIA 43 (línea 18), MIA 46 (línea 19), MIA 47 (línea 20), MIA 48 (línea 21), MIA 49 (línea 22), MIA 50 (línea 23), MIA 52 (línea 24) y MIA 10a (línea 25).

Figura 39.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Bsh1285I, tercer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 53 (línea 2), MIA 54 (línea 3), MIA 55 (línea 4), MIA 56 (línea 5), MIA 57 (línea 6), MIA 58 (línea 7), MIA 59 (línea 8), MIA 60 (línea 09), MIA 61 (línea 10), MIA 62 (línea 11), MIA 63 (línea 12), MIA 64 (línea 13), MIA 65 (línea 15), MIA 66 (línea 16), MIA 67 (línea 17), MIA 68 (línea 18), MIA 69 (línea 19), MIA 70 (línea 20), MIA 71 (línea 21), MIA 72 (línea 22), MIA 73 (línea 23), MIA 74 (línea 24) y MIA 10b (línea 25).

Figura 40.- Perfiles de RFLP de las cepas MIG empleando la enzima Bsh1285I.

Marcador VI (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 14), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

*** Perfiles obtenidos con la enzima FspBI**

La enzima FspBI tiene un sitio de restricción de cuatro nucleótidos, 5'- C↓TAG -3'. Al tener un sitio de restricción tan pequeño, se espera que su frecuencia de corte sea relativamente alta.

De las 90 cepas en el estudio se obtuvieron cuatro tipos de perfiles diferentes (Figuras 41 a 45), formados por entre 4 y 8 fragmentos de ADN, siendo, en general, poco variables. Los perfiles de tipo I y II son los que engloban a la gran mayoría de las cepas, con 51 y 34 representantes respectivamente. Los otros dos perfiles obtenidos son mucho más minoritarios, agrupando las cepas MIA 17, MIA 43 y MIG 06 en el caso del tipo III y las cepas MIA 21 y MIA 48 en el de tipo IV.

Los tres perfiles obtenidos para la cepa MIA 10 quedan correctamente agrupados dentro del primer perfil.

Figura 41.- Perfiles ARDRA obtenidos con la enzima FspBI.

En la figura se exponen, de izquierda a derecha, el perfil correspondiente al Marcador VI (M), y los perfiles de tipo I al IV. Los números de la parte inferior de la imagen representan el número de cepas que se obtuvieron para cada perfil.

Figura 42.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima FspBI, primer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 03 (línea 3), MIA 04 (línea 4), MIA 05 (línea 5), MIA 06 (línea 6), MIA 07 (línea 7), MIA 08 (línea 8), MIA 09 (línea 9), MIA 10 (línea 10), MIA 11 (línea 11), MIA 12 (línea 12), MIA 13 (línea 13), MIA 14 (línea 15), MIA 15 (línea 16), MIA 16 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 19 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 21 (línea 21), MIA 22 (línea 22), MIA 23 (línea 23), MIA 24 (línea 24) y MIA 25 (línea 25).

Figura 43.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima FspBI, segundo gel.

Marcador XIV (líneas 1, 17 y 26). Cepas MIA 26 (línea 2), MIA 27 (línea 3), MIA 28 (línea 4), MIA 29 (línea 5), MIA 30 (línea 6), MIA 31 (línea 7), MIA 32 (línea 8), MIA 33 (línea 9), MIA 34 (línea 10), MIA 35 (línea 11), MIA 36 (línea 12), MIA 38 (línea 13), MIA 39 (línea 14), MIA 41 (línea 15), MIA 42 (línea 16), MIA 43 (línea 18), MIA 46 (línea 19), MIA 47 (línea 20), MIA 48 (línea 21), MIA 49 (línea 22), MIA 50 (línea 23), MIA 52 (línea 24) y MIA 10a (línea 25).

Figura 44.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima FspBI, tercer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 53 (línea 2), MIA 54 (línea 3), MIA 55 (línea 4), MIA 56 (línea 5), MIA 57 (línea 6), MIA 58 (línea 7), MIA 59 (línea 8), MIA 60 (línea 09), MIA 61 (línea 10), MIA 62 (línea 11), MIA 63 (línea 12), MIA 64 (línea 13), MIA 65 (línea 15), MIA 66 (línea 16), MIA 67 (línea 17), MIA 68 (línea 18), MIA 69 (línea 19), MIA 70 (línea 20), MIA 71 (línea 21), MIA 72 (línea 22), MIA 73 (línea 23), MIA 74 (línea 24) y MIA 10b (línea 25).

Figura 45.- Perfiles de RFLP de las cepas MIG empleando la enzima FspBI.

Marcador VI (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 13), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

*** Perfiles obtenidos con la enzima Hin6I**

El sitio de restricción de la enzima Hin6I está formado por cuatro nucleótidos, dos guaninas y dos citosinas, 5'- G↓CGC -3'. Por estas características, al igual que en las otras enzimas empleadas, se espera que su frecuencia de corte sea alta, pudiendo obtener con ello una mayor diferenciación.

Se obtuvieron siete perfiles de ARDRA diferentes con la enzima Hin6I (Figuras 46 a 50), formados por entre 5 y 9 fragmentos de ADN. Los siete tipos de patrones de bandas presentaban grandes similitudes entre ellos, siendo el caso más claro los perfiles I, II, VI y VII, que son prácticamente idénticos salvo pequeñas modificaciones. Los perfiles I y III son los mayoritarios, englobando 42 y 30 representantes respectivamente. El perfil VI esta formado por siete cepas. Los otros cuatro perfiles son mucho menos frecuentes, agrupando dos cepas en el caso de los perfiles II (MIA 07 y MIA 39) y V (MIA 21 y MIG 16), tres representantes en el IV (MIA 17, MIA 27 y MIG 06) y cuatro en el perfil VII (MIA 64, MIA 69, MIG 03 y MIG 04). El perfil I volvió a agrupar a las tres muestras de la cepa MIA 10.

Figura 46.- Perfiles ARDRA obtenidos con la enzima Hin6I.

En la figura se exponen, de izquierda a derecha, el perfil correspondiente al Marcador VI (M), y los perfiles de tipo I al VII. Los números de la parte inferior de la imagen representan el número de cepas que se obtuvieron para cada perfil.

Figura 47.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Hin6I, primer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 03 (línea 3), MIA 04 (línea 4), MIA 05 (línea 5), MIA 06 (línea 6), MIA 07 (línea 7), MIA 08 (línea 8), MIA 09 (línea 9), MIA 10 (línea 10), MIA 11 (línea 11), MIA 12 (línea 12), MIA 13 (línea 13), MIA 14 (línea 15), MIA 15 (línea 16), MIA 16 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 19 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 21 (línea 21), MIA 22 (línea 22), MIA 23 (línea 23), MIA 24 (línea 24) y MIA 25 (línea 25).

Figura 48.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Hin6I, segundo gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 26 (línea 2), MIA 27 (línea 3), MIA 28 (línea 4), MIA 29 (línea 5), MIA 30 (línea 6), MIA 31 (línea 7), MIA 32 (línea 8), MIA 33 (línea 9), MIA 34 (línea 10), MIA 35 (línea 11), MIA 36 (línea 12), MIA 38 (línea 13), MIA 39 (línea 15), MIA 41 (línea 16), MIA 42 (línea 17), MIA 43 (línea 18), MIA 46 (línea 19), MIA 47 (línea 20), MIA 48 (línea 21), MIA 49 (línea 22), MIA 50 (línea 23), MIA 52 (línea 24) y MIA 10a (línea 25).

Figura 49.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima Hin6I, tercer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 53 (línea 2), MIA 54 (línea 3), MIA 55 (línea 4), MIA 56 (línea 5), MIA 57 (línea 6), MIA 58 (línea 7), MIA 59 (línea 8), MIA 60 (línea 09), MIA 61 (línea 10), MIA 62 (línea 11), MIA 63 (línea 12), MIA 64 (línea 13), MIA 65 (línea 15), MIA 66 (línea 16), MIA 67 (línea 17), MIA 68 (línea 18), MIA 69 (línea 19), MIA 70 (línea 20), MIA 71 (línea 21), MIA 72 (línea 22), MIA 73 (línea 23), MIA 74 (línea 24) y MIA 10b (línea 25).

Figura 50.- Perfiles de RFLP de las cepas MIG empleando la enzima Hin6I.

Marcador VI (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 13), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

*** Perfiles obtenidos con la enzima PstI**

La enzima PstI tiene un sitio de restricción de seis pares de bases, cortando la secuencia de ADN 5'- CTGCA↓G -3'. Al igual que en los casos anteriores, esta enzima se seleccionó porque, en los análisis previos, demostró un buen poder de separación de las especies del género *Micromonospora*.

Los perfiles obtenidos con la enzima PstI se pudieron dividir en ocho tipos (Figura 51-55), formados por entre 1 (ningún corte) y 5 fragmentos de ADN. Los perfiles II y III son los mayoritarios, estando formados por 44 y 25 cepas respectivamente, seguidos por los perfiles de tipo IV, VI y VIII, que engloban seis, cinco y cinco cepas respectivamente. Los tres perfiles restantes son minoritarios, englobando tres cepas en el caso del perfil de tipo I (MIA 01, MIA 05 y MIA 07), y una sola cepa en los perfiles V (MIA 62) y VII (MIA 69). Los tres perfiles correspondientes a la cepa control MIA 10 quedan englobados dentro del tipo II.

Figura 51.- Perfiles ARDRA obtenidos con la enzima PstI.

En la figura se exponen, de izquierda a derecha, el perfil correspondiente al Marcador VI (M), y los perfiles de tipo I al VIII. Los números de la parte inferior de la imagen representan el número de cepas que se obtuvieron para cada perfil.

Figura 52.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima PstI, primer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 01 (línea 2), MIA 03 (línea 3), MIA 04 (línea 4), MIA 05 (línea 5), MIA 06 (línea 6), MIA 07 (línea 7), MIA 08 (línea 8), MIA 09 (línea 9), MIA 10 (línea 10), MIA 11 (línea 11), MIA 12 (línea 12), MIA 13 (línea 13), MIA 14 (línea 15), MIA 15 (línea 16), MIA 16 (línea 17), MIA 17 (línea 18), MIA 19 (línea 19), MIA 20 (línea 20), MIA 21 (línea 21), MIA 22 (línea 22), MIA 23 (línea 23), MIA 24 (línea 24) y MIA 25 (línea 25).

Figura 53.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima PstI, segundo gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 26 (línea 2), MIA 27 (línea 3), MIA 28 (línea 4), MIA 29 (línea 5), MIA 30 (línea 6), MIA 31 (línea 7), MIA 32 (línea 8), MIA 33 (línea 9), MIA 34 (línea 10), MIA 35 (línea 11), MIA 36 (línea 12), MIA 38 (línea 13), MIA 39 (línea 15), MIA 41 (línea 16), MIA 42 (línea 17), MIA 43 (línea 18), MIA 46 (línea 19), MIA 47 (línea 20), MIA 48 (línea 21), MIA 49 (línea 22), MIA 50 (línea 23), MIA 52 (línea 24) y MIA 10a (línea 25).

Figura 54.- Perfiles de RFLP de las cepas MIA empleando la enzima PstI, tercer gel.

Marcador XIV (líneas 1, 14 y 26). Cepas MIA 53 (línea 2), MIA 54 (línea 3), MIA 55 (línea 4), MIA 56 (línea 5), MIA 57 (línea 6), MIA 58 (línea 7), MIA 59 (línea 8), MIA 60 (línea 09), MIA 61 (línea 10), MIA 62 (línea 11), MIA 63 (línea 12), MIA 64 (línea 13), MIA 65 (línea 15), MIA 66 (línea 16), MIA 67 (línea 17), MIA 68 (línea 18), MIA 69 (línea 19), MIA 70 (línea 20), MIA 71 (línea 21), MIA 72 (línea 22), MIA 73 (línea 23), MIA 74 (línea 24) y MIA 10b (línea 25).

Figura 55.- Perfiles de RFLP de las cepas MIG empleando la enzima PstI.

Marcador VI (líneas 1, 13 y 24). Cepas MIG 01 (línea 2), MIG 02 (línea 3), MIG 03 (línea 4), MIG 04 (línea 5), MIG 05 (línea 6), MIG 06 (línea 7), MIG 07 (línea 8), MIG 08 (línea 09), MIG 09 (línea 10), MIG 10 (línea 11), MIG 11 (línea 12), MIG 12 (línea 13), MIG 13 (línea 15), MIG 14 (línea 16), MIG 15 (línea 17), MIG 16 (línea 18), MIG 17 (línea 19), MIG 18 (línea 20), MIG 19 (línea 21), MIG 20 (línea 22) y MIG 21 (línea 23).

*** Análisis de los resultados obtenidos para cada enzima y en conjunto**

El análisis de los distintos perfiles de ARDRA obtenidos muestra que la enzima de restricción que menos discriminación ha aportado entre las cepas es la FspBI, a partir de la cual sólo se han podido generar cuatro grupos, englobando dos de ellos a casi el 95% de las 90 cepas estudiadas. Las otras tres enzimas han logrado aportar mucha más información, generándose siete grupos de perfiles de restricción en el caso de la enzima Hin6I y ocho para Bsh1285I y PstI, de los cuales siempre uno es mayoritario, agrupando alrededor del 50% de las cepas analizadas.

La Tabla 9 muestra un resumen de los distintos perfiles obtenidos para cada cepa, a partir del cual se puede observar la alta variabilidad que aporta el análisis conjunto de las cuatro enzimas. El patrón conjunto más repetido es el I-I-I-II, referido al tipo de perfil de cada enzima (Bsh1285I, FspBI, Hin6I y PstI respectivamente), contabilizando un total de 20 cepas con este mismo patrón de restricción.

El análisis de los resultados recogidos para cada enzima por separado no aporta demasiada información, dado que la diferenciación de las cepas es mucho más limitada que la obtenida para las técnicas de BOX-PCR y TP-RAPD. Como se ha visto anteriormente, el verdadero potencial de los perfiles ARDRA se alcanza al combinar en un mismo análisis los perfiles obtenidos para las cuatro enzimas en su conjunto. Para ello se empleó el programa Bionumerics, que permite realizar este tipo de análisis multivariantes (cada una con el mismo peso relativo), generando un dendrograma de similitud (Figura 56). Tomando como referencia un nivel de similitud del 65%, se establecieron doce grupos de cepas. El grupo 9 fue el mayoritario, formado por 30 cepas tanto MIA como MIG, incluidas las tres repeticiones del control MIA 10. El grupo seis estuvo formado por 21 cepas, 19 de las cuales fueron aisladas de *L. angustifolius*. Los grupos 11 y 8 también englobaron un número significativo de representantes, con 9 y 8 aislados respectivamente, todos ellos provenían de plantas de *L. angustifolius*. Los otros grupos estaban formados por entre seis y una sola cepa. Destaca el hecho de que los grupos 2 y 10 incluyen cada uno cuatro cepas, todas aisladas de nódulos de *L. gredensis*. Al igual que en el caso de los resultados de TP-RAPD, sí parece haber cierta especificidad entre la planta de aislamiento y las cepas analizadas.

Tabla 9.- Perfiles de ARDRA obtenidos para cada una de las cepas analizadas.

	Bsh1285I	FspBI	Hin6I	PstI
MIA 01	I	I	I	I
MIA 03	I	I	I	II
MIA 04	II	II	I	III
MIA 05	IV	I	I	I
MIA 06	I	I	I	II
MIA 07	I	I	II	I
MIA 08	I	I	I	II
MIA 09	III	II	III	VIII
MIA 10	I	I	I	II
MIA 10a	I	I	I	II
MIA 10b	I	I	I	II
MIA 11	I	II	III	II
MIA 12	I	II	III	II
MIA 13	III	II	III	VIII
MIA 14	III	II	III	VIII
MIA 15	III	I	III	III
MIA 16	I	II	III	II
MIA 17	IV	III	IV	VIII
MIA 19	III	II	III	III
MIA 20	I	II	III	II
MIA 21	V	IV	V	IV
MIA 22	I	I	I	II
MIA 23	I	I	I	II
MIA 24	I	I	I	II
MIA 25	I	I	I	II
MIA 26	II	I	I	III
MIA 27	III	I	IV	III
MIA 28	III	II	III	III
MIA 29	III	I	III	III
MIA 30	III	I	III	III
MIA 31	I	I	III	II
MIA 32	III	I	III	III
MIA 33	I	II	III	II
MIA 34	III	I	III	III
MIA 35	I	II	I	II
MIA 36	I	II	VI	III
MIA 38	I	II	I	II
MIA 39	I	II	II	II
MIA 41	I	I	I	II
MIA 42	I	II	I	II
MIA 43	I	III	I	II
MIA 46	I	II	I	II
MIA 47	I	II	I	II
MIA 48	I	IV	III	II
MIA 49	I	I	I	II

	Bsh1285I	FspBI	Hin6I	PstI
MIA 50	I	I	VI	II
MIA 52	I	I	I	II
MIA 53	I	II	III	II
MIA 54	I	II	III	II
MIA 55	I	I	I	II
MIA 56	I	I	I	II
MIA 57	III	II	III	III
MIA 58	I	I	I	II
MIA 59	I	II	III	II
MIA 60	VII	I	I	II
MIA 61	III	II	III	III
MIA 62	II	I	I	V
MIA 63	III	II	III	III
MIA 64	VI	II	VII	IV
MIA 65	I	I	VI	III
MIA 66	III	I	III	III
MIA 67	III	II	III	III
MIA 68	II	II	I	III
MIA 69	VI	I	VII	VII
MIA 70	III	II	III	III
MIA 71	I	I	I	VI
MIA 72	III	I	III	III
MIA 73	II	II	III	III
MIA 74	II	I	I	III
MIG 01	I	I	I	II
MIG 02	I	I	I	II
MIG 03	VI	II	VII	IV
MIG 04	VI	II	VII	IV
MIG 05	I	I	I	II
MIG 06	VIII	III	IV	VIII
MIG 07	I	I	III	VI
MIG 08	I	I	VI	VI
MIG 09	VI	II	I	IV
MIG 10	VII	I	I	II
MIG 11	VII	I	I	II
MIG 12	VII	I	I	II
MIG 13	I	I	VI	VI
MIG 14	I	I	VI	VI
MIG 15	I	I	I	II
MIG 16	VI	II	V	IV
MIG 17	VII	I	VI	II
MIG 18	I	I	I	II
MIG 19	II	I	I	III
MIG 20	III	II	III	III
MIG 21	II	I	I	III

Figura 56.- Dendrograma de similitud resultante de la combinación de los perfiles obtenidos para las enzimas Bsh1285I, FspBI, Hin6I y PstI mediante la técnica ARDRA, empleando el método de agrupamiento UPGMA

Como se observa en el dendrograma anterior (Figura 56), la mayoría de los grupos formados presentan una similitud relativamente alta entre ellos, a excepción de los cuatro primeros, que tienen una similitud inferior al 35% con el resto, siendo posible que, al tratarse de perfiles basados en patrones de restricción del gen ARNr 16S, no pertenezcan al género *Micromonospora*.

Análisis conjunto de las técnicas de tipado

Tras analizar las tres técnicas de genotipado (BOX-PCR, TP-RAPD y ARDRA) empleadas en la caracterización de las micromonósporas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* y *L. gredensis*, se observa que los resultados obtenidos son dispares, aunque en general se constata una elevada diversidad entre las cepas aisladas.

La mayor diversidad entre los perfiles obtenidos fue aportada por la técnica de BOX-PCR, a partir de la cual se obtuvieron veinte grupos, tomando como referencia un nivel de similitud del 50%. Sin embargo, la diversidad real de los perfiles genéticos encontrados fue mucho mayor, habiendo pocas cepas que presentaran perfiles idénticos, pudiendo en estos casos considerarse cepas muy próximas, o incluso clones (como para las cepas MIG03 y MIG 04). Además, la reproducibilidad de la técnica no es perfecta, encontrando algunas diferencias entre los tres perfiles obtenidos para la cepa MIA 10, aunque en general fueron muy similares.

En el caso de la técnica TP-RAPD, también se establecieron 20 grupos distintos a partir de los perfiles resultantes, sin embargo, existió una mayor homogeneidad entre ellos, debiendo tomar un nivel de similitud por encima del 80% para la diferenciación de los grupos. La reproducibilidad de este método en este tipo de bacterias fue relativamente buena, si bien existieron también ligeras diferencias entre los tres perfiles obtenidos para la cepa control MIA 10.

Los patrones de restricción obtenidos para cada una de las cuatro enzimas empleadas en la técnica de ARDRA fueron mucho más conservados, apareciendo numerosas cepas con perfiles idénticos para cada enzima, generándose como máximo ocho tipos de

perfiles en el caso de las enzimas con mayor poder de discriminación (Bsh1285I y PstI). Sin embargo, al realizar un análisis conjunto de los cuatro tipos de perfiles, se observó que se obtenía una mayor diferenciación entre las cepas, a partir de la cual se pudieron obtener 12 grupos en base a una similitud por encima del 65%. Se puede pensar por lo tanto, que esta técnica no es suficientemente sensible para diferenciar clones, pero aporta una mejor agrupación a nivel de especie, pues con esta finalidad fueron estudiadas *in silico* las diferentes enzimas empleadas. La reproducibilidad de la técnica fue perfecta, pudiendo agruparse todos los perfiles de restricción de la cepa MIA 10 en el mismo patrón I-I-I-II (Tabla 9), aunque posteriormente las diferencias entre las imágenes de los geles hizo que en el dendrograma generado con el programa Bionumerics, quedasen agrupadas a nivel de grupo, pero en distintos subgrupos (con un porcentaje de similitud en torno al 80%). Además, esta técnica permite establecer que, con una alta probabilidad, no todos los aislados de tipo actinobacteria pertenecen al género *Micromonospora*, dado que algunos de los grupos resultantes del análisis de los perfiles eran notablemente distintos del resto.

Se puede concluir por lo tanto que las tres técnicas resultan válidas para obtener una primera estimación de la diversidad de las cepas aisladas, pero que en el caso de BOX-PCR y TP-RAPD, esta agrupación es a nivel de cepa, siendo sensiblemente más discriminatoria en el caso de la técnica de BOX-PCR, que parece más adecuada para las bacterias del género *Micromonospora*. En cambio, la técnica de ARDRA permite realizar un estudio de la diversidad a nivel de especie o subespecie. Estos resultados previos deben contrastarse con los datos resultantes del análisis taxonómico de las cepas.

El empleo de este tipo de técnicas de caracterización genética de los aislados permite la posibilidad de realizar una selección de representantes para llevar a cabo la secuenciación del gen ARNr 16S completo, evitando la secuenciación del mismo para todas las cepas de estudio. Dado que los tres métodos empleados aportaron una información aparentemente válida para diferenciar las cepas analizadas, se decidió llevar a cabo un estudio conjunto en base a los resultados obtenidos para las mismas. De este modo se posibilita la obtención de un resultado mucho más completo, en tanto en cuanto se basó en el análisis de una mayor cantidad de información que la que pudiesen aportar cada una de las tres técnicas por separado, obteniendo, previsiblemente, una

mejor agrupación de las actinobacterias aisladas. Para ello se empleó una vez más el programa Bionumerics, realizando un análisis multivariable en el cual se dió el mismo peso a cada una de las tres técnicas. El dendrograma resultante de aplicar el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento UPGMA se muestra en la Figura 57.

Figura 57.- Dendrograma de similitud resultante de la combinación de los tres tipos de técnicas de genotipado empleadas

Tomando como referencia un nivel de similitud del 60% se establecieron 21 grupos, de los cuales se seleccionaron uno o varios representantes (de acuerdo al tamaño y a la similitud entre sus integrantes) para llevar a cabo la secuenciación del gen ARNr 16S.

Es destacable el hecho de que, en este dendrograma consenso entre las tres técnicas de genotipado, se obtiene un mejor agrupamiento en las tres réplicas de la cepa control MIA 10, que en cualquiera de los otros tres dendrogramas por separado. Este hecho apoya la idea de que el uso conjunto de los distintos métodos empleados aporta una mejor información a la hora de realizar un agrupamiento de los aislados, obteniendo una separación de los mismos más rigurosa y sólida.

De los 21 grupos establecidos, el que engloba a un mayor número de cepas es el 6, con 23 representantes (incluidas las tres repeticiones de la MIA 10), reuniendo en su mayoría cepas aisladas de *Lupinus angustifolius*, aunque también forman parte del mismo las cepas MIG 05 y MIG 18, aisladas de *L. gredensis*. Los grupos 5, 12 y 15 incluyen un significativo número de aislados, con 13, 11 y 10 representantes respectivamente, de los cuales sólo el grupo 12 está formado por cepas aisladas de ambas plantas estudiadas, mientras que los dos restantes agrupan exclusivamente bacterias aisladas de *L. angustifolius*.

La gran mayoría de los grupos determinados en este análisis (más del 80%) están formados por entre cuatro y una sola cepa. Algunos de estos grupos son significativamente diferentes al resto del conjunto, como es el caso de los grupos 1, 2, 3, 4, 19, 20 y 21, que posiblemente estén representando bacterias pertenecientes a géneros distintos del mayoritario, *Micromonospora*, y por lo tanto pueden ser especialmente interesantes en la búsqueda de nuevos microorganismos que establezcan relaciones potencialmente activas con las plantas.

En numerosos casos las cepas aisladas de las dos especies de lupinos analizadas aparecen agrupadas de forma conjunta, por lo que no se aprecia una especificidad de las mismas respecto de la planta hospedadora. De este modo, trece de las veintiún bacterias aisladas de nódulos de *L. gredensis* aparecen estrechamente relacionadas con otras cepas aisladas de *L. angustifolius*, formando parte de los grupos 6, 7, 9, 12, 16 y 18. En cambio, el resto de los grupos están representados por bacterias aisladas exclusivamente

de *L. angustifolius* (en el caso de los grupos 3, 4, 5, 8, 13, 14, 15, 19) o de *L. gredensis* (en el caso de los grupos 1, 2, 10, 17, 20 y 21). En este sentido, a pesar de que se obtuvo un número notablemente más alto de cepas de tipo *Micromonospora* a partir de nódulos de *L. angustifolius* que de *L. gredensis*, a la hora de evaluar la diversidad de estas bacterias en las estructuras nodulares, no se aprecian diferencias significativas entre ellas, existiendo una elevada diversidad bacteriana en ambas especies de lupino.

CARACTERIZACIÓN FILOGENÉTICA DE LAS CEPAS DE TIPO ACTINOBACTERIA

Desde que el microbiólogo estadounidense Carl Woese descubriese el potencial de la molécula del ARNr 16S, y del gen que la codifica, como marcador filogenético universal (Woese, 1987), toda la taxonomía moderna se ha basado, de forma muy especial, en el estudio de la misma. Dado que presenta una secuencia altamente conservada, ha evolucionado de forma muy lenta a lo largo de la historia evolutiva de las especies, por lo que se presenta como un excelente reloj evolutivo, que permite determinar cuando, a partir de un ancestro común, dos especies se diferenciaron. Por esta razón, el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S fue analizado en este trabajo, con el objetivo de describir la posición taxonómica de las actinobacterias aisladas de nódulos de lupino y establecer la validez de las pruebas genotípicas para la estimación de diversidad de los aislados.

Como se ha explicado anteriormente, la selección de las cepas para llevar a cabo la secuenciación del ARNr 16S se basó en el análisis conjunto de las tres técnicas empleadas en la caracterización genotípica de las bacterias estudiadas (Figura 57). Además de los representantes de estos 21 grupos obtenidos, se decidió igualmente secuenciar este gen para las 15 cepas aisladas del nódulo P2/N1, con la finalidad de tener una idea de la diversidad específica existente en un mismo nódulo. De este modo se seleccionaron 52 cepas para la secuenciación del gen ARNr 16S, 36 aisladas de *L. angustifolius* y 15 de *L. gredensis*.

Los resultados de la secuenciación del gen ribosómico 16S (Figura 56 y Tabla 10) muestran que de las 52 bacterias analizadas, 44 pertenecían al género *Micromonospora* (equivalente a un 85% de las cepas secuenciadas), siendo claramente la población de actinobacterias más abundante, y confirmandose la hipótesis establecida en base a la caracterización morfológica. Además de *Micromonospora*, se aislaron cepas de actinomicetos de otros géneros como las cepas MIA 07 y MIA 39 (pertenecientes al género *Verrucosispota*), MIA 69 y MIG 09 (englobadas dentro del género *Actinomadura*), MIG 03, MIG 16 y MIA 64 (estrechamente relacionadas con varias especies del género *Microbispora*) y la cepa MIA 36 (perteneciente al género *Streptomyces*). Estos resultados mantienen una buena correlación con los obtenidos a partir de los diferentes métodos de caracterización genotípica, en los cuales ya se observaba la existencia de cepas pertenecientes a géneros diferentes de *Micromonospora*.

Algunas de las cepas aisladas de nódulos de *L. gredensis* aparecen estrechamente relacionadas en base a su gen ARNr 16S, con otras aisladas de *L. angustifolius*, como en el caso de la cepa MIG 01 y MIG 15. En otros casos, estas cepas quedan separadas ligeramente, formando brazos independientes. En general no se aprecia una clara especialización a nivel de hospedador, dado que las cepas aisladas de ambas plantas se intercalan en el árbol filogenético correspondiente (Figura 58).

Al analizar los resultados obtenidos para las 15 bacterias aisladas del nódulo P2/N1 se observan resultados desiguales. Por un lado, seis de las cepas quedan englobadas dentro del mismo brazo en el árbol filogenético, presentando una elevada similitud con la especie *Micromonospora echinospora*. Sin embargo, otras cepas quedan repartidas en otros grupos, relacionadas con otras especies de *Micromonospora* (como *M. aurantiaca*, *M. coxensis*, *M. eburnea* y *M. narathiwatensis*) y, en el caso de la cepa MIA 39, fuera incluso del género *Micromonospora*. Por lo tanto, un mismo nódulo puede ser colonizado por cepas de *Micromonospora* pertenecientes a diferentes especies.

Figura 58.- Árbol filogenético construido a partir de las correspondientes secuencias del gen ARNr 16S de las cepas MIA (naranja) y MIG (azul) analizadas. Aparecen subrayadas las cepas aisladas del mismo nódulo (P2/N1).

Tabla 10.- Listado de las 52 cepas seleccionadas para realizar la secuenciación del gen ARNr 16S.

Cepa	Especie más próxima	Similitud	Cepa	Especie más próxima	Similitud
MIA 01	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 01	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%
MIA 03	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 03	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	98,67%
MIA 04	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	99,65%	MIG 05	<i>Micromonospora chersina</i>	99,23%
MIA 05	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,56%	MIG 06	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,86%
MIA 07	<i>Verrucospora gifhornensis</i>	99,30%	MIG 07	<i>Micromonospora echinofusca</i>	99,51%
MIA 08	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 08	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	98,74%
MIA 10	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 09	<i>Actinomadura yumaensis</i>	99,09%
MIA 13	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,10%	MIG 10	<i>Micromonospora chaitaphumensis</i>	99,65%
MIA 15	<i>Micromonospora matsumotoense</i>	99,37%	MIG 13	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	99,30%
MIA 16	<i>Micromonospora corariae</i>	99,45%	MIG 14	<i>Micromonospora viridifaciens</i>	99,31%
MIA 22	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 15	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	99,02%
MIA 25	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%	MIG 16	<i>Microbispora rosea</i> subsp. <i>rosea</i>	99,58%
MIA 26	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	99,58%	MIG 17	<i>Micromonospora chaitaphumensis</i>	99,22%
MIA 27	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,50%	MIG 20	<i>Micromonospora lupini</i>	99,44%
MIA 28	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,24%	MIG 21	<i>Micromonospora coxensis</i>	99,51%
MIA 32	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,13%			
MIA 33	<i>Micromonospora corariae</i>	99,28%			
MIA 36	<i>Streptomyces mutomycini</i>	100,00%			
MIA 38	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%			
MIA 39	<i>Verrucospora gifhornensis</i>	99,27%			
MIA 42	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	99,03%			
MIA 46	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,64%			
MIA 48	<i>Micromonospora corariae</i>	99,38%			
MIA 50	<i>Micromonospora eburnea</i>	99,15%			
MIA 52	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	98,91%			
MIA 55	<i>Micromonospora echinospora</i>	99,70%			
MIA 57	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,45%			
MIA 58	<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	99,40%			
MIA 60	<i>Micromonospora coxensis</i>	98,88%			
MIA 62	<i>Micromonospora coxensis</i>	99,40%			
MIA 63	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,15%			
MIA 64	<i>Microbispora corallina</i>	98,60%			
MIA 65	<i>Micromonospora auratinigra</i>	98,61%			
MIA 67	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,45%			
MIA 69	<i>Actinomadura alba</i>	99,65%			
MIA 73	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	99,59%			
MIA 74	<i>Micromonospora coxensis</i>	98,89%			

En la tabla se indica la especie más próxima y el porcentaje de similitud con la cepa tipo correspondiente (obtenido a través del servidor EzTaxon). Aparecen en rojo las cepas aisladas del mismo nódulo (P2/N1).

Otros autores han descrito recientemente la alta capacidad que presentaban algunos aislados de tipo actinomiceto para colonizar raíces de *Phaseolus vulgaris* (El-Tarabily et al., 2008). Entre las cepas analizadas, las que presentaron mejores resultados pertenecían a los géneros *Actinomadura*, *Microbispora* y *Micromonospora*, además de *Actinoplanes* y *Streptosporangium*. Estos resultados presentan una sorprendente concordancia con los obtenidos en este trabajo, en los que se ha detectado la presencia de cepas de *Actinomadura*, *Microbispora* y *Micromonospora* en el interior de nódulos de otro género de leguminosas (*Lupinus*). Su presencia, por tanto, no parece casual, y su papel como agentes promotores del crecimiento vegetal es muy probable.

Khamna et al. (2009) también aislaron cepas pertenecientes a *Actinomadura*, *Microbispora* y *Micromonospora* de la rizosfera de distintas plantas medicinales, evaluando su potencial como PGPR. De estos tres géneros, *Actinomadura* fue el que presentó mejores resultados, produciendo significativas cantidades de ácido indol-acético.

Análisis filogenético de las cepas de tipo *Micromonospora*

Analizando las bacterias aisladas pertenecientes al género *Micromonospora*, y relacionándolas con las cepas tipo descritas, se puede crear un árbol filogenético en el que se observan las relaciones filogenéticas establecidas (Figura 59).

Aunque las micromonósporas aisladas de ambas especies de lupino se encuentran repartidas a lo largo de todo el árbol filogenético del género, tienden a formarse grupos mayoritarios cercanamente relacionados con unas especies en concreto. El grupo más numeroso está formado por 11 cepas (MIA 01, MIA 03, MIA 05, MIA 08, MIA 10, MIA 22, MIA 25, MIA 38, MIA 46, MIA 55 y MIG 01), relacionadas con la especie *M. echinofusca*, aunque formando un brazo claramente independiente. Las once cepas de este grupo presentan una altísima similitud entre ellas respecto al gen ribosómico 16S, siendo un caso único en todo el estudio. La cepa MIG 17 aparece estrechamente agrupada con esta misma especie, mientras que la cepa MIG 10 parece pertenecer a la

especie *M. citrea*. La cepa MIG 05 podría representar una nueva especie, dado que aparece claramente separada, en un brazo independiente relacionado con las especies *M. chersina* y *M. endolithica*.

Un hallazgo interesante es que tres de las cepas aisladas de nódulos de *L. angustifolius* (MIA 16, MIA 33 y MIA 48) aparecen estrechamente vinculadas a la especie *M. coriariae*, que fue aislada a partir de nódulos fijadores de nitrógeno de *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006), una planta que establece simbiosis con *Frankia*. Se trata por lo tanto de una especie bacteriana que se ha encontrado en los dos tipos de nódulos fijadores de nitrógeno conocidos, en leguminosas y plantas actinorrizas.

Las cepas MIA 65 y MIG 08 forman dos brazos independientes relacionados con la especie *M. olivasterospora*, pudiendo representar dos nuevas especies del género *Micromonospora*. La similitud del gen ARNr 16S de estas dos cepas con la correspondiente secuencia de la cepa tipo es de 98,6% y 98,7% respectivamente, pudiendo considerarse porcentajes relativamente bajos para este género, dado que se han descrito nuevas especies de *Micromonospora* con porcentajes de similitud superiores al 99% (Thawai *et al.*, 2005; Kirby & Meyers, 2009; Tanasupawat *et al.*, 2009).

Las cepas MIA 42, MIA 52 y MIG 15 presentan una alta relación filogenética entre ellas, aunque forman un grupo claramente diferenciado dentro del árbol del género, lejanamente relacionado con la especie *M. olivasterospora*, con porcentajes de similitud para el gen ARNr 16S en torno al 99%. De forma similar, las cepas MIA 50 y MIA 17 forman un brazo independiente, moderadamente relacionado con varias especies del género.

Dos de las bacterias aisladas de nódulos de *L. gredensis*, MIG 13 y MIG 14 quedan englobadas dentro del brazo de *M. viridifaciens*. Curiosamente, ambas cepas fueron aisladas de dos nódulos diferentes de la misma planta. Otros dos grupos, formados por las cepas MIA 62 y MIA 74 por un lado y MIA 15 y MIG 21 por otro, forman sendos brazos independientes, relativamente relacionados con *M. coxensis*, con porcentajes de similitud que oscilan entre 98,9% y 99,5%.

De las cepas analizadas en base al gen ribosómico 16S, once presentan altas o moderadas similitudes con las especies *M. lupini* y *M. saelicesensis*, en ambos casos aisladas de nódulos de *L. angustifolius* en Salamanca (Trujillo *et al.*, 2007b). En concreto, la cepa MIG 20 podría pertenecer a la especie *M. lupini*, mientras que las cepas MIA 73 y MIG 06 quedan englobadas dentro del brazo de *M. saelicesensis*. La cepa MIA 60 forma una rama claramente separada dentro de este grupo, pudiendo representar una nueva especie. Por otro lado, dos claros grupos aparecen moderadamente relacionados con ambas especies de *Micromonospora*, formados por las cepas MIA 27, MIA 57 y MIA 67 y MIA 13, MIA 28, MIA 32 y MIA 63 respectivamente, todas ellas aisladas de la misma especie de leguminosa *L. angustifolius*. Estas siete cepas presentan porcentajes de similitud de entre 99,1% y 99,5% con la correspondiente secuencia de *M. saelicesensis*.

Las dos últimas cepas estudiadas, MIA 04 y MIA 26, están claramente relacionadas con la especie *M. aurantiaca*. Otra cepa, la *Micromonospora* sp. L5, fue aislada por Valdés *et al.* (2005) de nódulos actinorrícos de la planta *Casuarina equisetifolia*, demostrando posteriormente su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, y cuyo genoma se está secuenciando actualmente.

Figura 59.- Árbol filogenético basado en el gen ribosómico 16S de *Micromonospora*.

Árbol filogenético que incluye todas las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S de las cepas tipo del género *Micromonospora*, así como las de las cepas aisladas en este trabajo.

Análisis filogenético de las otras actinobacterias aisladas

Como se ha comentado anteriormente, aunque la mayoría de cepas aisladas de tipo actinobacteria pertenecían al género *Micromonospora*, otros géneros del orden *Actinomycetales* fueron aislados de los nódulos fijadores de nitrógeno de las dos especies de lupino estudiadas.

*** Microbispora**

El género *Microbispora* fue el segundo más numeroso tras *Micromonospora*, incluyendo un total de tres cepas cuyo gen ARNr 16S fue secuenciado: MIG 03, MIG 16 y MIA 64. Además, las cepas MIG 04 y MIA 21 podrían pertenecer a este mismo género en base a las agrupaciones obtenidas a través de las técnicas de genotipado. El género *Microbispora* pertenece a la familia *Streptosporangiaceae*, y está formado por cinco especies, siendo *Microbispora rosea* la especie tipo.

Existen un buen número de investigaciones que han descrito la presencia de bacterias del género *Microbispora* en el interior de tejidos vegetales. Okazaki *et al.* (1995) detectaron una presencia significativamente mayor de *Microbispora* en hojas de diferentes plantas que en el suelo en el que crecían esas mismas plantas. Por su parte, Araújo *et al.* (2000) realizaron aislamientos del interior de hojas y raíces de maíz, encontrando que alrededor del 60% de las cepas aisladas pertenecían al género *Microbispora*, manteniendo una elevada presencia en ambos tipos de tejidos vegetales. Estas bacterias también han sido aisladas del interior de raíces de trigo (Coombs & Franco, 2003), en las que las bacterias del género *Streptomyces* eran las más abundantes, aunque también fueron aisladas cepas de *Micromonospora* y *Nocardioides*. Sin embargo, esta es la primera vez que se describe la presencia de *Microbispora* en nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas, pudiendo abrir un nuevo campo en el estudio de las interacciones que estas bacterias establecen con las plantas.

El árbol filogenético construido a partir de las secuencias del gen ARNr 16S de las tres cepas analizadas muestra que todas están relacionadas con la especie *Microbispora*

rosea subsp. *rosea* (Figura 60). La cepa MIG 16 presenta una alta similitud con la secuencia correspondiente de la cepa tipo de esta especie, con un 99,6%. Sin embargo, las cepas MIA 64 y MIG 03 quedan agrupadas conjuntamente, en un brazo independiente, aunque con el mismo origen monofilético que la especie *Microbispora rosea* subsp. *rosea*, presentando una similitud para el gen ARNr 16S del 98,6% y 98,7% respectivamente. Entre ambas cepas la similitud para este mismo gen es del 99,5%, por lo que podrían representar una nueva especie del género.

Figura 60.- Árbol filogenético basado en el gen ribosómico 16S de *Microbispora*.

Árbol filogenético que incluye todas las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S de las cepas tipo del género *Microbispora*, así como las de las cepas MIA 64, MIG 03 y MIG 16.

* *Actinomadura*

El género *Actinomadura* también estuvo representado en el estudio a través de las cepas MIA 69 y MIG 09, aisladas de nódulos de *L. angustifolius* y *L. gredensis* respectivamente. Curiosamente, el género *Actinomadura* pertenece a la familia *Thermomonosporaceae*, incluida dentro del mismo suborden que *Microbispora* (*Streptosporangineae*). *Actinomadura madurae* es la especie tipo del género, que está formado por 44 especies. El suelo es la principal fuente de aislamiento de estas bacterias y aunque la mayor parte de las especies son inocuas para el hombre y los animales, algunas especies como *Actinomadura latina*, *Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri* son patógenas, causando actinomicetomas al infectar heridas cutáneas y

subcutáneas. Las actinomaduras son también importantes productores de metabolitos secundarios (Koguchi *et al.*, 1986; Hanada *et al.*, 1991).

Aunque no se han descrito numerosas cepas del género que establezcan interacciones con plantas, sí existen ejemplos de este tipo de interacciones, generalmente vinculadas a la rizosfera (Hong *et al.*, 2009), aunque en algunos casos se han aislado del interior de tejidos vegetales como endófitos (Qin *et al.*, 2009) e incluso se han descrito como posibles PGPRs (Khamna *et al.*, 2009; Nimnoi *et al.*, 2010). Sin embargo, es la primera vez que se aíslan este tipo de bacterias del interior de nódulos de leguminosas, por lo que esta nueva fuente de aislamiento podría ser interesante de cara a la búsqueda de nuevas moléculas de interés económico y biotecnológico.

En este trabajo se aislaron dos cepas, MIA 69 y MIG 09, que fueron identificadas en base al gen ARNr 16S como pertenecientes al género *Actinomadura*, como así se puede apreciar en el árbol filogenético construido mediante el método Neighbor-Joining para todas las especies del género (Figura 61). La cepa MIG 09 aparece estrechamente relacionada con *Actinomadura yumaensis*, y la similitud entre los correspondientes genes ribosómicos 16S es superior al 99,6%.

En el caso de la cepa MIA 69, presenta una similitud de al 99% con la cepa tipo de *Actinomadura alba*, quedando las dos especies agrupadas en una rama claramente diferenciada del resto de especies del género. Recientemente, la especie “*Actinomadura spadix*” se ha reclasificado en un nuevo género, *Actinoallomurus spadix*, dado que, al igual que *A. alba*, quedaba bastante separada del resto de las especies del género, y las diferentes pruebas realizadas confirmaron su afiliación al nuevo género descrito (Tamura *et al.*, 2009). Algo similar podría ocurrir con la cepa MIA 69 y *A. alba*, dado que la similitud con la especie más próxima, *Actinomadura fibrosa*, es del 96,7%.

Figura 61.- Árbol filogenético basado en el gen ribosómico 16S de *Actinomadura*.

Árbol filogenético que incluye todas las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S de las cepas tipo del género *Actinomadura*, así como las de las cepas MIA 69 y MIG 09.

* **Verrucosispora**

Dos cepas aisladas de dos plantas diferentes de *L. angustifolius*, MIA 07 y MIA 39, fueron identificadas como pertenecientes al género *Verrucosispora*. Este género está incluido dentro de la familia *Micromonosporaceae*, a la que también pertenece el género *Micromonospora*, estando formado únicamente por dos especies, *Verrucosispora giffhornensis*, que es la especie tipo, y *Verrucosispora lutea*.

Aunque se trata de bacterias relativamente poco abundantes, las especies del género *Verrucosispora* se aíslan con relativa frecuencia de entornos acuáticos (Liao *et al.*, 2009), especialmente de hábitats marinos, incluyendo los tejidos de organismos que habitan este tipo de ambientes, como esponjas (Jiang *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en base a la secuenciación del gen ARNr 16S muestran una alta similitud entre ambos aislados (por encima del 99,9%). En el árbol filogenético construido con las secuencias de cepas tipo de las dos especies validadas de *Verrucosispora* y las cepas MIA 07 y MIA 39, se observa que estas últimas quedan claramente englobadas dentro del género (Figura 62). Sin embargo, presentan un brazo independiente, cercano a *V. lutea*, pudiendo representar una nueva especie, sin embargo, nuevos análisis deben ser realizados de cara a su posible descripción.

Figura 62.- Árbol filogenético basado en el gen ribosómico 16S de *Verrucosispora*.

Árbol filogenético que incluye todas las secuencias correspondientes al gen ARNr 16S de las cepas tipo del género *Verrucosispora*, así como las de las cepas MIA 07 y MIA 39.

El interés en este grupo de bacterias ha ido creciendo en los últimos años, especialmente dado su elevado potencial de producción de nuevas moléculas con actividad antibiótica y antitumoral (Fiedler *et al.*, 2005). Especialmente relevante ha sido el descubrimiento

de dos nuevas moléculas con capacidad antibacteriana y antitumoral, como son la familia de las abysomicinas (Bister *et al.*, 2004; Riedlinger *et al.*, 2004) y las proximicinas (Fiedler *et al.*, 2008), todas ellas obtenidas a partir de cepas de verrucosisporas marinas. En este sentido, el descubrimiento de un nicho hasta ahora inexplorado para el aislamiento de estas bacterias, como son los nódulos de leguminosas, podría dar lugar a la obtención de nuevas cepas con potencial biotecnológico, lo cual será explorado en posteriores trabajos.

* **Streptomyces**

El género *Streptomyces* está formado por más de 500 especies bacterianas que presentan una distribución a nivel mundial, siendo especialmente abundantes en el suelo. En este trabajo la cepa MIA 36 fue aislada de un nódulo radicular de *L. angustifolius*. En este sentido, existen numerosas bacterias de este género asociadas a plantas, tanto a nivel de patógenos (Loria *et al.*, 1997) como de simbiontes endofíticos (Sardi *et al.*, 1992; Coombs & Franco, 2003; Cao *et al.*, 2004).

Dada la gran distribución a nivel global de las bacterias de este género y la variedad de rutas metabólicas que presentan, el aislamiento de una cepa de *Streptomyces* de nódulos de leguminosas no puede considerarse como algo extraño, pudiendo incluso considerarse una contaminación proveniente del suelo, o una más de las numerosas cepas endofitas que se han descrito. Para confirmar cualquiera de estos puntos serían necesario nuevos estudios de inoculación en planta. De confirmarse que se trata de un *Streptomyces* endofito, sería interesante de cara a la posible búsqueda de nuevos agentes de biocontrol, dado que se han descrito numerosos *Streptomyces* simbiontes de plantas con gran actividad frente a patógenos vegetales, especialmente hongos fitopatógenos como *Gaeumannomyces* (Coombs *et al.*, 2004), *Colletotrichum* y *Fusarium* (Taechowisan *et al.*, 2005), etc.

En concreto, la cepa MIA 36 presenta una secuencia del gen ribosómico 16S idéntica a la de la cepa tipo de la especie *Streptomyces mutomycini*, por lo que probablemente pertenezca a esta misma especie, pudiendo considerarse una nueva cepa de la misma.

ESTUDIOS DE FISIOLOGÍA Y MORFOLOGÍA

La caracterización fenotípica de las bacterias es uno de los aspectos más clásicos de la taxonomía, sin embargo, en la actualidad este tipo de estudios siguen considerándose imprescindibles a la hora de definir nuevos géneros y especies. Estos resultados deben ser analizados de forma conjunta a la caracterización genética de las cepas, en lo que se conoce actualmente como taxonomía polifásica. En base a ello, los estudios de morfología y crecimiento en diferentes sustratos es una parte especialmente importante a la hora de definir la posición taxonómica de las cepas aisladas de nódulos de leguminosas.

Microscopía y tinción de Gram

Todas las cepas incluidas en el estudio presentaron una morfología similar. Se trataba de células bacterianas con forma de hifas ramificadas con una sección de aproximadamente 0,5 μm de diámetro. Después de 2 ó 3 semanas se observó la aparición de un elevado número de esporas, en la mayoría de los casos, únicas, en los extremos de las hifas.

Todas las cepas adquirían y retenían el cristal violeta en la tinción de Gram, siendo por tanto bacterias Gram positivas.

Características del cultivo y morfología

El mejor crecimiento para la mayoría de las cepas estudiadas se observó en los medios SA1 y M65, en los que casi todas las bacterias crecían moderada o abundantemente. En los medios Bennett e YMA también presentaron crecimientos bastante buenos (excepto la cepa MIA 61 que no creció en este último), mientras que en el medio de avena, aunque la mayoría de las cepas crecieron, algunas lo hacían de forma escasa. Se concluye por lo tanto que las cepas aisladas son capaces de crecer en una amplia

variedad de medios, lo cual es razonable dado el complejo metabolismo de estas actinobacterias, que les permite emplear numerosos sustratos para su desarrollo.

Generalmente, las colonias presentaban colores anaranjados, que se iban oscureciendo con el paso del tiempo, coincidiendo con el comienzo de la esporulación, hasta adquirir finalmente tonalidades marrones y negras (Figura 63). De forma menos frecuente se obtuvieron colonias de color beige, verde oliva, verde amarillento, gris y morado. Gran parte de los cultivos crecían firmemente adheridos al agar, y su textura era irregular y rugosa, formando gran cantidad de pliegues. Todas estas características son bastante normales dentro del género *Micromonospora*.

La mayoría de las cepas estudiadas no produjeron micelio aéreo, lo cual es una de las características generales del género *Micromonospora*. Sin embargo, las cepas MIG 03 y MIG 04 producían micelio aéreo en medio de avena y la cepa MIG 09 en medio YMA. Este aspecto también coincide con la identificación de estas cepas en los géneros *Microbispora* y *Actinomadura* respectivamente.

Figura 63.- Evolución de los cultivos de *Micromonospora*.

Las imágenes muestran tres colonias de diferentes edades de *Micromonospora*. En la primera de ellas se observa una clara tonalidad naranja, propia de un cultivo joven de 7 días. En la segunda comienzan a aparecer manchas oscuras, correspondiente a un cultivo de 14 días. La última es un cultivo de 21 días, en el que la esporulación ha cubierto la colonia de un color negro intenso.

La producción de pigmentos difundibles en el medio se observó de forma muy esporádica, siendo más frecuente en los medios SA1 y Bennett (con cinco cepas en cada uno), seguidos por el medio de avena (con cuatro cepas). En los medio YMA y M65 solo tres y dos cepas respectivamente fueron capaces de producir pigmentos difundibles.

Los resultados obtenidos tras 21 días de incubación para el crecimiento en distintos medios y producción de pigmentos en los mismos se muestran en las Tablas 11, 12, 13, 14, 15 y 16.

Tablas 11 y 12.- Resultados de las pruebas de crecimiento de las cepas MIG 01 a MIG 21 y MIA 01 a MIA 12.

	Cepa Medio	MIG 01	MIG 02	MIG 03	MIG 04	MIG 05	MIG 06	MIG 07	MIG 08	MIG 09	MIG 10	MIG 11	MIG 12	MIG 13	MIG 14	MIG 15	MIG 16
Crecimiento	SA1	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3
	Bennett	3	3	3	3	3	3	1	3	3	1	3	3	3	3	3	3
	Avena	2	2	2	2	3	2	2	2	2	0	1	1	1	2	2	1
	YMA	3	2	3	3	3	3	3	2	3	2	3	3	2	1	3	3
Color micelio sustrato	SA1	mo	ng	m	m	ng	m	nc	b	mc	nc	mc	mc	ng	nc	ng	rc
	M65	ng	ng	mc	m	ng	mc	nc	b	mc	nc	mc	m	ng	nc	ng	nc
	Bennett	nc	rc	m	m	ng	n	nc	b	b	nc	mo	mc	ng	gr	ng	mc
	Avena	rc	b	b	b	ni	n	nc	b	b	-	nc	b	b	b	b	b
	YMA	ng	mo	m	ng	nc	m	nc	gr	mo	mc	m	vo	b	vo	ng	nc
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	vo	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	Cepa Medio	MIG 17	MIG 18	MIG 19	MIG 20	MIG 21	MIA 01	MIA 03	MIA 04	MIA 05	MIA 06	MIA 07	MIA 08	MIA 09	MIA 10	MIA 11	MIA 12
Crecimiento	SA1	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bennett	3	2	2	3	3	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Avena	2	3	2	2	2	1	1	3	3	2	3	2	3	2	2	2
	YMA	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Color micelio sustrato	SA1	nc	nc	nc	nc	nc	m	nc	ng	m	m	b	m	n	m	n	n
	M65	nc	ni	nc	nc	n	ng	n	ng	mo	m	b	m	nc	n	nc	n
	Bennett	b	nc	nc	n	n	m	b	m	mo	m	mc	m	n	mo	n	n
	Avena	nc	n	n	n	n	r	r	mo	nc	nc	n	n	n	n	n	n
	YMA	nc	nc	nc	n	co	ng	ng	ng	m	mo	mc	no	nc	no	n	n
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	n	n
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	m	n	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	nc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

b: beige; bl: blanco; co: cobre; gr: gris; m: marrón; mc: marrón claro; md: morado; mo: marrón oscuro; n: naranja; nc: naranja claro; ng: negro; ni: naranja intenso; r: rojo; rc: rojo claro; va: verde amarillento; vo: verde oliva.

3: crecimiento abundante; 2: crecimiento moderado; 1: crecimiento escaso; -: sin crecimiento

Tablas 13 y 14.- Resultados de las pruebas de crecimiento de las cepas MIA 13 a MIA 50.

	Cepa Medio	MIA 13	MIA 14	MIA 15	MIA 16	MIA 17	MIA 19	MIA 20	MIA 21	MIA 22	MIA 23	MIA 24	MIA 25	MIA 26	MIA 27	MIA 28	MIA 29
Crecimiento	SA1	2	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bennett	2	3	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
	Avena	3	3	2	2	2	3	2	2	1	1	2	3	3	3	2	2
	YMA	2	2	2	2	2	2	1	3	3	3	3	3	3	3	2	2
Color micelio sustrato	SA1	b	n	m	nc	nc	n	nc	n	n	nc	nc	ng	ng	n	n	nc
	M65	b	n	mo	nc	nc	n	n	n	ni	nc	nc	ng	ng	n	n	nc
	Bennett	bl	mc	n	nc	nc	n	nc	n	n	nc	ng	m	m	n	nc	nc
	Avena	n	n	n	n	n	n	nc	m	n	b	n	mo	mo	n	n	nc
	YMA	m	m	m	b	n	ng	b	mo	mo	m	ng	mo	m	nc	nc	mc
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-

	Cepa Medio	MIA 30	MIA 31	MIA 32	MIA 33	MIA 34	MIA 35	MIA 38	MIA 39	MIA 41	MIA 42	MIA 43	MIA 46	MIA 47	MIA 48	MIA 49	MIA 50
Crecimiento	SA1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bennett	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1
	Avena	2	2	3	1	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
	YMA	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2
Color micelio sustrato	SA1	nc	nc	mc	n	m	mo	mo	mc	ng	mc	mc	mo	m	n	ng	nc
	M65	n	nc	m	ng	m	mo	mo	m	mo	mc	mc	mo	m	nc	mo	n
	Bennett	n	nc	m	n	m	mo	ng	b	mo	ng	ng	m	m	nc	ng	b
	Avena	n	n	m	n	n	n	n	n	n	b	b	r	n	n	ng	n
	YMA	nc	n	mo	n	mo	mo	mo	m	mo	nc	vo	m	mo	n	ng	mc
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

b: beige; bl: blanco; co: cobre; gr: gris; m: marrón; mc: marrón claro; md: morado; mo: marrón oscuro; n: naranja; nc: naranja claro; ng: negro; ni: naranja intenso; r: rojo; rc: rojo claro; va: verde amarillento; vo: verde oliva-
3: crecimiento abundante; 2: crecimiento moderado; 1: crecimiento escaso; -: sin crecimiento

Tablas 15 y 16.- Resultados de las pruebas de crecimiento de las cepas MIA 52 a MIA 74, y las cepas tipo de algunas de las especies más próximas.

	Cepa Medio	MIA 52	MIA 53	MIA 54	MIA 55	MIA 56	MIA 57	MIA 58	MIA 59	MIA 60	MIA 61	MIA 62	MIA 63	MIA 64	MIA 65	MIA 66	MIA 67	MIA 68
Crecimiento	SA1	2	2	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bennett	1	2	2	2	3	2	3	3	1	3	3	3	3	2	2	3	3
	Avena	2	2	2	3	3	2	3	3	0	3	3	2	2	2	1	3	3
	YMA	2	2	2	3	3	2	3	3	1	0	3	3	2	2	2	1	3
Color micelio sustrato	SA1	b	b	b	ng	rc	nc	ng	n	md	n	mc	n	vo	nc	ng	n	mo
	M65	b	nc	b	ng	nc	nc	ng	ni	md	n	mc	m	vo	ng	mo	n	mo
	Bennett	nc	b	nc	nc	rc	b	mc	n	b	m	mc	n	m	n	n	n	m
	Avena	nc	n	n	nc	nc	n	va	n	-	n	n	nc	vo	n	n	nc	mo
	YMA	b	b	b	mo	m	mc	mc	n	md	m	n	nc	m	nc	mc	nc	mo
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m	-	-	-	-

	Cepa Medio	MIA 69	MIA 70	MIA 71	MIA 72	MIA 73	MIA 74	<i>M. coriariae</i>	<i>M. saelicesensis</i>	<i>M. lupini</i>	<i>M. endolithica</i>	<i>M. eburnea</i>	<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. echinospora</i>	<i>M. chersina</i>	<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. citrea</i>
Crecimiento	SA1	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3
	M65	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Bennett	3	3	3	2	2	1	2	2	3	1	3	3	3	3	3	3
	Avena	2	3	2	1	2	3	2	3	3	1	2	2	2	3	3	2
	YMA	3	3	2	2	3	3	2	3	2	3	2	1	3	2	3	3
Color micelio sustrato	SA1	ng	nc	n	m	b	nc	nc	nc	nc	mc	gr	nc	ng	ng	ng	mo
	M65	mo	n	n	n	nc	nc	n	rc	nc	m	ng	nc	ng	ng	vo	m
	Bennett	m	nc	n	n	b	nc	nc	nc	nc	m	ng	nc	md	ng	gr	n
	Avena	n	n	nc	n	b	n	n	m	nc	b	b	nc	b	n	vo	n
	YMA	mo	nc	n	n	n	n	n	ng	nc	m	b	b	nc	m	vo	mo
Pigmento difundible	SA1	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	md	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	md	-	-	-
	Bennett	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	m
	Avena	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

b: beige; bl: blanco; co: cobre; gr: gris; m: marrón; mc: marrón claro; md: morado; mo: marrón oscuro; n: naranja; nc: naranja claro; ng: negro; ni: naranja intenso; r: rojo; rc: rojo claro; va: verde amarillento; vo: verde oliva.

3: crecimiento abundante; 2: crecimiento moderado; 1: crecimiento escaso; -: sin crecimiento

Utilización de fuentes de carbono

La utilización de un total de 28 fuentes de carbono diferentes fue evaluada siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos tras 21 días de incubación se muestran en las Tablas 18, 19 y 20.

La glucosa fue la única molécula que pudo ser empleada por todas las bacterias analizadas como fuente de carbono. La mayoría de las cepas (por encima del 60%) también pudieron utilizar arabinosa, arginina, celobiosa, histidina, lisina, maltosa, manosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa, serina y xilosa. Sin embargo, muy pocas de las cepas aisladas (menos del 40%) pudieron emplear melecitosa, sorbitol, sorbosa, tirosina y xilitol como fuente de carbono.

En la Tabla 17 se muestra el porcentaje de cepas con resultado positivo para cada fuente de carbono estudiada, diferenciando las cepas MIA (aisladas de *L. angustifolius*) de las cepas MIG (aisladas de *L. gredensis*). En general no se observaron diferencias significativas entre ambos tipos de bacterias, presentando resultados muy similares. Las mayores diferencias se presentaron para el almidón y la arabinosa, notablemente más empleadas por las cepas MIA, y para la serina, más utilizada por las cepas MIG, con valores en torno al 20% de diferencia en los tres casos.

Tabla 17.- Resultados positivos porcentuales de las pruebas de utilización de fuentes de carbono.

	<i>Lupinus angustifolius</i>	<i>Lupinus gredensis</i>		<i>Lupinus angustifolius</i>	<i>Lupinus gredensis</i>
Alanina	79%	67%	Melibiosa	62%	48%
Almidón	62%	43%	Prolina	41%	43%
Arabinosa	65%	48%	Rafinosa	61%	57%
Arginina	98%	100%	Ramnosa	41%	52%
Celobiosa	71%	57%	Sacarosa	61%	67%
Fructosa	65%	52%	Salicina	42%	57%
Galactosa	53%	52%	Serina	62%	81%
Gluconato Na	55%	52%	Sorbitol	33%	29%
Glucosa	100%	100%	Sorbosa	9%	19%
Histidina	100%	90%	Tirosina	32%	43%
Lisina	95%	86%	Trehalosa	59%	57%
Maltosa	61%	62%	Valina	48%	43%
Manosa	59%	62%	Xilitol	26%	38%
Melecitosa	33%	43%	Xilosa	64%	67%

Tabla 18.- Resultados de las pruebas de utilización de diferentes fuentes de carbono (parte 1).

	MIG 01	MIG 02	MIG 03	MIG 04	MIG 05	MIG 06	MIG 07	MIG 08	MIG 09	MIG 10	MIG 11	MIG 12	MIG 13	MIG 14	MIG 15	MIG 16	MIG 17	MIG 18	MIG 19	MIG 20	MIG 21	MIA 01	MIA 03	MIA 04	MIA 05	MIA 06	MIA 07	MIA 08	MIA 09	MIA 10	MIA 11	MIA 12	MIA 13	
Alanina	-	-	w	w	+	+	-	w	+	-	-	-	-	+	w	w	+	+	w	+	w	w	-	+	w	-	-	+	w	+	+	+		
Almidón	-	-	+	+	+	w	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	w	+	-	-	-	+	-	-	w	-	+	-	w	-	w	
Arabinosa	w	-	+	+	+	w	-	w	-	-	-	-	-	-	-	w	-	+	+	+	-	w	-	+	-	-	w	-	+	w	w	w	w	
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
Celobiosa	-	-	+	+	+	+	-	w	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	w	-	-	+	w	w	-	-	+	-	+	+	+	
Fructosa	w	-	+	+	+	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	+	-	+	+	+	w	-	-	+	-	w	-	-	+	w	w	w	w	
Galactosa	w	w	+	+	+	+	-	-	-	-	-	w	-	-	-	w	-	+	w	+	-	w	-	+	-	w	-	-	+	-	-	-	-	
Gluconato Na	w	-	w	w	+	+	+	+	-	-	w	w	-	-	-	w	-	+	-	-	-	+	-	-	w	+	+	-	-	w	w	+	-	
Glucosa	w	w	+	+	+	+	w	w	+	w	+	w	w	w	+	+	+	+	w	+	w	w	w	w	+	+	w	w	w	+	+	w	w	
Histidina	+	+	-	-	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	w	+	w	+	w	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	w	
Lisina	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	
Maltosa	-	w	w	w	+	+	w	w	w	-	w	w	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	w	+	-	-	w	-	+	-	w	w	w	
Manosa	-	w	+	+	+	+	+	w	+	w	-	-	-	-	-	w	-	+	+	+	-	w	-	+	w	w	-	-	+	-	w	w	w	
Melecitosa	w	w	-	-	w	w	w	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	w	w	-	-	-	w	w	w	-	-	-	-	-	-	
Melibiosa	-	-	-	-	+	w	w	-	-	w	-	w	-	w	-	w	-	+	w	+	-	w	w	w	-	-	-	-	-	+	w	w	+	w
Prolina	-	-	w	w	+	+	-	-	+	w	w	-	-	-	-	w	-	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	w	-	-	-	w	w	-
Rafinosa	-	-	+	+	+	+	+	w	w	-	-	-	-	-	-	w	w	+	w	+	-	-	-	w	-	-	w	-	+	-	+	+	+	
Ramnosa	-	w	-	-	-	w	w	w	-	w	-	-	-	w	-	w	-	+	+	+	w	-	w	-	-	w	w	-	-	-	-	w	w	-
Sacarosa	-	w	+	+	+	+	w	-	w	-	w	-	-	-	w	w	w	+	w	+	-	-	-	+	-	-	w	-	+	w	w	w	w	
Salicina	-	-	+	+	+	-	w	w	-	-	-	-	w	w	-	+	w	+	w	+	-	-	w	+	w	w	w	w	w	w	w	-	-	-
Serina	w	w	-	-	+	w	w	w	+	w	-	w	+	w	-	+	w	+	w	w	w	w	w	-	-	w	w	w	-	-	-	-	-	
Sorbitol	-	-	w	w	-	+	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	-	w	-	-	-	w	-	w	w	w	-	-	-	w	-	-	-	
Sorbosa	-	-	-	-	-	w	-	-	-	w	-	-	-	-	-	+	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	w	-	-	-	-	
Tirosina	-	-	-	-	+	+	-	w	+	w	-	w	-	-	-	-	-	w	w	-	w	-	-	+	-	-	-	-	w	-	-	-	-	
Trehalosa	-	-	+	+	+	+	w	w	+	w	-	w	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	w	-	-	-	+	w	+	+	+	
Valina	-	-	-	-	w	w	-	-	w	w	-	w	w	-	-	+	-	w	w	-	-	-	-	w	w	w	w	-	w	-	-	-	-	
Xilosa	w	w	w	w	+	w	+	-	-	-	-	w	-	-	-	w	w	+	+	+	w	w	w	+	w	-	w	w	+	w	w	w	+	
Xylitol	-	w	-	-	-	w	+	-	-	w	-	-	-	w	-	w	-	w	-	-	w	-	-	w	-	-	-	-	-	w	w	-	-	

+: positivo; -: negativo; w: débil

Tabla 19.- Resultados de las pruebas de utilización de diferentes fuentes de carbono (parte 2).

	MIA 14	MIA 15	MIA 16	MIA 17	MIA 19	MIA 20	MIA 21	MIA 22	MIA 23	MIA 24	MIA 25	MIA 26	MIA 27	MIA 28	MIA 29	MIA 30	MIA 31	MIA 32	MIA 33	MIA 34	MIA 35	MIA 38	MIA 39	MIA 41	MIA 42	MIA 43	MIA 46	MIA 47	MIA 48	MIA 49	MIA 50	MIA 52	MIA 53	
Alanina	+	w	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-	w	-	w	-	-	w	+	+	+	+	+	
Almidón	+	-	w	w	+	w	+	-	-	-	+	+	w	+	+	+	w	+	w	+	w	-	-	-	+	w	-	-	w	w	w	-	+	
Arabinosa	+	-	w	w	+	w	+	-	-	-	+	+	-	w	w	+	w	+	w	+	w	w	w	-	w	-	-	-	+	+	-	-	w	
Arginina	+	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	w	w	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	
Celobiosa	+	w	+	w	+	w	+	-	-	-	+	w	w	w	+	+	+	+	+	+	w	+	w	w	+	+	-	-	w	+	w	-	-	
Fructosa	+	-	w	w	w	w	+	w	-	-	+	+	-	w	w	w	w	+	w	+	-	-	w	w	w	w	-	-	w	w	-	-	w	
Galactosa	+	-	-	w	w	w	+	w	-	-	+	+	-	w	+	+	w	+	-	w	-	-	-	-	-	+	+	-	-	w	w	-	-	w
Gluconato Na	+	-	+	-	w	+	+	+	w	-	-	+	w	w	w	+	+	+	-	+	+	+	-	w	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Glucosa	+	w	+	w	+	+	+	+	w	w	+	+	w	w	+	+	+	+	w	+	w	w	+	w	+	w	w	w	+	+	w	w	+	
Histidina	w	+	+	+	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lisina	+	+	+	+	-	w	+	+	+	+	+	+	+	w	-	w	+	w	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	
Maltosa	+	-	-	+	+	w	+	-	-	-	+	+	w	w	+	+	+	+	w	w	w	-	-	-	w	w	-	w	w	+	-	-	w	
Manosa	+	-	w	w	w	w	w	-	-	-	+	+	-	w	+	+	w	+	-	+	-	-	-	-	-	+	w	-	-	w	+	-	-	w
Melecitosa	w	-	-	-	-	-	+	-	-	-	w	w	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	w	-	w	-	-	w	w	-	w	-	
Melibiosa	+	-	w	-	w	-	w	-	-	-	+	+	w	+	+	+	+	w	-	w	-	-	-	-	w	-	-	-	w	+	-	-	w	
Prolina	-	-	w	+	-	w	+	w	-	-	w	w	w	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	w	w	-	-	+	w	w	w	-
Rafinosa	+	-	w	w	+	-	w	-	-	-	w	+	+	+	+	+	+	+	-	+	w	-	w	-	+	+	-	-	+	+	w	-	-	
Ramnosa	w	-	w	w	-	w	-	-	-	-	w	w	w	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	w	w	w	-	-	-	+	w	-	w
Sacarosa	+	-	w	-	w	-	w	-	w	-	+	+	w	w	+	+	+	+	w	+	-	+	-	-	+	w	-	-	+	+	-	-	w	
Salicina	-	-	-	w	-	-	-	-	w	-	w	w	w	-	-	-	w	w	-	w	-	w	w	w	w	-	-	-	-	w	-	-	-	
Serina	-	w	-	w	-	w	-	w	-	w	+	+	+	w	w	w	+	w	+	+	+	w	w	w	w	-	w	-	-	+	w	-	w	w
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	w	w	-	-	-	w	w	-	w	
Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-	
Tirosina	-	-	-	-	-	w	w	-	-	-	+	+	-	-	-	w	w	-	-	w	w	-	-	-	w	w	-	-	w	w	-	w	-	
Trehalosa	+	w	-	w	+	+	+	-	-	-	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	-	w	w	-	+	+	-	-	w	+	-	-	-	
Valina	-	-	w	+	-	-	+	w	-	-	w	w	w	-	-	-	w	-	w	w	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	w	w	w	
Xilosa	+	-	w	w	+	w	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	w	+	+	+	-	-	w	-	+	+	-	-	w	+	-	-	w	
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	w	-	-	w	w	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	w	-	-	-	w	-	-	-	-	-	

+: positivo; -: negativo; w: débil

Tabla 20.- Resultados de las pruebas de utilización de diferentes fuentes de carbono (parte 3).

	M. citrea	M. olivasterospora	M. chersina	M. echinospora	M. mutsumotense	M. eburnea	M. endolithica	M. lupini IV.	saeticensis	M. coriariae	MIA 74	MIA 73	MIA 72	MIA 71	MIA 70	MIA 69	MIA 68	MIA 67	MIA 66	MIA 65	MIA 64	MIA 63	MIA 62	MIA 61	MIA 60	MIA 59	MIA 58	MIA 57	MIA 56	MIA 55	MIA 54
Alanina	+	+	+	+	W	-	-	+	W	+	-	+	W	+	+	+	+	W	W	W	-	+	+	-	+	W	W	+	-	+	
Almidón	W	-	W	-	-	W	-	+	W	W	W	W	-	-	+	-	+	W	W	W	-	W	-	+	-	W	W	W	-	W	
Arabinosa	W	-	+	-	-	+	W	+	W	W	-	+	-	W	+	W	+	W	W	W	W	+	-	+	-	W	-	-	-	W	
Arginina	+	+	+	W	W	W	+	+	+	+	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	W	+	W	+	+	+	+	+	
Celobiosa	+	W	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	W	-	+	-	+	W	W	-	W	+	W	+	+	+	W	W	-	+	
Fructosa	W	-	+	-	W	-	-	+	+	+	-	+	W	W	+	-	+	+	+	W	W	+	-	+	W	W	W	-	-	W	
Galactosa	-	W	+	-	-	-	-	+	W	-	-	-	W	W	+	-	+	W	W	W	-	W	+	+	W	W	W	-	-	W	
Gluconato Na	W	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	W	-	-	+	-	W	W	W	W	-	-	-	+	-	+	+	+	-	W	
Glucosa	W	W	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	+	W	+	W	+	+	+	+	W	
Histidina	+	W	+	W	+	W	+	+	+	+	W	W	+	+	+	W	+	+	+	+	W	W	+	+	W	W	W	+	-	+	
Lisina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	
Maltosa	-	W	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	W	W	W	-	W	-	+	-	+	-	-	+	W	W	
Manosa	W	-	-	-	-	W	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	W	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	W	
Melecitosa	W	-	-	W	-	-	-	W	+	-	-	W	-	-	W	W	-	-	-	-	W	-	-	W	-	-	-	-	-	-	
Melibiosa	W	-	W	W	W	+	-	+	W	+	W	W	W	+	+	-	+	W	+	W	W	+	W	+	+	+	-	+	-	W	
Prolina	-	-	-	-	W	W	-	-	W	W	-	-	W	-	W	W	-	W	-	W	-	W	-	W	-	W	-	W	W	-	
Rafinosa	-	-	-	+	W	+	-	+	+	+	+	-	W	W	+	-	+	W	W	W	-	W	+	+	+	+	-	-	W	-	
Ramnosa	W	-	W	-	W	W	W	-	-	-	-	W	-	W	-	-	-	-	W	-	W	-	-	+	-	W	-	-	-	W	
Sacarosa	-	-	-	W	W	W	-	+	-	+	W	W	-	W	+	-	+	W	W	-	W	+	W	+	W	W	-	-	+	+	-
Salicina	-	-	-	W	-	-	W	W	-	-	+	W	-	W	W	-	W	W	W	-	W	-	W	-	+	-	W	-	+	-	-
Serina	-	-	W	W	+	+	-	-	W	-	W	W	+	W	+	W	+	W	+	+	W	-	W	-	W	-	-	-	W	+	W
Sorbitol	W	-	-	W	+	W	-	-	-	W	W	W	-	-	-	-	-	-	-	-	W	W	W	W	-	-	-	W	W	-	
Sorbosa	W	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tirosina	-	-	-	+	W	-	-	-	W	-	W	-	-	W	-	-	W	W	-	W	-	W	-	W	-	-	-	-	W	-	
Trehalosa	-	-	-	+	-	W	-	+	W	+	+	-	-	W	+	-	+	W	W	-	W	+	W	-	-	+	-	+	-	-	
Valina	W	W	-	W	-	+	-	-	W	-	W	-	W	-	W	W	-	W	W	W	-	W	W	W	-	W	-	-	W	W	
Xilosa	-	-	+	-	W	W	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	W	W	-	W	+	W	W	W	W	-	-	+	+	-
Xylitol	W	-	-	-	-	-	-	-	W	-	W	-	W	W	-	W	-	W	W	W	-	W	W	W	-	-	-	W	-	-	

+: positivo; -: negativo; w: débil

Los resultados obtenidos muestran que las cepas aisladas son capaces de emplear un amplio rango de hidratos de carbono y aminoácidos como fuentes de carbono. El hecho de poder emplear diversas moléculas como nutrientes permite a estas bacterias crecer en muchos tipos de ambientes, lo cuál explica la amplia distribución ecológica de las cepas del género *Micromonospora*, que han sido aisladas de fuentes muy diversas.

Pruebas de degradación e hidrólisis de sustratos

El análisis de la respuesta de las cepas aisladas frente a distintos tipos de sustratos da una idea del tipo de metabolismo bacteriano de las mismas. En este trabajo se evaluó la degradación de ocho sustratos, además de la producción de la enzima catalasa y oxidasa. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 22, 23, 24, 25, 26 y 27.

La gran mayoría de las cepas, por encima del 80%, presentaron un metabolismo muy activo frente a casi todos los sustratos, como almidón, arbutina, caseína, esculina y gelatina. Sin embargo, menos de la mitad de las bacterias estudiadas pudieron degradar el tween 20 y sólo dos cepas (MIA 07 y MIA 27) pudieron hidrolizar la urea. La producción de catalasa y oxidasa fue también positiva para casi todas las cepas.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas de degradación y producción enzimática muestran que las cepas de tipo actinobacteria aisladas de nódulos de leguminosas presentan un metabolismo muy activo, siguiendo la misma línea que los resultados recogidos en la utilización de las diferentes fuentes de carbono estudiadas.

La Tabla 21 muestra el porcentaje de cepas con resultado positivo para cada prueba analizada, diferenciando las cepas aisladas de *L. angustifolius* de las cepas aisladas de *L. gredensis*. Para la mayoría de las pruebas los resultados fueron muy similares para ambos tipos de aislados, presentando diferencias menores del 10%. Sin embargo, las cepas aisladas de *L. angustifolius* fueron significativamente más activas en la producción de amilasas y catalasa.

Tabla 21.- Resultados positivos porcentuales de las pruebas de utilización de degradación e hidrólisis.

	<i>Lupinus angustifolius</i>	<i>Lupinus gredensis</i>
Almidón	91%	76%
Gelatina	92%	95%
Arbutina	95%	81%
Esculina	100%	100%
Caseína	98%	90%
Tween 20	38%	43%
Tween 80	98%	90%
Urea	3%	0%
Catalasa	98%	76%
Oxidasa	94%	95%

Uno de los resultados más interesantes fue el obtenido en la degradación de Tween 80, que al ser comparada con trabajos previos se observa una alta variabilidad, en función de la zona de aislamiento. Por ejemplo, en los estudios de caracterización de bacterias del género *Micromonospora* aisladas de *L. angustifolius* en Plasencia (Extremadura), sólo dos de las 61 cepas aisladas fueron capaces de degradar el sustrato Tween 80 (Rodríguez, 2008). Los resultados presentados para esta misma prueba por Carro (2009) en la caracterización de cepas de *Micromonospora* aisladas de la rizosfera y nódulos de *Pisum sativum*, muestran que las bacterias aisladas, presentan altos porcentajes de degradación (por encima del 75%) en las cepas obtenidas de muestras recogidas en Cañizal (Zamora) y valores muy bajos (menos del 5%) para las recogidas en Salamanca. Aunque la degradación de Tween 80 no parece tener una clara correspondencia con la zona de aislamiento, los resultados muestran una significativa relación entre el lugar de muestreo y los resultados obtenidos en esta prueba.

Tablas 22, 23 y 24.- Resultados de las pruebas de degradación e hidrólisis (parte 1).

	MIG 01	MIG 02	MIG 03	MIG 04	MIG 05	MIG 06	MIG 07	MIG 08	MIG 09	MIG 10	MIG 11	MIG 12	MIG 13	MIG 14	MIG 15	MIG 16
Almidón	+	+	-	W	+	+	+	+	-	+	+	+	W	-	+	-
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arbutina	W	-	+	+	W	+	+	W	W	-	W	+	W	+	-	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	W	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Tween 20	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	W	+	-	-	-
Tween 80	+	+	-	-	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+

	MIG 17	MIG 18	MIG 19	MIG 20	MIG 21	MIA 01	MIA 03	MIA 04	MIA 05	MIA 06	MIA 07	MIA 08	MIA 09	MIA 10	MIA 11	MIA 12
Almidón	+	W	W	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	-	+	+	-	W	W	+	W	+	W	+	W
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	-	+	-	-	-	W	-	-	-	-	+	-	-	W	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Catalasa	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

	MIA 13	MIA 14	MIA 15	MIA 16	MIA 17	MIA 19	MIA 20	MIA 21	MIA 22	MIA 23	MIA 24	MIA 25	MIA 26	MIA 27	MIA 28	MIA 29
Almidón	-	W	+	+	+	-	+	W	+	+	+	+	+	+	W	W
Gelatina	+	+	+	+	-	+	+	W	W	+	-	W	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	W	+	+	W	W	W	+	W	+	W
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	W	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo; w: débil

Tablas 25, 26 y 27.- Resultados de las pruebas de degradación e hidrólisis (parte 2).

	MIA 30	MIA 31	MIA 32	MIA 33	MIA 34	MIA 35	MIA 38	MIA 39	MIA 41	MIA 42	MIA 43	MIA 46	MIA 47	MIA 48	MIA 49	MIA 50	MIA 52
Almidón	-	+	-	W	W	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Arbutina	W	W	+	W	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	W	+	-	-	+	+	+	-	+	W	-	+	+	-	-	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

	MIA 53	MIA 54	MIA 55	MIA 56	MIA 57	MIA 58	MIA 59	MIA 60	MIA 61	MIA 62	MIA 63	MIA 64	MIA 65	MIA 66	MIA 67	MIA 68	MIA 69
Almidón	+	+	+	+	+	+	+	+	W	+	W	-	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	-	+	+	+	+	W	+	W	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	W	W	+	W	+	W	+	W	W	+	+	W	W	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	W
Caseína	+	+	+	+	+	W	+	+	+	W	W	+	+	+	+	+	W
Tween 20	-	-	+	+	-	-	-	-	W	+	-	-	-	+	-	+	W
Tween 80	+	+	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

	MIA 70	MIA 71	MIA 72	MIA 73	MIA 74	<i>M. corariae</i>	<i>M. saelicesensis</i>	<i>M. lupini</i>	<i>M. endolithica</i>	<i>M. eburnea</i>	<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. echinospora</i>	<i>M. chersina</i>	<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. citrea</i>
Almidón	W	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	W	+	+	+
Gelatina	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	-	+	+	W	W	+	W	+	W	+	W
Esculina	+	+	+	+	+	W	+	+	+	W	+	W	+	+	+
Caseína	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tween 20	-	-	+	+	-	W	W	-	-	-	+	-	+	-	-
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	+	+	+

+: positivo; -: negativo; w: débil; ND: no descrito

Pruebas de resistencia y tolerancia

Para completar la caracterización fenotípica de las bacterias de tipo *Micromonospora* aisladas en este trabajo, se llevaron a cabo pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, pH y salinidad. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas 31 y 32.

El estudio del rango de temperaturas entre las que las cepas aisladas son capaces de crecer se realizó cultivando los microorganismos a diferentes temperaturas, entre 4 y 44°C. La Tabla 28 muestra una tabla resumen de los resultados obtenidos, diferenciando las bacterias aisladas de las dos especies de lupinos estudiadas. Casi la totalidad de las cepas (por encima del 90%) fueron capaces de crecer entre 22°C y 37°C, presentando la mayoría un buen crecimiento dentro de este rango. Una cantidad significativa de las bacterias (por encima del 70%) fueron también capaces de crecer a 12°C y a 44°C, sin embargo, ninguna se desarrolló a 4°C. Se encontraron más actinobacterias aisladas de *L. angustifolius* que pudieron crecer a 12°C, en cambio, una mayor cantidad de cepas aisladas de *L. gredensis* fueron capaces de crecer a 44°C. En ambos casos las diferencias fueron pequeñas, en torno al 10%.

Se trata por tanto de bacterias mesófilas, con un rango más o menos amplio de temperaturas a las que pueden desarrollarse. Este resultado mantiene una adecuada correlación con la climatología de Salamanca, que presenta grandes oscilaciones de temperaturas entre las mínimas y máximas diarias, especialmente en primavera, época en la que se desarrollan las plantas de lupinos que estos microorganismos colonizan.

Tabla 28.- Resultados positivos porcentuales de las pruebas de temperatura.

	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. gredensis</i>
4°C	0%	0%
12°C	89%	81%
22°C	98%	100%
28°C	100%	100%
37°C	98%	95%
44°C	70%	81%

Las pruebas de crecimiento en medios tamponados con diferentes pHs mostraron que las actinobacterias estudiadas crecían muy bien a pH neutro o ligeramente alcalino, obteniendo que prácticamente el 100% de los aislados crecieron a pH 7 y 8, mientras que el porcentaje bajó ligeramente (al 85%) en las cepas MIA, y moderadamente (al 57%) en cepas MIG, al inocularlas en medio con pH 9. Las cepas aisladas presentaron muy baja tolerancia a entornos ácidos, en los cuales ninguna fue capaz de desarrollarse a pH 4,5 y muy pocas a pH 5,5, siendo esta última cifra sensiblemente más elevada en el caso de los aislados de *L. gredensis* (el 19% de las bacterias crecieron a pH 5,5) que en el de los aislados de *L. angustifolius* (solo creció el 3%, concretamente las cepas MIA 29 y MIA 58). Dado que el pH del suelo en el que fueron recogidas las plantas osciló entre 7,3 y 8,0, los resultados obtenidos en este estudio determinan que se encuentra dentro de los valores de crecimiento óptimos de las actinobacterias aisladas. Del mismo modo, el pH dentro del citoplasma de las células vegetales de la raíz oscila entre 7,0 y 7,6 (Kurkdjian & Guern, 1989), por lo que queda igualmente dentro del rango de tolerancia de las cepas estudiadas.

La cepa que presentó un rango más estrecho de crecimiento a diferentes pH fue la MIA 52, que sólo fue capaz de crecer a pH neutro, siendo una excepción dentro de las actinobacterias estudiadas.

Los resultados porcentuales de los casos con crecimiento positivo en los diferentes medios tras 21 días de incubación se muestran en la Tabla 29, diferenciando la planta de origen de los aislados.

Tabla 29.- Resultados positivos porcentuales de las pruebas de pH.

	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. gredensis</i>
4,5	0%	0%
5,5	3%	19%
7	100%	100%
8	98%	100%
9	85%	57%

Para analizar la tolerancia a la salinidad de las actinobacterias estudiadas, se emplearon diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Los resultados muestran una buena tolerancia para concentraciones del 1% y del 3%, en las que el 95% y el 78%, respectivamente, de las cepas pudieron crecer. En cambio, con una concentración del 5% de cloruro de sodio en el medio, el porcentaje de bacterias que fueron capaces de desarrollarse bajó de forma drástica, obteniendo valores de alrededor al 20%. En este caso las cepas aisladas de *L. angustifolius* presentaron un porcentaje de crecimiento ligeramente más alto que el de las cepas aisladas de *L. gredensis*. Ninguna de las bacterias aisladas creció a concentraciones superiores al 5%.

Un caso excepcional en el estudio fueron las cepas MIG 08, MIA 52, MIA 69 y MIA 74 que se mostraron especialmente sensibles a entornos salinos, siendo incapaces de crecer incluso a una concentración del 1% de cloruro de sodio.

Los resultados porcentuales a los 21 días de incubación se muestran en la Tabla 30, diferenciando la planta de origen de los aislados.

Tabla 30.- Resultados porcentuales de las pruebas de salinidad.

	<i>L. angustifolius</i>	<i>L. gredensis</i>
1%	95%	95%
3%	79%	76%
5%	26%	19%
7%	0%	0%

Tabla 31.- Resultados de las pruebas de temperatura, pH y salinidad (parte 1).

	TEMPERATURA						pH					NaCl			
	4°C	12°C	22°C	28°C	37°C	44°C	4,5	5,5	7	8	9	1%	3%	5%	7%
MIG 01	-	+	+	+	+	W	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIG 02	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIG 03	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-
MIG 04	-	+	+	+	+	+	-	W	+	+	-	+	-	-	-
MIG 05	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
MIG 06	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIG 07	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIG 08	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MIG 09	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	W	W	-
MIG 10	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIG 11	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIG 12	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIG 13	-	W	+	+	+	+	-	-	+	+	W	+	+	-	-
MIG 14	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	W	-	-
MIG 15	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	W	-	-	-
MIG 16	-	-	+	+	+	+	-	-	+	W	-	+	-	-	-
MIG 17	-	W	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
MIG 18	-	W	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	W	-	-
MIG 19	-	+	+	+	W	-	-	-	+	+	W	+	W	-	-
MIG 20	-	+	+	+	+	W	-	-	+	+	W	+	W	-	-
MIG 21	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	W	+	W	-	-
MIA 01	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 03	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 04	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 05	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 06	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 07	-	W	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 08	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 09	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-
MIA 10	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 11	-	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 12	-	+	+	+	W	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 13	-	+	+	+	+	W	-	-	+	+	+	+	-	-	-
MIA 14	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
MIA 15	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 16	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 17	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 19	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	W	-	-
MIA 20	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	W	-	-
MIA 21	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	W	-	-
MIA 22	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 23	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 24	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 25	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 26	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 27	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 28	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 29	-	+	+	+	+	+	-	W	+	+	+	+	W	-	-
MIA 30	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 31	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 32	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 33	-	+	+	+	W	-	-	-	+	+	W	+	W	-	-

+: positivo; -: negativo; w: débil

Tabla 32.- Resultados de las pruebas de temperatura, pH y salinidad (parte 2).

	TEMPERATURA						pH					NaCl			
	4°C	12°C	22°C	28°C	37°C	44°C	4,5	5,5	7	8	9	1%	3%	5%	7%
MIA 34	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 35	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 38	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 39	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	W	-
MIA 41	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 42	-	-	+	+	+	W	-	-	+	+	-	+	-	-	-
MIA 43	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 46	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 47	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
MIA 48	-	+	+	+	W	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 49	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
MIA 50	-	W	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 52	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
MIA 53	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-
MIA 54	-	+	+	+	W	W	-	-	+	+	W	+	-	-	-
MIA 55	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 56	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 57	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 58	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	W	+	-
MIA 59	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	W	-	-
MIA 60	-	-	+	+	+	+	-	-	+	W	-	W	W	-	-
MIA 61	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-
MIA 62	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
MIA 63	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 64	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
MIA 65	-	W	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 66	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 67	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
MIA 68	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 69	-	-	W	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
MIA 70	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-
MIA 71	-	-	W	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
MIA 72	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 73	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
MIA 74	-	-	+	+	+	+	-	-	+	W	-	-	-	-	-
<i>M. coriariae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. saelicesensis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>M. lupini</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	W	-	-
<i>M. endolithica</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-
<i>M. eburnea</i>	-	W	+	+	+	+	-	W	+	+	+	+	W	-	-
<i>M. matsumotoense</i>	-	W	+	+	-	-	-	-	+	+	W	+	-	-	-
<i>M. echinospora</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>M. chersina</i>	-	W	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>M. olivasterospora</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	W	+	W	-	-
<i>M. citrea</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-

+: positivo; -: negativo; w: débil

ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA DE *Micromonospora*

La importancia evolutiva en el tamaño de los genomas bacterianos

El tamaño de los diferentes genomas bacterianos es un buen indicador de la complejidad metabólica de una determinada bacteria y de la evolución que ese grupo bacteriano ha llevado a cabo. Generalmente, los organismos adaptados a hábitats muy específicos y con una distribución muy localizada presentan un ciclo vital muy especializado, dando lugar al fenómeno de contracción genómica, por el cual el tamaño de sus genomas se ve reducido como consecuencia de su especialización (Mira *et al.*, 2001). Éste es un hecho frecuentemente descrito en patógenos obligados y simbioses estrictos. Por el contrario, las bacterias que presentan una distribución global y son capaces de adaptarse a una gran variedad de ambientes, tienden a poseer genomas de mayor tamaño, dado que necesitan disponer de un metabolismo complejo que les permita sobrevivir a diferentes condiciones. La actinobacteria con el genoma de menor tamaño conocido es el patógeno *Tropheryma whippelii*, causante de la enfermedad de Whipple, cuyo genoma tiene menos de 1 Mb (Raoult *et al.*, 2003). Por el contrario, existen genomas de actinobacterias que superan los 10 Mb, como es en caso de *Catenulispora acidiphila* (Copeland *et al.*, 2009).

En los tres genomas secuenciados de *Frankia* se puede apreciar un ejemplo de contracción genómica dentro del mismo género (Normand *et al.*, 2007). La cepa *Frankia* sp. CcI3 representa un grupo de hospedadores muy estrictos de plantas del género *Casuarina*, generalmente localizadas en Australia, existiendo una clara dependencia de su hospedador, dado que esta bacteria no ha podido ser detectada en zonas en las que sus plantas hospedadoras están ausentes. Las bacterias relacionadas con la cepa *Frankia alni* ACN14a presentan una distribución global, excepto Australia, con independencia de la existencia o no de las plantas con las que establecen simbiosis. La cepa *Frankia* sp. EAN1pec representa un grupo de bacterias que establecen simbiosis con plantas del género *Elaeagnus*, encontrándose en una distribución a nivel

mundial, independientemente de la presencia de las plantas hospedadoras, presentando la distribución más cosmopolita de las frankias conocidas. El tamaño de los genomas de estas tres bacterias presentó notables diferencias, siendo el de menor tamaño el de CcI3, con 5,4 Mb, seguido de ACN14a con 7,5 Mb, siendo la cepa EAN1pec la que presentó un mayor genoma, con más de 9 Mb, demostrando con ello que cuánto más especializada es una bacteria, el tamaño de su genoma tiende a reducirse.

Análisis del tamaño genómico de varias cepas de *Micromonospora*

En este trabajo se empleó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) para obtener una estimación del tamaño del genoma de las cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*. Las cepas seleccionadas fueron la MIA 10 y la MIA 32, ambas aisladas en este trabajo y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T, que había sido aislada de nódulos de *L. angustifolius* recogidos en Saelices (Salamanca) y es la cepa tipo de la especie más frecuentemente encontrada en nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas. La metodología utilizada ha sido ampliamente empleada para estimar el tamaño de diferentes genomas bacterianos, siendo los resultados obtenidos contrastados con otras técnicas similares, confirmando que permite obtener una buena aproximación del tamaño del genoma de cualquier organismo (Harsono *et al.*, 1993; Thong *et al.*, 1997).

Existen dos factores importantes para obtener una buena estimación del tamaño del genoma con esta técnica: la obtención de una buena cantidad de ADN cromosómico intacto y la selección de las enzimas de restricción a emplear. La extracción de ADN se llevó a cabo según se explica en la sección de Materiales y Métodos. En lo que respecta a la selección de las enzimas, es necesario trabajar con una baja frecuencia de corte, que permita obtener un número reducido de fragmentos de alto peso molecular, posibilitando una buena separación de los mismos. Para ello se realizó una primera prueba con un set de enzimas que presentasen un sitio de restricción con bajo contenido en G+C. De ellas se seleccionaron la seis que mejores resultados aportaron.

El tamaño de los genomas resultantes fue de 4,9 Mb en el caso de la cepa LUPAC 09^T; 5,0 Mb para la cepa MIA 10 y de 6,5 Mb para la cepa MIA 32, que fue la que presentó un genoma significativamente mayor (Figuras 64, 65 y 66). En cualquier caso, estos datos están dentro del tamaño medio de los genomas analizados de actinobacterias (Santos *et al.*, 2008). Los tamaños de los genomas de las tres cepas de *Micromonospora* que están siendo secuenciadas actualmente oscilan entre 6,5 Mb en el caso de *Micromonospora* sp. ATCC 39149 (una cepa con interés biotecnológico); las 6,9 Mb de la cepa *Micromonospora* sp. L5 (aislada de un nódulo de *Casuarina equisetifolia*) y 7,0 Mb para *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029^T (todos los valores han sido obtenidos de la base de datos NCBI). Según estos datos, los tamaños de los genomas de las cepas LUPAC 09^T y MIA 10 están por debajo de la media del género, mientras que el de la cepa MIA 32 se encuentra dentro de los valores normales; todo ello teniendo en cuenta que hay pocos valores con los que comparar estos resultados, por lo que la validez estadística de los mismos es escasa.

La cepa LUPAC 09^T es la cepa tipo de *Micromonospora saelicesensis* y, como se ha comentado anteriormente, es una de las especies que con mayor frecuencia se aíslan de nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas (Fernández-Molinero, 2005; Cerda, 2008; Rodríguez, 2008; Carro, 2009), lo cuál también ha quedado confirmado en este trabajo. Curiosamente, la cepa MIA 32, que está muy relacionada con esta especie, presenta un genoma un 30% mayor que el de la cepa LUPAC 09^T. Este dato podría mostrar una mayor especialización de la especie *Micromonospora saelicesensis* en su interacción con las leguminosas, pudiendo haber sufrido un fenómeno de contracción genómica.

Debe tenerse en cuenta que los resultados obtenidos de la medición del tamaño de los genomas por PFGE es una estimación aproximada. Por esta razón, las estimaciones se llevaron a cabo con seis enzimas de restricción diferentes, obteniendo los seis perfiles de digestión correspondientes y realizando una media entre los valores obtenidos de todos ellos, de forma que el dato final pudiera tener una mayor solidez. Sin embargo, en algunas ocasiones, los valores obtenidos para una misma cepa variaban notablemente con el empleo de unas u otras enzimas. De este modo, hubo una diferencia, entre el valor máximo y mínimo, de 1,18 Mb en el caso de la cepa MIA 10; de 2,26 Mb en la MIA 32 y de 1,93 Mb para la cepa LUPAC 09^T. Esto puede deberse a la existencia de

numerosos fragmentos menores de 50 Kb que no pueden ser contabilizados y dan una subestimación del tamaño genómico, de la digestión parcial de algunos fragmentos que llevan a sobreestimar el valor real o la falta de resolución de la técnica para distinguir varios fragmentos del mismo tamaño, que puede llevar tanto a una sobreestimación como a una subestimación del tamaño real del genoma estudiado. Como se ha señalado anteriormente, existen estudios sobre esta técnica que demuestran que estos efectos tienden a compensarse al emplear varias enzimas, obteniendo resultados mejores cuanto mayor sea el número de enzimas empleadas.

Micromonospora MIA 10 (5,0 Mb)

Figura 64.- Estimación del tamaño del genoma de *Micromonospora* sp. MIA 10.

Se muestran los tamaños de los fragmentos correspondientes a los marcadores empleados: *Saccharomyces cerevisiae* (1) y fago *Lambda* (2). Los perfiles obtenidos corresponden a las digestiones con las enzimas SspI (3), DraI (4), BspTI (5), BclI (6), XbaI (7) y VspI (8).

Micromonospora MIA32 (6,5 Mb)

Figura 65.- Estimación del tamaño del genoma de *Micromonospora* sp. MIA 32.

Se muestran los tamaños de los fragmentos correspondientes a los marcadores empleados: *Saccharomyces cerevisiae* (1) y fago *Lambda* (2). Los perfiles obtenidos corresponden a las digestiones con las enzimas SspI (3), DraI (4), BspTI (5), BcuI (6), XbaI (7) y VspI (8).

Micromonospora LUPAC09^T (4,9 Mb)

Figura 66.- Estimación del tamaño del genoma de *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T.

Se muestran los tamaños de los fragmentos correspondientes a los marcadores empleados: *Saccharomyces cerevisiae* (1) y fago *Lambda* (2). Los perfiles obtenidos corresponden a las digestiones con las enzimas SspI (3), DraI (4), BspTI (5), BcuI (6), XbaI (7) y VspI (8).

DISCUSIÓN

A lo largo de este capítulo se han expuesto los resultados de la caracterización llevada a cabo con las cepas aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus angustifolius* y de *Lupinus gredensis*. Para ello se han empleado diversas técnicas de genotipado, secuenciación del gen ribosómico ARNr 16S, caracterización fisiológica y estimación del tamaño del genoma de estas bacterias. Los resultados obtenidos muestran claramente una gran diversidad entre las cepas aisladas, confirmando que el género *Micromonospora* está ampliamente distribuido en estas estructuras vegetales, y que este fenómeno no está limitado a una o pocas especies del género, sino que las cepas de *Micromonospora* capaces de infectar los nódulos presentan una elevadísima diversidad y se distribuyen a lo largo de todo el género (como se observa en el árbol filogenético construido en base al gen ARNr 16S, Figura 59).

Las técnicas de genotipado empleadas (BOX-PCR, TP-RAPD y ARDRA) han demostrado su validez y fiabilidad para llevar a cabo una primera estimación de la diversidad existente entre las cepas aisladas de tipo *Micromonospora*, siendo especialmente útiles en el caso de trabajos en los que se manejan grandes cantidades de cepas. Individualmente, la técnica de BOX-PCR permite un mejor análisis a nivel de cepa, sin embargo, es el método de ARDRA el que aporta una mejor discriminación específica. Independientemente, los mejores resultados se obtienen al agrupar los resultados obtenidos a partir de los tres métodos.

Los datos obtenidos sobre la diversidad que se encuentra en los nódulos, no sólo de *Lupinus*, si no de cualquier leguminosa estudiada (Trujillo *et al.*, 2007a), son realmente sorprendentes. Hasta la fecha, los nichos ecológicos que han presentado una mayor presencia de *Micromonospora* han sido el suelo y los ambientes acuáticos, sin embargo, en base a los datos que se han ido recogiendo en los últimos años, los nódulos fijadores de nitrógeno son un nicho en el que la abundancia relativa de estas bacterias es mucho mayor que en cualquier otro hábitat estudiado, dado que de un solo nódulo se pueden aislar más de 30 cepas diferentes de *Micromonospora*, siendo la presencia de otras bacterias muy infrecuente (salvo en el caso de los rhizobia). La capacidad de estas bacterias de infectar las raíces de las leguminosas y penetrar en los nódulos parece ser, por lo tanto, una característica común a la gran mayoría de las especies del género,

debiendo haber existido un ancestro común que adquirió esta capacidad, y se ha transmitido a lo largo del proceso evolutivo del género. En base a ello, se debe considerar la existencia de un gen o grupo de genes que trasmitan esta capacidad. El descubrimiento de la información genética que codifica la interacción leguminosa-*Micromonospora* podría ser un importante hallazgo, que permitiría entender mejor esta relación, así como desarrollar nuevos procesos biotecnológicos de interés agrícola.

A pesar de que, como se ha comentado, se han conseguido aislar de los nódulos de *Lupinus* representantes de numerosas especies del género *Micromonospora*, algunas de las especies presentaron una mayor prevalencia. En este sentido, se aislaron tres o más cepas que presentaron una moderada o alta similitud con *M. coriariae*, *M. echinofusca*, *M. lupini*, *M. olivasterospora* y *M. saelicesensis*. En trabajos similares realizados anteriormente con plantas de *L. angustifolius*, Trujillo *et al.* (2007b) aislaron un buen número de bacterias de *Micromonospora*, a partir de las cuales se describieron las especies *M. lupini* y *M. saelicesensis*, posteriormente Rodríguez (2008) describió también una elevada presencia de cepas relacionadas con *M. olivasterospora* en esta misma planta. Igualmente, Carro (2009) aisló numerosas cepas relacionadas con *M. coriariae* y *M. saelicesensis* de nódulos de *Pisum sativum*. De todos los resultados existentes actualmente sobre los aislamientos de bacterias pertenecientes al género *Micromonospora* de nódulos de distintas leguminosas, la especie que con mayor frecuencia se aísla es *M. saelicesensis*, por lo que se ha propuesto la cepa tipo LUPAC 09^T para la secuenciación de su genoma. La obtención de la secuencia completa del genoma de alguna de estas bacterias abriría un nuevo campo de investigación, pudiendo aportar nuevos datos que nos permitan conocer mejor el papel que *Micromonospora* juega en la relación rhizobia-*Micromonospora*-leguminosa.

Por otro lado, el análisis filogenético de todas las cepas aisladas de uno de los nódulos de los que más bacterias se obtuvieron, ha permitido estudiar la diversidad real de las micromonósporas presentes en un solo nódulo. En este sentido, se ha observado que un buen número de las cepas aisladas estaban muy relacionadas entre sí, sin embargo, otras cepas pertenecían a diferentes especies, incluso uno de los aislados estaba relacionado con otro género de actinobacterias. Se concluye por tanto que, una vez que una *Micromonospora* infecta un nódulo, éste no queda “cerrado”, pudiendo ser colonizado por nuevas cepas.

En base a los diferentes resultados obtenidos de caracterización fisiológica y de la secuenciación del gen ARNr 16S, varias de las cepas aisladas podrían representar nuevas especies. Sin embargo, sería necesario recopilar nuevos datos para poder proponer estas nuevas especies de manera formal. El gen de la girasa es un buen marcador filogenético del género, y puede suplir incluso la hibridación ADN-ADN (Kasai *et al.*, 2000; Carro, 2009), por lo que sería importante su estudio. Además, la caracterización quimiotaxonómica es fundamental para una adecuada descripción de nuevas especies dentro del género *Micromonospora*.

Por otro lado, al margen de las bacterias pertenecientes al género *Micromonospora* obtenidas, en este trabajo se describe por primera vez el aislamiento de varias cepas pertenecientes a los géneros *Actinomadura*, *Microbispora* y *Verrucosipora*, a partir de nódulos fijadores de nitrógeno de una leguminosa, en concreto de plantas del género *Lupinus*. También se pudo aislar una cepa de *Streptomyces*. Todas estas bacterias podrían tener un posible potencial como organismos promotores del crecimiento vegetal, por lo que sería interesante profundizar en su estudio.

En la actualidad, la agricultura ecológica está adquiriendo una enorme importancia, debido a los graves problemas ambientales causados por la agricultura intensiva. En este sentido, la exploración de nuevos nichos en busca de microorganismos endofitos o con capacidad como promotores del crecimiento vegetal o agentes de control biológico, resulta de gran importancia.

CAPÍTULO V:

Estudio de la Capacidad de Fijación de Nitrógeno de *Micromonospora*

LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

La importancia del nitrógeno para la vida

Con la excepción del agua, el nitrógeno se considera el nutriente más limitante para el desarrollo de las plantas, y por tanto, del resto de organismos por encima de ellas en la cadena trófica. Es, además, un elemento esencial en la estructura de numerosas moléculas orgánicas esenciales para la vida, como los aminoácidos (y por ello las proteínas) o los ácidos nucleicos. Aunque el nitrógeno, en forma de N_2 , es el elemento más abundante en la atmósfera, la mayoría de los seres vivos son incapaces de utilizarlo en este estado, imposibilitando su incorporación a la biosfera.

El ciclo del nitrógeno se caracteriza por un balance complejo entre los diferentes procesos por los que el N_2 se fija y pasa a formar parte de la litosfera y de la biosfera, y los procesos a través de los cuales el nitrógeno vuelve a liberarse a la atmósfera. La fijación de nitrógeno puede llevarse a cabo de forma artificial, mediante el proceso industrial de Haber-Bosch, o de manera natural, a través de tormentas eléctricas, erupciones volcánicas o mediante la fijación biológica de nitrógeno.

La fijación biológica es uno de los procesos metabólicos más enigmáticos de la biología, dado que, aunque ha sido ampliamente estudiado, no se conoce con certeza el momento en el que surgió esta capacidad (se sabe que es de origen antiguo, dado que se ha descrito la presencia de heterocistos en ancestros fósiles de cianobacterias), y si ha ocurrido una o varias veces a lo largo del proceso evolutivo. Sin embargo, sí se sabe la importancia que dicho proceso tiene para la vida. Sólo unos pocos organismos, conocidos como diazotrofos, tienen la capacidad de reducir el nitrógeno molecular a amonio, dando lugar a la fijación biológica de nitrógeno. Aunque es un proceso limitado a un reducido grupo de organismos procariotas, la fijación biológica de nitrógeno tiene una enorme importancia a nivel global, aportando en torno al 60% del N_2 fijado en el planeta (Stacey *et al.*, 1992). Aunque muchos microorganismos diazotrofos son capaces de desarrollar la fijación de nitrógeno en vida libre, los mayores rendimientos se dan en

aquellos procariotas capaces de establecer simbiosis con plantas (rhizobia, *Frankia*, cianobacterias, etc.).

Descripción del proceso

La reacción de transformación de N_2 a NH_3 , y posteriormente a NH_4^+ , es muy costosa en términos de energía consumida (el proceso equivalente a nivel industrial requiere altas temperaturas y presiones), y necesita la participación de la enzima nitrogenasa para poderla llevar a cabo, de acuerdo a la siguiente reacción:

La nitrogenasa es una enzima altamente conservada a lo largo de la evolución (Howard & Rees, 1996), formada por dos componentes, una ferroproteína y una molibdoferroproteína (formada a su vez por dos subunidades) y presenta una gran sensibilidad al oxígeno, siendo irreversiblemente inactivada en presencia de este elemento. Los genes involucrados en el proceso de fijación biológica de nitrógeno se conocen como genes *nif*, siendo los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* los que codifican para los tres polipéptidos estructurales de la nitrogenasa (Dixon, 1984). En la mayoría de los organismos diazotrofos, la capacidad de fijar nitrógeno está codificada por un número elevado de genes, generalmente en torno a la veintena, englobados dentro de una región del orden de 20 Kb, siendo aún mayor en el caso de organismos simbióticos (Zehr *et al.*, 2003).

La capacidad de los organismos diazotrofos para fijar nitrógeno atmosférico en vida libre no es una característica generalizada. En el caso de los rhizobia, sólo pueden fijar nitrógeno cuando establecen simbiosis con las leguminosas, dado que la leghemoglobina protege a la nitrogenasa de ser inactivada por el oxígeno. Igualmente, la mayoría de organismos anaerobios facultativos (como *Paenibacillus*) sólo pueden llevar a cabo la fijación de nitrógeno cuando crecen en ausencia de oxígeno, puesto que

carecen de mecanismos de defensa de la nitrogenasa frente al oxígeno. Otros organismos, bien porque son anaerobios estrictos o bien porque han desarrollado sistemas para proteger a la nitrogenasa del oxígeno, pueden fijar nitrógeno en todo su ciclo de vida. En el caso de *Frankia*, la fijación de nitrógeno se lleva a cabo en el interior de unas estructuras especializadas, denominadas vesículas (Figura 67a). Las cianobacterias han sido capaces de compatibilizar los procesos fotosintéticos (que producen oxígeno molecular) con la fijación de nitrógeno, dado que algunas células se diferencian en unas estructuras específicas denominadas heterocistos, en el interior de las cuales se lleva a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico (Figura 67b). Existen casos de cianobacterias que no forman heterocistos y fijan nitrógeno, aunque lo hacen en condiciones de anaerobiosis o en concentraciones muy bajas de O_2 (Gallon, 2004).

Figura 67: Estructuras especializadas de fijación de nitrógeno

Imagen de las vesículas formadas por *Frankia* sp. en un cultivo puro teñido con DAPI (a). Imagen de los heterocistos formados por la cianobacteria *Anabaena* sp. (Zhang *et al.*, 2006), indicados con flechas (b).

Existen organismos que son aerobios estrictos y no presentan estructuras diferenciadas para llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno, habiendo desarrollado otros mecanismos de protección. Por ejemplo, las bacterias del género *Azotobacter* presentan una alta actividad respiratoria, gracias a la cual reducen rápidamente el oxígeno, disminuyendo notablemente la concentración de la molécula de O_2 en el interior de las células (Phillips & Johnson, 1961). En otros casos, las células se agrupan entre sí en grandes cantidades, permitiendo que en el interior del entramado celular la concentración de O_2 sea menor.

Distribución filogenética de los microorganismos diazotrofos

Aunque la capacidad para fijar nitrógeno molecular no se ha descrito en eucariotas, sí está ampliamente distribuida en procariotas, tanto dentro del dominio *Bacteria* como *Archaea*, pero en grupos muy concretos de organismos, habiéndose descrito más de 100 especies diazotróficas (Raymond *et al.*, 2004). La alta conservación observada entre muchos de los genes *nif* estudiados sugiere un temprano origen (con un ancestro común que desarrolló esta capacidad) y una gran transferencia horizontal de los mismos (Postgate & Eady, 1988; Henson *et al.*, 2004), si bien es cierto que existe controversia alrededor de este aspecto. En este sentido, todos los organismos diazotrofos conocidos emplean el mismo sistema de fijación biológica de nitrógeno, a través de la nitrogenasa codificada estructuralmente por los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* (o variaciones de los mismos), con la excepción de *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe *et al.*, 1997), capaz de sintetizar una enzima nitrogenasa resistente al oxígeno, cuyo origen y distribución en la naturaleza son aún desconocidos.

De todos los genes involucrados en la fijación biológica de nitrógeno, el más estudiado a nivel filogenético es el gen *nifH*, dado que presenta un tamaño manejable, su conservación en todos los organismos diazotrofos es alta y es esencial para la formación de la nitrogenasa. En base a este gen, se han establecido cuatro grupos mayoritarios de organismos diazotrofos (Chien & Zinder, 1996; Zehr *et al.*, 2003):

- Grupo I → Es el grupo más numeroso y está compuesto por organismos que emplean la nitrogenasa convencional (*nifH*-Mo) y algunos que presentan una nitrogenasa dependiente de vanadio (*vnfH*). Incluye organismos Gram negativos, como la mayor parte de las proteobacterias diazotrofas (*Azospirillum*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, etc.) y las cianobacterias, y organismos Gram positivos, como *Frankia* y *Paenibacillus*.
- Grupo II → Formado por bacterias que presentan una nitrogenasa independiente de molibdeno, codificadas por el gen *anfH*. Dentro de este grupo aparecen proteobacterias (*Azotobacter*, *Desulfobacter* y *Rhodobacter*), firmicutes (*Paenibacillus* y *Clostridium*) y espiroquetas (*Spirochaeta* y *Treponema*). También incluye a algunas arqueas metanogénicas.

- Grupo III → Formado por organismos lejanamente relacionados, que presentan un gen *nifH* convencional pero con modificaciones significativas. En la mayoría de los casos se trata de organismos anaerobios estrictos (clostridios, bacterias reductoras del azufre, etc.).
- Grupo IV → Organismos que presentan un gen similar al *nifH*, pero cuya capacidad de fijar nitrógeno atmosférico no ha sido suficientemente estudiada. Está formado por arqueas metanogénicas.

Otros autores llevaron a cabo un estudio análogo, concatenando las secuencias de los genes *nifH* y *nifD*, obteniendo una clasificación similar a la anterior (Raymond *et al.*, 2004).

Se sabe que muchos diazotrofos presentan varias secuencias homólogas del gen *nifH*, existiendo casos en los que un mismo organismo contiene incluso genes *nifH* clasificados dentro de dos o tres grupos distintos, como algunas bacterias de los géneros *Clostridium* y *Azotobacter* (Wang *et al.*, 1988).

La fijación de nitrógeno en el género *Micromonospora*

La diazotrofia presenta una distribución muy concreta dentro del filo *Actinobacteria*, siendo las bacterias del género *Frankia* las que presentan una capacidad de fijación de nitrógeno mejor estudiada, especialmente debido a la importancia de la simbiosis que establecen con las plantas actinorrizas.

La primera descripción de fijación de nitrógeno en el género *Micromonospora* es muy reciente (Valdés *et al.*, 2005), a partir, precisamente, de cepas aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de plantas actinorrizas del género *Casuarina*. Varias de estas cepas dieron resultados positivos a la reducción de acetileno, incorporación de N¹⁵ y crecimiento en medio libre de nitrógeno. Además, estos autores lograron amplificar y secuenciar un fragmento de unas 360 pb del gen *nifH*, que resultó ser muy similar (entre 97% y 98%) al presentado por bacterias del género *Frankia* que nodulan *Casuarina*.

Posteriormente, en el trabajo realizado por Cerda (2008) con las cepas LUPAC, pertenecientes también al género *Micromonospora*, y siguiendo el procedimiento propuesto por Valdés *et al.* (2005), se consiguió amplificar el gen *nifH* de la cepa LUPAC 08.

ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS DE *Micromonospora* PARA FIJAR N₂

Justificación del estudio

A raíz de los resultados obtenidos por Valdés *et al.* (2005), se planteó la posibilidad de que *Micromonospora* pudiera, de alguna manera, participar en la fijación de nitrógeno molecular para la planta, de un modo similar a como lo hacen los rhizobia o *Frankia*, pero sin la capacidad para inducir la formación de nódulos. Aunque este hecho debiera ser comprobado en ensayos de inoculación en planta, inicialmente se decidió evaluar la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre de estas bacterias, ya que simplificaba el estudio y permitía un análisis inicial.

El simple hecho de que la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico esté razonablemente extendida en el género *Micromonospora* supondría un resultado sorprendente, ya que, hasta la fecha, el único género de actinobacterias en el que se ha observado esta característica de forma generalizada es *Frankia*.

Amplificación del gen *nifH*

Dado que la mayor parte de los estudios a nivel genético de la fijación biológica de nitrógeno se han llevado a cabo en base al gen *nifH*, en este trabajo se decidió tomar este gen como referencia y tratar de amplificarlo en varias cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus*.

Como se ha comentado anteriormente, Cerda (2008) consiguió amplificar el gen *nifH* de una sola cepa, la LUPAC 08, empleando los oligonucleótidos IGK y NDR-1 (Valdés *et al.*, 2005) y realizando una reamplificación del producto obtenido (“nested” PCR) con los oligonucleótidos PolF y PolR (Poly *et al.*, 2001). Puesto que, en base a resultados previos obtenidos en ese mismo trabajo, se consideraba que la capacidad de fijar nitrógeno debía estar más extendida entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus*, se decidió buscar otras formas de amplificar el gen *nifH* en este tipo de bacterias.

Se seleccionaron varios oligonucleótidos para llevar a cabo el estudio (Figura 68), tomando como hipótesis inicial que los genes *nifH* buscados debían presentar una alta similitud con el correspondiente gen de *Frankia*, dado que los genes anteriormente amplificados de *Micromonospora* estaban muy relacionados con el de las bacterias del género *Frankia* (Valdés *et al.*, 2005; Cerda, 2008). Inicialmente se probaron las combinaciones de oligonucleótidos tal como se describieron en la bibliografía, es decir, IGK-NDR (Valdés *et al.*, 2005), PolF-PolR (Poly *et al.*, 2001), MGF-MGR1 y MGF-MGR2 (Normand *et al.*, 1988) y ELA1-ELA2 (Gtari *et al.*, 2007). Sin embargo, ninguna de estas combinaciones se mostró eficaz a la hora de amplificar y secuenciar los genes *nifH* de las distintas cepas de *Micromonospora*. A partir de la PCR realizada con los oligonucleótidos descritos para *Frankia alni* MGF-MGR se obtenía un producto de PCR en el que, aún siendo inespecífico, se podía recuperar un fragmento del tamaño esperado (650 pb aproximadamente), sin embargo, los distintos intentos de secuenciar este fragmento no tuvieron éxito. El oligonucleótido MGR2 fue modificado ligeramente, creando el MGRc, en base a la secuencia del gen *nifH* de *Frankia alni* ACN14a, con la que la LUPAC 08 presentaba un 98% de similitud, y aunque la especificidad de la PCR mejoró ligeramente, el producto seguía sin poder ser secuenciado.

Finalmente, al probar otras combinaciones, se comprobó que la PCR realizada con los oligonucleótidos ELA1-PolR era la que presentaba mejores resultados, siendo aún mejores si se preamplificaba con MGF-MGRc, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El producto obtenido podía ser perfectamente secuenciado con el oligonucleótido PolR. De esta forma se obtuvo una secuencia de 350 nucleótidos, que encajaba con las descritas previamente del gen *nifH*, para las cepas MIA 01, MIA 03,

MIA 05, MIA 06, MIA 32, MIA 38, MIA 57, MIG 10, MIG 15 y MIG 21, así como para las cepas *Micromonospora lupini* LUPAC 08 y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T, y para la cepa *Frankia alni* ACN14a, empleada como control. La metodología descrita en este trabajo se mostró muy eficaz y reproducible a la hora de amplificar, aunque sea de forma parcial, el gen *nifH* de bacterias del género *Micromonospora*. Todos los fragmentos de los genes *nifH* amplificados, correspondientes a las cepas de *Micromonospora*, presentaron una elevada similitud (entre 98% y 99%) con el correspondiente fragmento de *Frankia alni* ACN14a, tal y como había descrito previamente Cerda (2008) para la cepa LUPAC 08.

El mayor inconveniente de la metodología descrita es que el fragmento obtenido apenas abarca el 35% del tamaño completo del gen (350 nucleótidos de los casi 1000 que forman el gen *nifH*). Por este motivo, se trató de buscar una nueva forma de obtener la secuencia comprendida entre los oligonucleótidos ELA1 y MGR (unas 600 pb). Con este objetivo se diseñaron dos nuevos oligonucleótidos (NF462 y NF480) que pudieran solapar en el extremo 5' de la secuencia obtenida anteriormente. De los dos cebadores diseñados, el NF462 fue el que presentó mejores resultados, aunque sorprendentemente sólo fue posible obtener la secuencia buscada en el caso de la cepa *M. saelicesensis* LUPAC 09^T, que seguía presentando una gran similitud con la correspondiente secuencia de *Frankia alni* ACN14a (99,3%). No obstante, la obtención de esta secuencia permite pensar que el gen *nifH* debe estar completo en las bacterias del género *Micromonospora*, y que las dificultades en la amplificación del mismo podrían atender a otro tipo de factores, como la presencia de estructuras secundarias en esa zona del genoma.

En la Figura 68 se muestra un esquema del gen *nifH* y los genes adyacentes a este, *nifD* y *nifV*, basado en el genoma de la cepa *Frankia alni* ACN14a. Se indica, además, la posición de todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Figura 68.- Mapa del gen *nifH* de *Frankia alni* ACN14a, indicando la posición de los oligonucleótidos empleados.

En el esquema, la posición del oligonucleótido MGRc equivale a la del MGR2

Los resultados obtenidos muestran que, entre las bacterias del género *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas, existe una secuencia de ADN que presenta una gran similitud con el gen *nifH* de *Frankia alni*. Esta secuencia, de unas 300 pares de bases, se pudo encontrar en doce cepas, tanto aisladas de *L. angustifolius* como de *L. gredensis*, describiéndose con ello una nueva combinación de oligonucleótidos que han mostrado una gran eficacia en la amplificación y secuenciación de genes *nifH* en bacterias de los géneros *Frankia* y *Micromonospora*.

El análisis de las secuencias obtenidas indica una clara relación entre el gen *nifH* encontrado en *Micromonospora* y el descrito previamente para las bacterias de *Frankia* que nodulan *Alnus*. Este hecho parece apuntar hacia una probable transferencia horizontal del gen *nifH* de *Frankia alni* hacia bacterias del género *Micromonospora*. Dado que no se aprecia una divergencia entre las secuencias del gen de *Micromonospora* y *F. alni*, es de suponer que, de haber existido una transferencia horizontal, ésta sea muy reciente en el tiempo, y se haya extendido rápidamente entre las bacterias del género *Micromonospora* que infectan nódulos de leguminosas. De otro modo, si hubiese existido un ancestro común relacionado con ambos géneros, el gen *nifH* debería haber evolucionado de forma distinta, resultando en que las

correspondientes secuencias de las distintas especies de *Frankia* fuesen más similares entre ellas que con la de bacterias del género *Micromonospora*.

Como se observa en el árbol filogenético construido en base al gen *nifH* (Figura 69), todas las secuencias de este gen obtenidas para las diferentes cepas de *Micromonospora* aisladas en este trabajo presentan una estrecha relación entre ellas. Además, están igualmente relacionadas con el gen *nifH* de la cepa *F. alni* ACN14a. Sin embargo, este mismo gen amplificado en las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Casuarina equisetifolia* (L3, L5 y 7501), presentan una similitud mucho mayor con el grupo de *Frankia* que nodula *Casuarina*, por lo que el proceso de adquisición del gen *nifH* podría haber seguido un camino diferente entre las distintas especies del género *Micromonospora*.

Figura 69.- Árbol filogenético basado en el gen *nifH*.

En el árbol se han incluido las secuencias del gen *nifH* de las doce cepas de *Micromonospora* obtenidas en este, además de las cepas de *Micromonospora* L3, L5 y 7501, aisladas de *Casuarina* (Valdés *et al.*, 2005) y tres cepas del género *Frankia* (señalando entre paréntesis el grupo de nodulación al que pertenecen). El árbol se ha construido empleando el método Neighbor-Joining.

La existencia de transferencia horizontal en los genes *nif* se ha descrito ampliamente en anteriores trabajos, de hecho, son numerosos los casos en los que las relaciones filogenéticas establecidas en base al gen ARNr 16S, poco tienen que ver con las que se infieren a través del gen *nifH*, siendo la transferencia horizontal de genes la explicación más plausible (Ruvkun & Ausubel, 1980; Normand & Bousquet, 1989; Raymond *et al.*, 2004). El ejemplo más reconocido y aceptado por la comunidad científica de transferencia horizontal de genes *nif* se da precisamente dentro del género *Frankia*. El gen *nifH* de estas bacterias es muy similar al presente en las cianobacterias del género *Anabaena*, en vez de agruparse con su vecino diazotrofo más cercano que es *Clostridium*. Además, el gen *nifH* de *Frankia* y *Anabaena* queda agrupado dentro del brazo de las proteobacterias, siendo probable que, un antecesor del género *Frankia* y otro del género *Anabaena*, adquiriesen este gen por transferencia horizontal de una proteobacteria (Normand & Bousquet, 1989; Hirsch *et al.*, 1995). Por lo tanto, no es descabellado pensar en una posible transferencia horizontal del gen *nifH* de *Frankia* hacia *Micromonospora*, dado que se trata de un gen propenso a este tipo de intercambios genéticos, más aún si, como se está descubriendo, ambas bacterias podrían convivir en nichos tan “cerrados” como los nódulos fijadores de nitrógeno.

Crecimiento en medio libre de nitrógeno

La capacidad de las cepas LUPAC 08, LUPAC 09 y MIA 32 para fijar nitrógeno atmosférico fue evaluada a través del crecimiento en medio libre de nitrógeno. Para ello se empleó el medio definido BAP, ampliamente utilizado en el cultivo de bacterias del género *Frankia*, con algunas modificaciones para adaptarlo a las características de crecimiento de *Micromonospora* (mayor pH y sustitución del gluconato por glucosa, ver apéndice). Los ensayos se realizaron a partir de medio BAP de fijación de nitrógeno, sin fuente de nitrógeno (BAP N⁻C⁺), en estado sólido, semisólido y líquido. A modo de control positivo se empleó el medio BAP con nitrógeno (BAP N⁺C⁺) y como control negativo el medio BAP sin fuente de nitrógeno y sin fuente de carbono (BAP N⁻C⁻).

Las cepas LUPAC 08, LUPAC 09 y MIA 32 se seleccionaron para este estudio debido a que, por un lado, se había amplificado previamente el gen *nifH*, y por otro lado, forman

parte del grupo de micromonósporas más abundantemente aisladas de nódulos de leguminosas. Además de estas cepas de *Micromonospora*, se seleccionaron, a modo de control, *Paenibacillus polymyxa* DSM 36^T y *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Paenibacillus polymyxa* es una bacteria anaerobia facultativa, capaz de fijar nitrógeno en vida libre, pero sólo en condiciones de anaerobiosis, dado que no dispone de mecanismos de defensa de la enzima nitrogenasa, y por regulación genética la expresión de los genes *nif* se suprime en presencia de oxígeno, incluso en cantidades del 1% (Grau & Wilson, 1962). *Streptomyces coelicolor* es un actinomiceto de crecimiento similar a *Micromonospora* (aunque su tiempo de duplicación es menor) y dado que se dispone de su genoma completamente secuenciado, se seleccionó debido a que no se ha descrito ningún mecanismo de fijación de nitrógeno en esta bacteria (Bentley *et al.*, 2002).

*** Medio sólido**

En este caso, las tres cepas de *Micromonospora* pudieron crecer en el caso del control positivo (BAP N⁺C⁺), existiendo un moderado crecimiento transcurridas 4 semanas desde su inoculación. En el caso del medio BAP N⁻C⁺ los tres cultivos no se desarrollaron en este periodo, sino que necesitaron de alrededor de 7 semanas para crecer. En el control negativo BAP N⁻C⁻ no se observó crecimiento alguno. Las cepas empleadas como control, *Paenibacillus polymyxa* y *Streptomyces coelicolor*, sólo pudieron crecer en el medio BAP N⁺C⁺.

Aunque las cepas de *Micromonospora* no crecen especialmente bien en el medio BAP sólido, transcurridas 7 semanas desde su inoculación, el crecimiento obtenido en las placas control positivo fue similar al que presentaron las placas de medio sin nitrógeno, en las que las bacterias del género *Micromonospora* debieron fijar nitrógeno atmosférico para poder desarrollarse, dado que era la única fuente posible de este elemento esencial.

*** Medio semisólido**

Las mismas cepas anteriormente descritas se inocularon por picadura en tubos de ensayo con los tres tipos de medios BAP empleados (BAP N^+C^+ , BAP N^-C^+ y BAP N^-C^-) en estado semisólido (0,6% de agar noble). Se observó regularmente el desarrollo de los cultivos, apreciándose, como era de esperar, un mejor crecimiento para todos los microorganismos en el medio BAP N^+C^+ . En el caso de las cepas de *Micromonospora*, se observó una diferencia significativa entre el medio de fijación de nitrógeno y el control negativo, existiendo un crecimiento notablemente mayor en el primer caso. Las cepas de *Paenibacillus polymyxa* y *Streptomyces coelicolor* crecieron de manera muy similar en el medio de fijación de nitrógeno y en el control negativo. En el caso de *Paenibacillus polymyxa* no se apreció crecimiento alguno, mientras que la cepa de *Streptomyces coelicolor* fue capaz de desarrollarse inicialmente en ambos medios, probablemente por poseer una mayor cantidad de reservas y ser capaz de aprovechar mejor todos los posibles restos que tuviese el medio.

Aunque las tres cepas de *Micromonospora* empleadas en el estudio fueron capaces de crecer en el medio BAP N^-C^+ , la LUPAC 09 fue la que presentó un mejor crecimiento en este medio, pudiéndose observar, después de 30 días de incubación, un crecimiento tan abundante como en el caso del medio control BAP N^+C^+ (Figura 70a). En el caso de las cepas LUPAC 08 y MIA 32, aún existiendo una evidente diferencia entre el crecimiento obtenido en el medio de fijación y en el control negativo, el resultado fue menos significativo (Figura 70b).

Figura 70: Crecimiento de *Micromonospora* en medio semisólido

En la imagen se observa que, en el caso de la cepa LUPAC 09 (a) el mejor crecimiento obtenido en el medio BAP $N^+ C^+$ es muy similar al obtenido en el medio BAP $N^- C^+$, aunque cambia el color del micelio, y es claramente mejor que en el control negativo BAP $N^- C^-$. En el caso de la cepa MIA 32 (b), el medio de fijación BAP $N^- C^+$ presenta un crecimiento intermedio entre el control positivo y el negativo.

Un hecho curioso, que sólo se observó en el caso de la cepa LUPAC 09, fue que existía una clara diferencia entre el color del micelio en el medio de fijación y el del control positivo, adquiriendo una tonalidad morada intensa en el primer caso y siendo anaranjado en el control positivo.

Finalmente, es destacable que *Paenibacillus polymyxa* no fue capaz de fijar nitrógeno en este medio, sin duda debido a la presencia de oxígeno que inhibe la expresión de los genes *nif*. Precisamente este hecho indica que, en el caso de *Micromonospora*, si pudieron crecer (y por tanto fijar nitrógeno), deberían disponer de algún mecanismo de protección de la nitrogenasa frente a la presencia de oxígeno, lo cual nunca se ha descrito en estas bacterias.

*** Medio líquido (estimación por densidad óptica)**

Dado que en el medio semisólido no es posible realizar una medición cuantitativa del crecimiento bacteriano, se decidió llevar a cabo el mismo experimento en medio líquido, midiendo la densidad óptica de los cultivos de forma periódica. Los cultivos se

mantuvieron siempre en un régimen de agitación suave, evitando una excesiva oxigenación de los mismos.

Después de un mes de incubación, los cultivos presentaban un crecimiento muy desigual. La biomasa en el medio BAP suplementado con nitrógeno era más abundante que en cualquier de los otros casos. Sin embargo, los cultivos crecidos en el medio BAP N^+C^+ se pudieron desarrollar significativamente mejor que en el caso del control negativo (Figura 71).

La cuantificación de la biomasa mediante densidad óptica presentó numerosos inconvenientes, debido a que, en el medio líquido, tanto *Micromonospora* como *Streptomyces* formaban grandes grupos de células, especialmente en este tipo de cultivos sometidos a baja agitación. La formación de estos grupos de células dificulta en gran medida la determinación de la absorbancia de forma eficaz y reproducible, y deshacer los cúmulos de células resulta una tarea ardua cuando se trabaja con un gran número de cultivos. Por este motivo se decidió determinar el crecimiento en estas mismas condiciones mediante la cuantificación del peso de la biomasa generada.

Figura 71: Crecimiento de *Micromonospora* en medio líquido

En la imagen se muestran los matraces correspondientes a cada uno de los tres medios empleados para la cepa LUPAC 09. Se observa como el matraz con mayor crecimiento se da en el medio BAP N^+C^+ , mientras que en el medio BAP N^-C^+ existe más biomasa que en el medio BAP N^-C^- .

*** Medio líquido (estimación por peso húmedo)**

Con el objetivo de obtener más datos sobre la capacidad fijadora de nitrógeno de las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*, se cuantificó la biomasa producida en los distintos medios BAP empleados para las cepas LUPAC 08, LUPAC 09 y MIA 32, empleando a *S. coelicolor* como cepa control. De esta forma, al cuantificar todo el peso húmedo producido por los cultivos, se evita la necesidad de medir la densidad óptica de los mismos, con los problemas de formación de grupos de células anteriormente mencionados.

Los diferentes medios empleados se inocularon a partir de cultivos previamente crecidos en medio libre de nitrógeno, tratando con ello de que las células tuviesen la menor cantidad de reservas posible. Tras 30 días de incubación todos los cultivos se centrifugaron y la biomasa obtenida fue pesada. Los resultados se muestran en la Tabla 33. La cepa de *S. coelicolor* fue la que presentó un mayor crecimiento en el medio control positivo (BAP N^+C^+), pudiéndose obtener casi el doble de biomasa que en los cultivos de *Micromonospora*, probablemente porque su tasa de duplicación celular es mayor, al igual que el tamaño de sus hifas. En el medio control negativo (BAP N^-C^-) los valores de crecimiento fueron similares, y notablemente más bajos que en el medio anterior. En el caso del medio de fijación de nitrógeno (BAP N^-C^+), destacó el crecimiento mostrado por la cepa LUPAC 08.

Aunque lo ideal es que en el medio BAP N^-C^- el crecimiento fuese cero, la realidad es que los microorganismos pueden crecer gracias a sus reservas y a las trazas de carbono y nitrógeno que pueda contener el medio, por lo que crecen hasta agotar todos los recursos posibles. El valor obtenido en este medio se empleó como “crecimiento de fondo”, siendo restado a los datos recogidos para los otros dos medios. Estos valores estandarizados fueron empleados para determinar el posible crecimiento debido a la fijación biológica de nitrógeno. Para ello se tomó como referencia el dato del crecimiento en medio con nitrógeno y se estimó el crecimiento relativo en el medio sin nitrógeno, obteniendo el porcentaje de crecimiento que cada cepa fue capaz de desarrollar en ausencia de nitrógeno respecto al crecimiento óptimo en presencia de nitrógeno en el medio (este dato fue denominado índice de fijación biológica o, abreviado, IFB). Un valor más alto del IFB indica un mayor crecimiento en ausencia de

nitrógeno asimilable, y por tanto una mayor probabilidad de que haya existido fijación biológica de nitrógeno.

$$IFB = \frac{\text{Crecimiento en BAP N}^+ \text{C}^+}{\text{Crecimiento en BAP N}^- \text{C}^+} * 100$$

La cepa de *S. coelicolor* fue la que presentó un menor IFB (8,8%). Dado que este microorganismo no es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, el crecimiento resultante puede explicarse debido a que el factor limitante del crecimiento en el medio BAP N⁻C⁻ es el carbono, mientras que en el medio BAP N⁻C⁺, la bacteria puede crecer hasta que sea el nitrógeno el elemento que se convierte en factor limitante del crecimiento. En el caso de las cepas de *Micromonospora* analizadas, el IFB es, como mínimo, un 50% mayor que en *S. coelicolor*, siendo la cepa MIA 32 la que presenta un valor más bajo, con un 12,5%. Para la cepa LUPAC 09 se obtiene un IFB de 15,7%, mientras que la cepa LUPAC 08 presenta un resultado mucho más alto, con un 31,6%.

Tabla 33.- Resultados de la biomasa generada en medio BAP y fijación de nitrógeno.

	Gramos de biomasa * 100			Crecimiento sin N	
	BAP N ⁺ C ⁺	BAP N ⁻ C ⁻	BAP N ⁻ C ⁺	N ⁺ - N ⁻	IFB
<i>S. coelicolor</i>	114 ⁽¹³⁷⁾	0 ⁽²³⁾	10 ⁽³³⁾	104	8,8%
LUPAC 08	57 ⁽⁷⁶⁾	0 ⁽¹⁹⁾	18 ⁽³⁷⁾	39	31,6%
LUPAC 09	51 ⁽⁷⁵⁾	0 ⁽²⁴⁾	8 ⁽³²⁾	43	15,7%
MIA 32	48 ⁽⁷²⁾	0 ⁽²⁴⁾	6 ⁽³⁰⁾	42	12,5%

En las columnas BAP N⁺C⁺, BAP N⁻C⁻ y BAP N⁻C⁺ aparecen los pesos de biomasa húmeda, multiplicados por 100 para manejar números enteros (entre paréntesis) y los valores corregidos en función del control negativo BAP N⁻C⁻. La columna N⁺ - N⁻ muestra la diferencia entre los valores de biomasa corregidos con y sin nitrógeno en el medio (un menor valor podría indicar una mayor fijación de nitrógeno). La columna IFB muestra los valores obtenidos para este índice.

Los datos obtenidos parecen indicar que podría existir actividad fijadora de nitrógeno en las tres cepas de *Micromonospora* analizadas, si bien el único valor que realmente destaca es el aportado por la cepa *Micromonospora lupini* LUPAC 08, que es en torno a un 350% mayor que el del control negativo (*S. coelicolor*). Aunque no se puede tomar

como un dato concluyente, sí apoya la tesis inicial de que las bacterias pertenecientes al género *Micromonospora* podrían tener cierta actividad diazotrófica en según qué condiciones de crecimiento.

Cambios morfológicos relacionados con la fijación de N₂

Como se ha comentado anteriormente, los organismos diazotrofos aerobios deben desarrollar sistemas de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Existen numerosos mecanismos evolutivos para lograrlo. Algunos organismos han desarrollado la capacidad de formar estructuras especializadas, como los heterocistos de las cianobacterias o las vesículas de *Frankia*. A raíz de los resultados obtenidos, y desde la hipótesis establecida de que las micromonósporas aisladas de nódulos de leguminosas podrían fijar nitrógeno atmosférico, se decidió analizar la morfología de las cepas que crecían en medio líquido BAP sin nitrógeno.

Bajo el microscopio óptico se pudo observar la existencia de unas estructuras circulares de gran tamaño, notablemente mayores que las esporas que normalmente caracterizan a las bacterias del género *Micromonospora*, y que parecían ser más fácilmente atravesadas por el haz de luz, resultando en un aspecto de “circunferencia hueca” (Figura 72). Todas las cepas de *Micromonospora* estudiadas, LUPAC 08, LUPAC 09 y MIA 32, fueron capaces de formar estas estructuras.

Figura 72: Crecimiento de *Micromonospora lupini* LUPAC 08 en medio BAP N⁻C⁺.

En ambas imágenes se muestra el crecimiento obtenido para la cepa LUPAC 08, en la primera generación de cultivo creciendo en medio libre de nitrógeno, tras 15 días de incubación. Se observa la presencia abundante de esporas (flechas verdes) y otras estructuras de morfología similar, menos frecuentes y de mayor tamaño (flechas azules). En la imagen de la izquierda la barra representa 10 µm, mientras que en la derecha es de 2 µm.

Las formaciones esféricas no se observaban en los casos en que las cepas crecían en el mismo medio suplementado con nitrógeno, lo cual parecía indicar que podría tratarse de algún tipo de estructura relacionada con el crecimiento de *Micromonospora* en ausencia de nitrógeno asimilable. Este hecho podría responder a un sistema de regulación de la fijación de nitrógeno, dado que la mayoría de organismos diazotrofos establecen sistemas de regulación de tal manera que la disponibilidad de nitrógeno en el medio inactiva la expresión de los genes *nif* (Dixon, 1984; Dixon & Kahn, 2004).

La presencia de este tipo de formaciones no se ha descrito previamente en bacterias del género *Micromonospora*, cuyas esporas, como refleja su propio nombre, suelen ser de

pequeño tamaño, normalmente inferiores a 1 μm (Luedemann & Casmer, 1973; Kawamoto, 1989).

Con el objetivo de poder disponer de una mayor información sobre las estructuras globulares encontradas, se decidió llevar a cabo estudios de microscopía electrónica de barrido. Diferentes cultivos de las tres cepas de *Micromonospora* estudiadas fueron procesados y analizados, a diferentes tiempos de crecimiento, en el medio BAP de fijación y en los controles positivo y negativo. Los resultados encontrados fueron sorprendentes, ya que la presencia de estas formaciones fue incluso más evidente que bajo el microscopio óptico, presentando un tamaño que oscilaba entre 1,5 μm y 2,5 μm y una superficie lisa (Figura 73). Las estructuras localizadas mantenían siempre una morfología esférica, de gran volumen y con tendencia a colapsarse fácilmente (algo que no sucede con las esporas). En contraposición, los cultivos procedentes del control negativo (medio sin fuente de carbono ni nitrógeno) presentaban un micelio escaso y muy deteriorado, encontrando un moderado número de esporas (Figura 73e). Las cepas crecidas en el medio BAP N^+C^+ presentaron una gran abundancia de hifas bien formadas y numerosas esporas que, en muchos casos, tendían a agruparse en racimos (Figura 73f). En ningún caso, ni en el control positivo ni en el control negativo, se encontraron las estructuras globulares descritas, consolidando la hipótesis inicial respecto al posible papel de las mismas en la fijación de nitrógeno.

Inevitablemente, las estructuras observadas en cultivos de varias cepas de *Micromonospora*, creciendo en ausencia de nitrógeno, recuerdan a los mecanismos de protección que otras bacterias emplean para proteger la nitrogenasa del oxígeno, como los heterocistos de las cianobacterias y, especialmente, las vesículas de *Frankia*. En el caso de las vesículas de *Frankia*, se sabe que se forman en hifas laterales (o ramificaciones) y quedan unidas a ellas a través de un pedúnculo. Tanto el pedúnculo como la propia vesícula están envueltos por una fina capa lipídica multilaminada, y en su interior se detecta la presencia de la nitrogenasa, tanto en vida libre como dentro de los nódulos (Noridge & Benson, 1986; Tisa & Ensign, 1987; Schultz & Benson, 1989). Serán necesarios nuevos ensayos para determinar definitivamente si existe actividad nitrogenasa en el interior de las mismas.

Figura 73: Estructuras globulares encontradas en medio BAP N⁻C⁺.

Diferentes cultivos en medio BAP N⁻C⁺ de la cepa LUPAC 09 tras 21 días de incubación (a y b) y de las cepas LUPAC 09 (c) y MIA 32 (d) después de 25 días de incubación. Las cuatro imágenes muestran diferentes estructuras globulares y su diámetro, al lado de las hifas y esporas (de menor tamaño). Ni en el control negativo (e) ni en el control positivo (f) se aprecian estructuras similares.

DISCUSIÓN

Dado que existen sólidas evidencias de que *Micromonospora* está presente en los nódulos de muchas especies de leguminosas, y puesto que se trata de estructuras especializadas en la fijación biológica de nitrógeno, se planteó la posibilidad de que estas bacterias pudiesen, de algún modo, colaborar en dicho proceso. Anteriores trabajos habían descrito la capacidad de unas pocas cepas de *Micromonospora*, aisladas de nódulos de plantas actinorrizas, de fijar nitrógeno atmosférico (Valdés *et al.*, 2005).

En este trabajo se pudo desarrollar un nuevo método para amplificar de forma eficaz y sistemática un fragmento de 350 nucleótidos que, en las doce cepas de *Micromonospora* estudiadas, presentó una similitud superior al 98% con el correspondiente fragmento del gen *nifH* de *F. alni* ACN14a. Este hecho sugiere una reciente transferencia horizontal del gen *nifH* entre bacterias de *Frankia* capaces de inducir la formación de nódulos radicales en *Alnus* y las bacterias del género *Micromonospora* que infectan nódulos de leguminosas. Asimismo, supone un novedoso aspecto evolutivo dentro de la filogenia de los genes *nifH*, apoyando otros trabajos anteriores que ya planteaban una probable transferencia horizontal de este gen en bacterias del género *Frankia* (Normand & Bousquet, 1989; Hirsch *et al.*, 1995).

Se trata de la primera vez que se obtiene un fragmento del gen *nifH* para un número tan significativo de cepas de *Micromonospora*, pertenecientes a varias especies del género, con la única característica en común de haber sido aisladas de nódulos de leguminosas. Dado que el gen *nifH* es uno de los genes estructurales de la enzima nitrogenasa, la presencia en *Micromonospora* podría indicar una posible capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

El crecimiento de bacterias del género *Micromonospora* en medio BAP sin nitrógeno fue positivo al emplear medio sólido, semisólido y líquido. En este último caso se determinó de forma cuantitativa la biomasa generada en los cultivos de las cepas *Micromonospora lupini* LUPAC 08, *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T y *Micromonospora* sp. MIA 32, siendo la cepa LUPAC 08 de la que se obtuvo una mayor cantidad de biomasa en ausencia de nitrógeno. Además, las tres cepas de *Micromonospora* analizadas parecían formar estructuras de forma esférica de mayor

tamaño que las esporas, que, de ser empleadas de forma similar a las vesículas de *Frankia*, podrían explicar que el proceso de fijación biológico se diese en condiciones aerobias. Este tipo de estructuras no se observaron en los respectivos controles empleados, y nunca antes han sido descritas de manera formal para las bacterias de este género. Serán necesarios nuevos estudios para confirmar la hipótesis de que pueda tratarse de estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno, y de si el proceso genético y fenotípico de su formación también presenta similitudes con el desarrollado por las bacterias del género *Frankia*, lo cual podría ser un novedoso hallazgo.

Sin embargo, existen “puntos oscuros” que podrían, de algún modo, contradecir los resultados positivos obtenidos en lo referente a la confirmación de estas cepas de *Micromonospora* como bacterias diazotrofas, como por ejemplo, el hecho de que distintos intentos de amplificar el gen *nifH* completo no hayan dado resultado, o que el gen *nifD* no haya podido ser amplificado con éxito empleando distintos oligonucleótidos diseñados en base al mismo gen de *F. alni* ACN14a. Además, los resultados de crecimiento en medio libre de nitrógeno no son suficientemente concluyentes, exceptuando el caso de la cepa LUPAC 08, que deberá ser confirmado en un futuro trabajo.

La conclusión es que, aunque las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas parecen ser capaces de fijar nitrógeno atmosférico, será necesario desarrollar nuevas técnicas que confirmen este hecho. Especialmente conveniente sería llevar a cabo ensayos de reducción de acetileno a etileno y la incorporación de N^{15} , aunque ambos métodos fueron empleados en el trabajo de Valdés *et al.* (2005), obteniendo resultados positivos.

El hecho de que se haya descrito la capacidad de *Micromonospora* de infectar nódulos fijadores de nitrógeno de plantas actinorrizas y de leguminosas, y que en ambos casos estas cepas han sido potencialmente caracterizadas como diazotrofas, invita a pensar que su papel en los nódulos podría ir en esta misma dirección. Sin embargo, la confirmación de esta hipótesis inicial requiere la realización de estudios de fijación de nitrógeno en el interior de los nódulos, por lo que sería importante la obtención de mutantes de rhizobia y *Frankia nif⁻*, para llevar a cabo estudios de coinoculación y determinación de la fijación de nitrógeno en los mismos. Por otro lado, sería interesante

saber si las cepas de *Micromonospora* son capaces de expresar los genes *nif* en el interior de los nódulos, para lo cual, conociendo la secuencia del gen *nifH*, se podría amplificar por RT-PCR el ARNm correspondiente al mismo, determinando y cuantificando la expresión del gen.

CAPÍTULO VI:

Análisis de la Interacción *Micromonospora-Lupinus*

INTRODUCCIÓN

El proceso de infección y nodulación en plantas

Existen grandes similitudes en la simbiosis establecida entre bacterias del género *Frankia* y plantas actinorrizas y la que involucra a los rhizobia con las leguminosas. En ambos casos, tanto las bacterias como las plantas sufren importantes cambios fisiológicos que las hacen adaptarse a la simbiosis, surgiendo estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno. El proceso de reconocimiento e infección es muy similar en ambos casos, aunque ha podido ser más ampliamente estudiado en el caso de los rhizobia y las leguminosas, gracias a la mayor facilidad de manejo de ambos organismos, especialmente en el caso de rhizobios, que presentan un crecimiento *in vitro* mucho mejor y una mayor facilidad para la manipulación genética que *Frankia* (Pawlowski & Bisseling, 1996).

Tanto en el caso de *Frankia* como en los rhizobia las relaciones establecidas con sus plantas hospedadoras son, en mayor o menor medida, específicas, de tal modo que existe una comunicación química a través de la cual ambos simbioses se reconocen. De forma general, en el caso de las leguminosas, éstas sintetizan y liberan una serie de compuestos conocidos como flavonoides, que son reconocidos de forma específica por unas proteínas presentes en la superficie bacteriana (proteínas *nodD*), que a su vez inducen la expresión de un grupo de genes involucrados en el proceso de nodulación, los genes *nod* (Bauer, 1981; Spaink *et al.*, 1998). Este conjunto de genes codifica para la síntesis y secreción de los factores *nod*, compuestos que inducen la deformación de los pelos radicales, produciéndose en su extremo apical la formación conocida como “cayado de pastor”, en el interior de la cual quedan recluidas algunas bacterias que producen una degradación local en la pared celular, de forma que la membrana se invagina permitiendo la entrada de los rhizobia en el pelo radical (Bauer, 1981; Long, 1996; Mateos *et al.*, 2001; Robledo *et al.*, 2008). Aunque el proceso de infección de las bacterias del género *Frankia* no está bien caracterizado, algunos trabajos sugieren la posibilidad de que en este caso, la detección planta-microorganismo también se produce mediante la liberación de flavonoides, que podrían inducir, al igual que en los rhizobia,

la expresión de un grupo de genes que activen el proceso de nodulación (Berry, 1994). A pesar de que se ha comprobado que el sobrenadante obtenido a partir de cultivos de *Frankia* contiene compuestos capaces de provocar la deformación del pelo radical de plantas actinorrizas, no se ha conseguido describir la naturaleza exacta de los factores nod (Cérémonie *et al.*, 1999; Valdés, 2002).

Por otro lado, los factores nod también son capaces de inducir la formación del primordio nodular, activando la división de células corticales de la raíz. Hasta este punto llegan los microorganismos a través de un canal de infección, a lo largo del cual las bacterias se mantienen en división. Una vez que alcanzan la célula del nódulo que va a ser infectada, los rhizobia sufren un cambio irreversible, perdiendo la pared celular y diferenciándose en bacteroides y quedando envueltos por una membrana peribacteroidea, formando los simbiosomas, orgánulos especializados en la fijación de nitrógeno. En el caso de *Frankia*, la diferenciación dentro de los nódulos depende de la planta hospedadora, que determina la morfología y el número de las vesículas, así como su localización dentro de las células infectadas (Valdés, 2002).

Aunque el expuesto es el método de infección más extendido, tanto en *Frankia* como en los rhizobia, existen cepas que emplean otros mecanismos. Las cepas de *Frankia* que establecen simbiosis con *Elaeagnus*, *Shepherdia* y *Ceanothus* llegan a los nódulos a través de un proceso de penetración intercelular de las células vegetales de la epidermis y el cortex (Miller & Baker, 1985; Racette & Torrey, 1989). Un proceso similar siguen bacterias del género *Bradyrhizobium* al establecer simbiosis con *Arachis hypogea*, conocido como *crack entry*, que también se da en otras plantas de leguminosas, como *Phaseolus* (en algunas ocasiones) o plantas de la familia *Mimosoideae* (Boogerda & van Rossum, 1997).

La importancia de las bacterias del género *Micromonospora* para las plantas

Como se describió en el Capítulo 4 de este trabajo, la relación entre las bacterias del género *Micromonospora* y las plantas parece ser muy estrecha. A pesar de que hace sólo algunas décadas se desconocía por completo el papel que estas bacterias podrían ejercer

como PGPRs, en los últimos años se han realizado numerosos trabajos en torno a este hecho, llevando a la conclusión inequívoca de que el género *Micromonospora* establece notables interacciones con plantas de muy diverso tipo. Llevando a cabo una revisión de todos estos trabajos, se observa que las bacterias de este género están relacionadas con cereales como trigo (Coombs & Franco, 2003; Coombs *et al.*, 2004) y arroz (Tian *et al.*, 2007), plantas actinorrizas de los géneros *Casuarina* (Valdés *et al.*, 2005) y *Discaria* (Solans, 2007), hortalizas como pepino (El-Tarabily *et al.*, 2009), repollo chino (Lee *et al.*, 2008) y zanahoria (El-Tarabily, 1997) y un gran número de leguminosas como alfalfa, alubia, cacahuete, garbanzo, guisante, lupino, trébol, etc. (Fernández-Molinero, 2005; Trujillo *et al.*, 2007a; Cerda, 2008; Rodríguez, 2008; Carro, 2009), además de otras plantas sin especial interés agronómico. Muchos de estos trabajos han aportado datos convincentes que sitúan a las bacterias del género *Micromonospora* como agentes de control biológico y organismos promotores del crecimiento vegetal (Hirsch & Valdés, 2010).

Aunque se han descrito numerosas interacciones entre *Micromonospora* y diferentes plantas, la más sorprendente y significativa, por su distribución y magnitud, parece involucrar a estas bacterias y los nódulos fijadores de nitrógeno de plantas actinorrizas y leguminosas, a pesar de que su verdadero papel como bacterias endofitas de estas plantas es aún desconocido. Sí parece claro que, al menos uno de los resultados observados al introducir cepas de *Micromonospora* en la relación *Frankia*-planta actinorriza o rhizobia-leguminosa, es un efecto promotor de la nodulación (Solans, 2007; Cerda, 2008; Solans *et al.*, 2009).

***Micromonospora*-leguminosa: Una relación desconocida**

El primer aislamiento y caracterización de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas tuvo lugar hace muy pocos años (Fernández-Molinero, 2005), a partir de la cual se describieron dos nuevas especies del género: *M. lupini* y *M. saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007b). Desde este momento se inició toda una línea de investigación, gracias a la cual se han aislado más de 800 cepas de *Micromonospora* procedentes de un gran número de plantas de leguminosas muestreadas, la mayoría de ellas en España (Rodríguez, 2008; Carro, 2009), aunque también se han obtenido este

tipo de bacterias de países tropicales (Cerde, 2008). En todos los casos en los que se ha seleccionado una leguminosa, capaz de establecer simbiosis con bacterias de tipo rhizobia, para llevar a cabo aislamientos de *Micromonospora*, se han obtenido este tipo de microorganismos. Se trata por tanto de una relación enormemente extendida entre las leguminosas.

Hasta el momento, la especie de leguminosa para la que ha sido más ampliamente estudiada esta interacción es *Lupinus angustifolius*, ya que fue esta planta de la que se aislaron bacterias del género *Micromonospora* por primera vez. Estudios de microscopía de barrido han permitido observar estructuras similares a hifas bacterianas en las capas externas de nódulos de *L. angustifolius* (Figura 74). Además, a través de la técnica de FISH, se comprobó que *Micromonospora* se ubica en el interior de las células vegetales de estos nódulos, tal como se muestra en la Figura 75 (Rodríguez, 2008).

Sin embargo, a pesar de los trabajos realizados, son aún muy numerosos los aspectos desconocidos en torno a la interacción *Micromonospora*-leguminosa, como el mecanismo de infección mediante el cual estas bacterias colonizan los nódulos, la ubicación y distribución real dentro de los mismos, el papel que juega *Micromonospora* para la planta, etc.

Figura 74.- Detección microscópica de hifas en capas externas de un nódulo de *L. angustifolius*. Imagen de SEM de las capas de células vegetales más externas de un nódulo de *L. angustifolius*. Se observa la existencia de unas estructuras, probablemente bacterianas, que coinciden en forma y tamaño con las hifas de bacterias del género *Micromonospora* (Rodríguez, 2008).

Figura 75.- Detección de *Micromonospora* en nódulos mediante FISH. Imagen DIC de fluorescencia obtenida a partir de un corte de un nódulo silvestre de *Lupinus angustifolius*. La fluorescencia emitida por la sonda Microm 5.5, específicamente diseñada para bacterias del género *Micromonospora* (Rodríguez, 2008). Barra = 10 μm.

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE *Micromonospora-Lupinus*

Análisis de la capacidad de *Micromonospora* para reinfectar nódulos de leguminosas

Aunque se han llevado a cabo con anterioridad ensayos de coinoculación de varias cepas del género *Micromonospora*, junto con rhizobia, en plantas de *Lupinus* y *Phaseolus* para analizar el posible potencial de *Micromonospora* como PGPR (Cerde, 2008), hasta ahora, no se habían reislado de nódulos para analizar su capacidad real de reinfección a partir de cultivos puros.

En este trabajo se realizaron varios ensayos de coinoculación con las cepas *Micromonospora lupini* LUPAC 08 y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T, junto con la cepa *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65, capaz de inducir la formación de nódulos en plantas del género *Lupinus*. Los ensayos se llevaron a cabo empleando plantas de *Lupinus albus*.

Una vez más se observó que las cepas de *Micromonospora*, al ser inoculadas individualmente, no eran capaces de inducir la formación de nódulos radicales en las plantas de *Lupinus*, al contrario que las plantas inoculadas con la cepa control de *B. canariense*, que presentaban un gran número de nódulos efectivos. Los ejemplares de *L. albus* que habían sido coinoculados al mismo tiempo con *Micromonospora* y *Bradyrhizobium* también presentaban un elevado número de nódulos, más incluso que los contabilizados en el caso de las plantas inoculadas sólo con *Bradyrhizobium*, tal como se había observado en anteriores trabajos (Cerde, 2008). Dado que el objetivo de este estudio era analizar la capacidad de cepas de *Micromonospora* cultivadas “in vitro” de reinfectar nódulos de *Lupinus*, se seleccionó una de las plantas inoculadas con la cepa LUPAC 08 (que presentaba 21 nódulos) y otra de las inoculadas con la cepa LUPAC 09 (con 17 nódulos). Se llevaron a cabo aislamientos a partir de todos los nódulos que podían ser separados de forma individual, dado que es frecuente en este tipo de plantas las agrupaciones de múltiples nódulos en la raíz principal, generalmente cerca de la base del tallo.

Los resultados obtenidos después de tres semanas de incubación muestran que es posible recuperar colonias de tipo *Micromonospora* de las placas de aislamiento. Además, se aprecia una distribución desigual de los aislados, tal y como se muestra en la Tabla 34. En la mayoría de los nódulos muestreados, para ambas cepas de *Micromonospora*, se recuperaron entre una y ninguna colonia de este tipo, sin embargo, hubo un nódulo del que se aislaron cuatro colonias de la cepa LUPAC 08 (Figura 76a) y otro del que se obtuvieron tres colonias de la cepa LUPAC 09. El caso más sorprendente se dio en uno de los nódulos recogidos de la planta inoculada con la cepa LUPAC 09, del que, sorprendentemente, se obtuvieron 354 colonias de tipo *Micromonospora* (Figura 76b).

Tabla 34.- Colonias de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus albus* en laboratorio.

		Número de colonias de <i>Micromonospora</i> aisladas														
		Por cada nódulo														
LUPAC 08		4	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,5
LUPAC 09		354	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-	-	30,1

Figura 76.- Placas de aislamiento de nódulos de *Lupinus albus*.

En la imagen se muestran las dos placas de aislamiento obtenidas a partir de los nódulos de *L. albus* que dio lugar a un mayor número de colonias de tipo *Micromonospora*, tanto en el caso de la cepa LUPAC 08 (a) como de la cepa LUPAC 09 (b). Es más que evidente la gran diferencia existente entre ambas placas.

Con el objetivo de confirmar que las cepas de *Micromonospora* recuperadas de los nódulos correspondían a las mismas cepas que fueron inoculadas en las plantas, se seleccionaron dos colonias de cada tipo para llevar a cabo la secuenciación del gen ARNr 16S. El resultado mostró una concordancia total con las respectivas secuencias de las cepas LUPAC 08 y LUPAC 09 respectivamente, ratificando que se trataba de las mismas cepas.

Aunque a partir de los resultados obtenidos para el aislamiento de cepas del género *Micromonospora* de plantas silvestres de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis* también se observó una distribución desigual de unos nódulos a otros, incluso dentro de la misma planta (ver Capítulo 2), en este caso la diferencia fue aún más notable. La proporción de nódulos de los que no se obtuvo ninguna colonia de *Micromonospora* fue mayor para la planta inoculada con la cepa LUPAC 08 (66%) que para la inoculada con la cepa LUPAC 09 (50%). Además, en este caso, se obtuvo un nódulo del que se aisló un número realmente sorprendente de colonias, lo cual no se observó en las plantas silvestres.

Todos estos resultados demuestran que las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos silvestres de leguminosas son capaces de reinfectar nódulos de plantas crecidas *in vitro*, siempre y cuando haya una bacteria que induzca previamente la nodulación en la planta. Dentro de los nódulos de una misma planta inoculados con la misma cepa de *Micromonospora*, ésta presenta una distribución muy desigual. Por alguna razón desconocida, las células de *Micromonospora* tienden a concentrarse en grandes cantidades en unos pocos nódulos de las plantas, mientras que otros muchos nódulos quedan sin infectar.

Por otro lado, de cara a conocer la especificidad de la interacción *Micromonospora*-leguminosa, las cepas de *Micromonospora* LUPAC 08 y LUPAC 09, que fueron aisladas de nódulos de *Lupinus*, se inocularon en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), para estudiar su capacidad de establecer la misma interacción con otras especies de leguminosas. En este caso se empleó la cepa *Ensifer meliloti* Sm1021, que es capaz de inducir la formación de nódulos radicales en plantas de *Medicago sativa*. Del mismo modo, se realizaron aislamientos de los nódulos recogidos a partir de las plantas coinoculadas, obteniendo placas de aislamiento de las que también se pudieron

recuperar colonias de *Micromonospora*. Una vez más, la secuenciación del gen ARNr 16S demostró que se trataba de las mismas cepas empleadas en el estudio.

Estos resultados muestran que la capacidad de las bacterias del género *Micromonospora* para infectar nódulos de distintas especies de leguminosas no parece seguir un estricto patrón de especificidad microorganismo-planta, como ocurre en los rhizobia o *Frankia* (Mylona *et al.*, 1995), sino que una misma cepa de *Micromonospora* es capaz de infectar nódulos de plantas tan distintas como *Lupinus* (perteneciente a la tribu Genisteae) y *Medicago* (incluida dentro de la tribu Trifolieae). Sin embargo, para conocer el verdadero alcance de las especies de plantas con las que una misma cepa de *Micromonospora* puede establecer simbiosis, será necesario realizar un estudio mucho más amplio.

Detección de la presencia de *Micromonospora* en nódulos a través del gen *gyrB*

A pesar de que los datos obtenidos de los aislamientos de *Micromonospora* realizados a partir de nódulos de leguminosas, junto con las imágenes obtenidas a través de la técnica de FISH, han evidenciado que *Micromonospora* está presente en el interior de los nódulos, la detección de estas bacterias a partir del ADN metagenómico de los nódulos no ha sido posible. Como se expuso en el Capítulo 2 de este trabajo, empleando la técnica de DGGE no se pudo obtener este resultado. Dado que en la actualidad la detección metagenómica de un organismo en una comunidad microbiana se considera una sólida prueba de su presencia en ella, se decidió buscar nuevas vías para lograr detectar el ADN de *Micromonospora* en el conjunto de ADN genómico extraído de nódulos de *Lupinus angustifolius*.

La clonación de ADN permite aislar, de forma individual, genes pertenecientes a una única bacteria a partir del ADN metagenómico de una comunidad bacteriana, por muy compleja que ésta sea (Sambrook *et al.*, 1989; Pace, 1997). Puesto que el objetivo de este trabajo era detectar, de forma concreta, la presencia genética de *Micromonospora* en los nódulos, se decidió emplear el gen *gyrB*, dado que los oligonucleótidos descritos en la bibliografía son suficientemente específicos para poder amplificar este gen de

Micromonospora, aún cuando la mayor parte del ADN metagenómico corresponda a otros organismos distintos (Carro, 2009). De haber seleccionado el gen que codifica para el ARNr 16S, que es mucho más común en este tipo de trabajos, si el ADN de *Micromonospora* está en una proporción mucho menor que el de *Bradyrhizobium* o el de los plastos (que fue una de las conclusiones del Capítulo 2), habría sido necesario estudiar un elevado número de clones para conseguir uno correspondiente al microorganismo buscado.

Se emplearon los oligonucleótidos GYF1 y GYR1B (Carro, 2009) para llevar a cabo la amplificación parcial del gen *gyrB*, obteniendo un fragmento de aproximadamente 500 pb. Aunque el producto de la amplificación del gen *gyrB*, empleando el ADN metagenómico de los nódulos, no resultó tan específico como en el caso de trabajar con cultivos puros, se pudo obtener un fragmento del tamaño esperado, que fue purificado y clonado. Posteriormente se secuenciaron los insertos correspondientes a 15 de los clones obtenidos, resultando que 14 de ellos estaban estrechamente relacionados con algunos de los distintos genomas secuenciados del grupo de los rhizobia, mientras que uno de los insertos obtenidos presentaba una similitud superior al 98% con el gen *gyrB* de la cepa *Micromonospora* sp. 37 (de Menezes *et al.*, 2008).

El resultado obtenido supone una evidencia más que confirma la presencia de *Micromonospora* en los nódulos, apoyando con ello otros resultados obtenidos con anterioridad. Adicionalmente, abre una nueva vía para explorar la diversidad de estas bacterias en este y otros ambientes, sin necesidad de llevar a cabo el cultivo de los mismos, y permitiendo localizar el gen *gyrB* de *Micromonospora* aún en comunidades en las que su presencia es muy minoritaria, posiblemente inferior al 1% si se consideran acertadas las estimaciones de Muyzer *et al.* (1993) y Murray *et al.* (1996) para la técnica de DGGE.

Estudio microscópico de *Micromonospora* en nódulos de *Lupinus*

A la hora de caracterizar un posible endosimbionte de plantas, resulta especialmente importante determinar la localización exacta que este organismo adopta dentro de la

planta. Conocer la zona del nódulo en la que las cepas de *Micromonospora* se sitúan tras infectarlo, permitiría obtener más información sobre esta interacción y, también, sobre el posible papel que *Micromonospora* tendría en la misma. Para ello, los estudios de microscopía son de gran importancia, dado que de este modo se pueden observar las estructuras vegetales sin que éstas sufran alteraciones importantes.

Para llevar a cabo este estudio, se emplearon tres técnicas de microscopía distintas: óptica, electrónica de barrido y electrónica de transmisión. Los resultados obtenidos para cada una de ellas se exponen a continuación.

*** Microscopía óptica**

Distintos nódulos procedentes de plantas de *Lupinus angustifolius* recogidas en Cabrerizos fueron fijados y cortados en secciones para su observación al microscopio óptico. La distribución de los nódulos mostraba claramente una zona central infectada, rodeada de células vegetales no infectadas y, finalmente, las capas de células de la epidermis del nódulo. En algunos casos se observaron también haces vasculares conectando el nódulo con la raíz.

Puesto que el objetivo de esta parte del trabajo era detectar la presencia de estructuras “anómalas” que pudiesen permitir la localización de bacterias del género *Micromonospora* en los nódulos, se llevó a cabo un barrido total de los cortes obtenidos, buscando en las distintas partes de los mismos. En general, las células vegetales infectadas aparecían repletas de bacteroides, por lo que adquirirían un fuerte color azul debido al azul de toluidina empleado en la tinción de los cortes histológicos de los nódulos, siendo muy complicada la observación de otro tipo de estructuras. Por el contrario, las células vegetales no infectadas presentaban un aspecto mucho más claro, dando la posibilidad de diferenciar mejor las distintas morfologías. El resultado más interesante se encontró en uno de los nódulos analizados, en el cual se detectaron, en algunas de las células del cortex externo, unas estructuras alargadas que, por su tamaño, podrían ser de origen bacteriano (Figura 77). Dichas formaciones aparecían en una zona concreta del nódulo, y adquirirían una clara tonalidad azul debido al colorante, en contraste con las células vegetales, que presentaban un color mucho más tenue. En la

mayoría de los casos, estas estructuras parecían estar incluidas dentro de la pared de las células vegetales o muy próximas a ella, aunque en algunas ocasiones se detectaron en los espacios intercelulares. Sin embargo, este tipo de formaciones se pudieron detectar tan sólo en uno de los nódulos estudiados, por lo que no fue posible obtener una conclusión definitiva.

La mayor limitación técnica de este tipo de microscopía es la poca capacidad de aumento que presenta, dado que, aún empleando el objetivo de 100X, es difícil determinar con claridad qué tipo de estructuras podrían ser las anteriormente descritas. Sin embargo, es muy útil para analizar un gran número de muestras, ya que su preparación y observación es rápida y posibilita realizar una primera aproximación, y un mejor conocimiento de la estructura y distribución de los nódulos de *Lupinus*.

Figura 77.- Imagen de microscopía óptica de un nódulo seccionado de *L. angustifolius*.

La fotografía superior (a) muestra una sección de un nódulo obtenido a partir de plantas silvestres de *L. angustifolius*, en el que se observa de forma general la estructura del mismo. Las diferentes capas de células vegetales forman, de fuera hacia adentro, la epidermis (Ep), el cortex externo (Ce) e interno (Ci) y las células infectadas por bacteroides (Zi). Barra 100 µm.

La imagen inferior (b) muestra la misma sección anterior a mayor aumento, centrada en la zona enmarcada. Se observa la existencia de estructuras alargadas que podrían ser de tipo bacteriano, ubicadas en la zona del cortex externo, lejos de la zona infectada. Algunas de estas estructuras parecen estar dentro de las paredes de las células vegetales (asterisco verde) mientras otras están en los espacios intercelulares (asterisco rojo). Barra 10 µm.

*** Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

La microscopía electrónica de barrido permite la observación en detalle del interior de nódulos que previamente han sido cortados y fijados. Dado que esta técnica tiene una gran profundidad de campo, las imágenes obtenidas tienen un efecto tridimensional, lo que facilita enormemente la interpretación de las imágenes.

Se seleccionaron varios nódulos de plantas de *L. angustifolius* silvestres, así como, también, plantas de *L. albus* crecidas *in vitro* en condiciones controladas, e inoculadas con *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T y *Micromonospora lupini* LUPAC 08. Los nódulos fueron cortados antes de la fijación desde diferentes ángulos, en secciones transversales o longitudinales respecto a la raíz, de forma que se pudiese estudiar el interior de los mismos.

Algunas de las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 78. El interior de los nódulos mantiene la característica distribución epidermis - cortex - zona infectada. De forma similar a lo observado en el microscopio óptico, aparece una zona central formada por células vegetales infectadas, rodeadas de otras capas de células vegetales alargadas y no infectadas. Las células infectadas aparecían llenas de bacteroides de tipo rhizobia, con la morfología bacilar característica en este tipo de nódulos. Curiosamente, los bacteroides observados en nódulos de *L. albus* crecidos en cámara eran notablemente más alargados que los de los nódulos de plantas silvestres de *L. angustifolius*. A pesar de que se apreciaba con claridad las diferentes formas existentes, no se encontró ningún tipo de morfología similar a una hifa. En las células vegetales no infectadas tampoco se pudo localizar ningún tipo de estructura bacteriana que hiciese pensar en la presencia de *Micromonospora* en su interior.

La dificultad de detectar células de *Micromonospora* mediante esta técnica de microscopía podría basarse en dos hechos. El primero de ellos es que, actualmente, se desconoce con certeza el lugar en el que estas bacterias se ubican dentro de los nódulos, y aunque la técnica de FISH y la microscopía óptica han aportado algunas pistas, los resultados obtenidos no son concluyentes.

Figura 78.- Imagen de SEM de nódulos de *L. angustifolius* y *L. albus*.

Esta serie de fotografías muestran imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido a partir de nódulos de *L. albus* crecidos *in vitro* (a, b y c) y de nódulos de plantas silvestres de *L. angustifolius* (d). Se observa una vista general de un nódulo (a), con una zona central infectada (b), cuyas células están llenas de bacteroides (c y d). Se aprecia claramente la diferencia existente entre los bacteroides de las plantas silvestres respecto a los existentes en plantas crecidas *in vitro*, teniendo en cuenta que no se trata de la misma especie de lupino en ambos casos.

Por otro lado, se deben tener en consideración los resultados obtenidos sobre la distribución de *Micromonospora* en los nódulos, que es muy desigual de unos a otros. De hecho, alrededor de la mitad de los nódulos de *Lupinus* parecen no tener este tipo de bacterias en su interior, al menos en forma viable, y del resto, la mayoría tienen poca presencia de *Micromonospora* en su interior. Por lo tanto, la detección microscópica dependerá en gran medida de que los nódulos seleccionados pertenezcan al escaso

grupo de los que tienen una elevada cantidad de *Micromonospora*, lo que implicaría llevar a cabo un análisis de varias decenas de nódulos.

A los dos puntos anteriores habría que añadir el hecho de que, actualmente, se desconoce la forma en la que *Micromonospora* invade los nódulos, lo cual quiere decir que es difícil establecer de antemano la morfología celular buscada. Otras bacterias que establecen interacciones a gran escala con plantas, como los rizobia o *Frankia*, sufren grandes cambios morfológicos al actuar como endosimbiontes. Los rizobia se transforman de forma drástica, perdiendo su viabilidad y pudiendo alargarse hasta siete veces respecto a su tamaño original (Oke & Long, 1999). En el caso de *Frankia*, el cambio es menos notable, aunque se produce una gran proliferación de las formaciones vesiculares, llegando a llenar por completo las células vegetales con este tipo de estructuras (Benson & Silvester, 1993). Aunque en el caso de *Micromonospora* inicialmente se trató de localizar las formaciones típicas de estas bacterias, como hifas y esporas, en realidad no se tiene la certeza de que sea ésta la morfología adoptada por las bacterias del género al actuar como endosimbiontes.

*** Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Este tipo de microscopía emplea secciones ultrafinas de las muestras, y permite la observación de las mismas a grandes aumentos. Por este motivo, la técnica de TEM da la posibilidad de observar diferentes estructuras celulares, como las paredes bacterianas, y de diferenciar con precisión unas estructuras de otras. En el caso de los nódulos, se decidió emplear esta técnica porque permite realizar un análisis a nivel de ultraestructura de los mismos, siendo relativamente fácil localizar organismos que hayan invadido las células vegetales. Sin embargo, a diferencia de la técnica de SEM, en este caso, al trabajar con secciones ultrafinas, se pierde totalmente la profundidad de campo, y con ello, cualquier tipo de efecto tridimensional, por lo que la interpretación de las imágenes se vuelve más complicada, y requiere un mayor conocimiento de las muestras analizadas.

La primera parte del trabajo consistió en el estudio de un cultivo puro de *Micromonospora* mediante TEM, de forma que se tuviera una primera idea de las diferentes morfologías presentadas por este tipo de organismos. De este modo, se podría tratar de localizar las mismas estructuras en el interior de los nódulos.

Algunas de las imágenes obtenidas para la cepa *Micromonospora lupini* LUPAC 08 se muestran en la Figura 79. Las micromonósporas, y en general los actinomicetos, se caracterizan por presentar un crecimiento en forma de hifas alargadas y forman esporas, lo cual da lugar a imágenes de TEM con una gran variedad de formas y tamaños. En función del ángulo con el que se hayan cortado las hifas, se pueden observar morfologías alargadas (en secciones longitudinales de las mismas) o formas circulares (en secciones transversales de los filamentos). Las esporas, al ser esféricas, dan siempre lugar a estructuras circulares.

Figura 79.- Estudio de *Micromonospora lupini* LUPAC 08 mediante TEM.

En las fotografías mostradas se observa un cultivo puro de la cepa *Micromonospora lupini* LUPAC 08 empleando la técnica de TEM. Se aprecian claramente algunas de las formaciones más características en este tipo de bacterias, como la existencia de hifas septadas, señaladas con flechas (a), o de hifas ramificadas en forma de Y, indicadas con un asterisco (b). Barra = 500 nm.

Algunas de las estructuras más características de estas bacterias son fácilmente distinguibles en estas imágenes, como las gruesas paredes celulares, las ramificaciones de una hifa en dos o los septos que dividen unas hifas de otras. Este tipo de formaciones son las que podrían permitir la localización de *Micromonospora* en el interior de los nódulos.

Para llevar a cabo el estudio de los nódulos mediante TEM se seleccionaron algunas plantas de *Lupinus angustifolius* silvestres. A modo de control se obtuvieron plantas de *Lupinus albus* inoculadas en laboratorio sólo con *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 y otras coinoculadas con *Bradyrhizobium* y *Micromonospora lupini* LUPAC 08.

En las imágenes se observa claramente cómo, a pesar de tratarse de una sección ultrafina del nódulo, la morfología de las células vegetales se mantiene intacta, diferenciándose fácilmente la zona infectada (Figura 79). Inicialmente, y desde la base de los resultados obtenidos a través de la técnica de FISH por Rodríguez (2008), se trató de localizar células de *Micromonospora* dentro de la zona infectada del nódulo. Estas células infectadas aparecían llenas de bacteroides, generalmente incluidos dentro de los característicos simbiosomas, lo cual es normal en nódulos efectivos. Se pudieron detectar algunas estructuras que podrían encajar con las características de *Micromonospora*, como estructuras alargadas (de más de 5 µm), no incluidas en un simbiosoma. Sin embargo, al comparar con nódulos control obtenidos en laboratorio a partir de un inóculo de *B. canariense* ISLU 65, en los que en teoría no debería haber presencia de *Micromonospora*, estructuras similares fueron encontradas. Hay que tener en cuenta que los bacteroides pierden la pared celular al infectar las células del cortex del nódulo, por lo que se vuelven pleomórficos, es decir, su morfología y tamaño es variable. Este hecho dificultó notablemente la detección de *Micromonospora* en esta zona, dado que en ella existe una gran variedad de formas y tamaños. Esta variabilidad morfológica hace que, aunque en principio las hifas de *Micromonospora* tienen una longitud mucho mayor que los bacilos de tipo rhizobia, al convertirse en bacteroides su tamaño puede aumentar hasta siete veces, por lo que es complicada la interpretación de las muestras. En algunos casos, los bacteroides pueden incluso adoptar formas de “Y”, pudiendo confundirse con las ramificaciones de las hifas de *Micromonospora* (Oke & Long, 1999).

Puesto que las células vegetales localizadas fuera de la zona infectada por *Bradyrhizobium* presentaban un aspecto menos denso, se trató de centrar en ellas el estudio de detección de *Micromonospora*. De este modo se encontraron algunas estructuras filamentosas que podrían ser de tipo bacteriano, y que encajaban con la morfología de *Micromonospora*, en una zona, además, en la que no podía tratarse de bacteroides, al estar lejos de las células infectadas (Figura 80). El tamaño de los filamentos era, en algunos casos, de en torno a 10 μm . También se observaron secciones de forma circular, que podrían ser originadas por hifas cortadas de forma transversal (como también aparecían en el cultivo puro de *Micromonospora* analizado). Estas estructuras contrastaban claramente con el citoplasma de las células vegetales, siendo más oscuras, lo que apoya la teoría de que se trate de estructuras de tipo bacteriano. En una de las imágenes (Figura 80f) se observa la existencia de lo que podría ser una hifa septada, lo cual supone una evidencia más de que puede tratarse de hifas de este tipo de organismos, y por tanto, podría, potencialmente, corresponder a células de *Micromonospora*.

Otro aspecto importante es el hecho de que, en todos los casos, estas formaciones filamentosas se localizaron en torno a la pared de las células vegetales, y algunas parecían estar incluidas dentro de la misma, formando una invaginación hacia el interior de la célula. Esto, además de presentar una gran correlación con los resultados de la microscopía óptica, muestra que las hifas de *Micromonospora* son capaces de penetrar dentro de las células vegetales, a través de su pared, y por tanto se trataría de un endosimbionte intracelular. Además, sería un claro indicio de una estrecha relación de *Micromonospora* con las leguminosas, implicando un cambio morfológico tanto de *Micromonospora* como de la propia planta.

Por otro lado, el hecho de que las hifas de *Micromonospora* puedan penetrar en las células vegetales a través de invaginaciones de las envueltas de éstas, quedando rodeadas de una membrana producida por las propias células vegetales, presenta una gran similitud con las simbiosis establecidas por los rhizobia y *Frankia* en el interior de los nódulos. En el caso de los rhizobia, la membrana peribacteroidea, formada por las células vegetales, rodea a los bacteroides constituyendo los simbiosomas.

Figura 80.- Imagen de microscopía electrónica de transmisión de nódulos de *Lupinus*.

En esta serie de imágenes se muestran cortes de diferentes nódulos de *Lupinus* analizados por TEM. Se muestra la presencia de bacteroides en un nódulo silvestre de *L. angustifolius* (a), algunos de los cuales presentan un tamaño alargado (b), formando el simbiosoma. Bacteroides de unas 4 μm de longitud (señalados con flechas) fueron observados en nódulos control de *L. albus*, inoculados con *Bradyrhizobium* (c). En las células vegetales no infectadas del cortex se detectó la presencia de estructuras similares a hifas (d, e y f), tanto con formas alargadas (asterisco) como circulares (cruz). En uno de los casos se muestra la existencia de una estructura similar a un septo (indicado con una flecha), que podría determinar que se trata de una hifa bacteriana (f). m; mitocondrias, N; núcleo.

En el caso de las plantas actinorrizas, la similitud es aún mayor, dado que las hifas de *Frankia* pueden penetrar en la células del primordio nodular a través, precisamente, de invaginaciones producidas en la membrana citoplasmática de estas células, y una vez dentro, las hifas permanecen rodeadas de esta misma membrana, en el interior de la cual proliferan tanto hifas como vesículas. Si se observa una fotografía de microscopía de transmisión de un nódulo infectado de este modo por *Frankia*, existe un gran parecido con las fotografías obtenidas de nódulos de leguminosas, en los que *Micromonospora* podría estar penetrando en las células del cortex nodular (Figura 81).

Figura 81.- Invaginaciones de la membrana en células infectadas por *Frankia* y *Micromonospora*.

En las fotografías obtenidas por TEM se aprecia claramente la similitud existente entre las invaginaciones de la membrana citoplasmática de células vegetales de *Alnus rubra* infectadas por *Frankia* (Benson & Silvester, 1993) (a) y de *Lupinus angustifolius* infectadas por *Micromonospora* (b). En ambos casos, la membrana plasmática rodea por completo las células bacterianas (flechas pequeñas), dejando un área vacía entre ella y la propia célula bacteriana (flechas grandes). En el caso de la cepa *Frankia* se observa especialmente bien en las vesículas (V), mientras que en *Micromonospora* se aprecia con total claridad en la hifa (H). Barras de 2 y 0,2 μm , respectivamente)

DISCUSIÓN

A lo largo de este capítulo se ha intentado aportar nuevos datos que completen los ya existentes sobre la, recientemente descrita, interacción *Micromonospora*-leguminosa, desde un enfoque centrado en la presencia y detección de estas bacterias en los nódulos.

En primer lugar, se ha confirmado la capacidad de *Micromonospora* para penetrar en los nódulos, a través de estudios de reinfección *in vitro*, empleando distintas cepas en cultivo puro. Además, se ha descubierto que bacterias de este género aisladas de una planta (*Lupinus*) pueden también infectar nódulos de otras leguminosas, pertenecientes incluso a distintas tribus (*Medicago*). Para conocer la verdadera distribución dentro del género *Micromonospora* de la capacidad de establecer simbiosis con las leguminosas en el interior de los nódulos radicales, sería conveniente llevar a cabo estudios de infectividad a partir de cepas de *Micromonospora* que no hayan sido aisladas de nódulos, como por ejemplo, muchas de las cepas tipo existentes. Sería también interesante saber si las mismas cepas de *Micromonospora*, capaces de penetrar en los nódulos de una especie de leguminosa, podrían igualmente infectar otras especies de la familia, e incluso este tipo de estructuras presentes en plantas actinorrizas, determinando con ello el grado de especificidad de la interacción *Micromonospora*-leguminosa. Si se trata realmente de una interacción distribuida ampliamente dentro del género *Micromonospora* y sin estar sujeta a una estricta relación de especificidad planta-microorganismo, sería una interesante novedad dentro del mundo de las simbiosis establecidas entre plantas y microorganismos, dado que, hasta ahora, las interacciones a gran escala, como las micorrizas y las bacterias inductoras de nódulos fijadores de nitrógeno, suelen estar sujetas a relaciones bastante estrictas y específicas entre una planta en concreto y la especie microbiana con la que interacciona.

Otro de los objetivos planteados en este capítulo era la detección de *Micromonospora* dentro de los nódulos de plantas de *Lupinus angustifolius*, tomada como planta modelo. A través de la clonación del gen *gyrB* se confirmó que el ADN de *Micromonospora* estaba presente en el ADN metagenómico extraído de nódulos de *L. angustifolius*. Este resultado consolida la hipótesis resultante de los experimentos realizados mediante DGGE, en la que se planteaba la posibilidad de que la no detección del gen ARNr 16S

de esta bacteria podría deberse a la baja proporción de su material genético dentro del ADN metagenómico de los nódulos. Además, supone una nueva prueba de que, efectivamente, *Micromonospora* está presente en el interior de los nódulos, eliminando todo atisbo de duda al respecto.

Por otro lado, se han empleado distintas técnicas de microscopía para tratar de localizar las bacterias de *Micromonospora* dentro de los nódulos. Los resultados más claros se obtuvieron a través de la microscopía electrónica de transmisión, que permite un estudio a gran aumento de la ultraestructura del interior de los nódulos. Las imágenes demuestran que existen unas estructuras que no han sido previamente descritas, y que, en base a su morfología, podrían corresponder a células vegetativas de *Micromonospora*. El hecho más sorprendente es que, de ser correcto este planteamiento, las hifas de estas bacterias penetran dentro de las células vegetales, produciendo una especie de invaginación de sus envueltas celulares, localizándose, en todos los casos, en torno a las mismas. De hecho, las imágenes recuerdan en gran medida a la membrana plasmática que rodea las células de *Frankia* al infectar células del primordio nodular, centro de la cual se produce el desarrollo de las vesículas y la fijación de nitrógeno. Este dato indicaría que la simbiosis que las bacterias del género *Micromonospora* establecen con las leguminosas y, probablemente, con las plantas actinorrícicas, implica cambios estructurales de las propias células vegetales, tratándose de una interacción muy estrecha.

El hecho de que existan tantas similitudes entre *Frankia* y *Micromonospora* podría plantear una relación mucho más estrecha entre estos dos géneros bacterianos, más aún de lo que podría indicar su parentesco filogenético. Por un lado, se ha descrito en este trabajo la presencia de, prácticamente, el mismo gen *nifH* en ambos organismos. Además parecen compartir un nicho muy concreto y notablemente cerrado a albergar amplias comunidades microbianas, como son los nódulos fijadores de nitrógeno. Todo ello, unido al hecho de que la forma de infectar células vegetales parece que, potencialmente, podría ser muy similar, abre las puertas a estudiar desde un punto de vista evolutivo, el proceso que ambas bacterias han seguido para llegar a converger a este nivel. A pesar de ello, existe una gran diferencia entre la relación que las especies de ambos géneros establecen con las plantas, dado que *Frankia* es capaz de inducir la formación de nódulos, mientras que *Micromonospora* no.

De confirmarse estos resultados, el papel de *Micromonospora* dentro de los nódulos podría ser notablemente importante, y cambiaría de forma radical el actual concepto de los mismos. Sin embargo, aunque los resultados de microscopía permiten pensar que las formaciones detectadas podrían corresponder a células de *Micromonospora*, el déficit técnico de este tipo de estudios reside precisamente en que no permiten tener la absoluta certeza de que las estructuras observadas corresponden con el organismo buscado, dado que no existe ningún filtro de especificidad. Para ello, se deberían desarrollar otras técnicas, como el seguimiento mediante bacterias de *Micromonospora* transformadas con proteínas fluorescentes que permitan, además de su localización, estudiar el proceso de infección.

DISCUSIÓN FINAL

El descubrimiento de una nueva interacción planta-microorganismo

Las interacciones establecidas entre microorganismos y plantas son muy numerosas, y su importancia, no sólo para el desarrollo de las propias plantas, sino como parte imprescindible para la sostenibilidad del planeta, es indiscutible. Existe un reducido número de microorganismos capaces de actuar como endosimbiontes de plantas a escala global, habiéndose especializado a lo largo de un proceso evolutivo en el que tanto las plantas como los microorganismos han coevolucionado y se han especializado, hasta el punto de, en muchos casos, depender una parte de la otra. Dentro de este grupo quizá los casos más conocidos y estudiados sean las micorrizas y las bacterias fitosimbiontes fijadoras de nitrógeno, como los rhizobia, *Frankia* y algunas cianobacterias.

A lo largo de los últimos años se ha descrito un nuevo tipo de interacción planta-microorganismo que parece tener una distribución global, sin que, sorprendentemente, se hubiese descrito con anterioridad. Se trata de las bacterias del género *Micromonospora* y los nódulos fijadores de nitrógeno, tanto inducidos por *Frankia* en plantas actinorrizas (Valdés *et al.*, 2005) como por los rhizobia en las leguminosas (Fernández-Molinero, 2005; Trujillo *et al.*, 2007b). Aunque se desconoce el verdadero papel que estas bacterias desempeñan para la planta en el interior de los nódulos, algunos trabajos anteriores han señalado que la inoculación de cepas de *Micromonospora* en plantas actinorrizas y leguminosas favorece de algún modo la interacción establecida entre estas plantas y las bacterias responsables de la nodulación, aumentando de forma significativa el número de nódulos que la planta es capaz de desarrollar (Solans, 2007; Cerda, 2008). En ningún caso se ha observado un efecto perjudicial en estas mismas plantas.

En el año 2003 se aislaron las primeras cepas de *Micromonospora* de nódulos de la leguminosa *Lupinus angustifolius*, comenzando con ello toda una línea de investigación que se ha mantenido hasta la actualidad, dentro de la cual se incluye este trabajo. Durante este tiempo se han aislado bacterias de *Micromonospora* del interior de nódulos fijadores de nitrógeno de un gran número de leguminosas, tanto en España como en América Latina. La mayor parte de estos trabajos se han centrado en el aislamiento y caracterización de los microorganismos aislados a partir de diferentes leguminosas,

aunque también se ha tratado de llevar a cabo investigaciones encaminadas a determinar el papel que las bacterias del género *Micromonospora* pueden jugar para la planta, así como la detección de estos microorganismos en los nódulos mediante el marcaje con sondas fluorescentes específicas (Rodríguez, 2008).

La comunidad microbiana presente en los nódulos de *Lupinus*

A pesar de que los nódulos fijadores de nitrógeno han sido objeto de numerosos y variados estudios, el interés de los mismos se ha venido centrando en la caracterización de las bacterias responsables de la nodulación y en el estudio del proceso de infección y de fijación de nitrógeno en el interior de los nódulos. Se han realizado muy pocos estudios que se centren en una estimación real de la diversidad bacteriana presente en los nódulos, dado que habían sido considerados un nicho casi exclusivo de los rhizobia, pudiendo ser éste uno de los motivos por los que nunca antes se habían estudiado las poblaciones de *Micromonospora* que de forma sistemática aparecen en las placas de aislamiento, de una forma además realmente abundante. En esta parte del trabajo se trató de definir con mayor exactitud cual es la comunidad microbiana presente en los nódulos, y si aparte de las poblaciones de *Micromonospora* y *Bradyrhizobium*, había algún otro microorganismo que apareciese de forma sistemática.

El estudio de la diversidad a través de técnicas independientes de cultivo es uno de los principales recursos de la ecología microbiana en la actualidad, permitiendo explorar todo tipo de ambientes de forma rápida y con la posibilidad de recopilar una información mucho más completa, sin la necesidad de cultivar los microorganismos *in vitro* (Pace et al., 1985). Sin embargo, en el caso de los nódulos fijadores de nitrógeno, la técnica de DGGE no aportó datos significativos, más aún, sólo fue capaz de detectar la presencia de *Bradyrhizobium canariense* en las muestras. Por el contrario, los aislamientos volvieron a confirmar que *Micromonospora* está presente en el interior de los nódulos, y son frecuentes los casos en los que se obtienen más colonias de tipo *Micromonospora* que de tipo rhizobia. Esto parece ser contradictorio, pues la explicación más razonable de la ausencia del gen ARNr 16S de *Micromonospora* en los perfiles de DGGE es que la proporción de su ADN respecto al de otros organismos

bacterianos es muy minoritario (inferior al 1% en el total del ADN metagenómico). Sin embargo, deben considerarse dos aspectos importantes que explicarían este hecho. En primer lugar, las células vegetales contienen plastos en grandes cantidades, y dado que su origen parece ser bacteriano, conservan el gen ARNr 16S. Por otro lado, los bacteroides de *Bradyrhizobium*, que permanecen en el interior de las células vegetales infectadas, contienen el material genético de estas bacterias, sin embargo no pueden dar lugar a colonias en las placas de aislamiento, dado que han perdido su viabilidad al especializarse en este tipo de estructuras. Todo ello no significa que las técnicas independientes de cultivo no tengan un gran potencial, que de hecho lo tienen, sino que los nódulos fijadores de nitrógeno forman una comunidad muy particular, para la que este tipo de técnicas presentan grandes inconvenientes frente a los métodos tradicionales de cultivo.

No obstante, la detección de *Micromonospora* a partir del ADN metagenómico fue posible gracias al empleo de oligonucleótidos específicos para amplificar, de forma parcial, el gen de la girasa. La utilización de oligonucleótidos específicos (Carro, 2009) elimina la interferencia que pueden causar otras bacterias, y posibilita el empleo de técnicas independientes de cultivo para estudiar poblaciones bacterianas minoritarias en comunidades complejas, con el inconveniente de que es necesario saber con exactitud qué microorganismo se está buscando. Sin embargo, este resultado supone una evidencia más que da credibilidad al hecho de que *Micromonospora* está, efectivamente, presente en el interior de nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas, de cara a su aceptación por parte de la comunidad científica.

En síntesis, en todas las plantas de *Lupinus* analizadas se encontró que *Bradyrhizobium canariense* es la bacteria responsable de la nodulación de las mismas, y que en una proporción considerable de los nódulos *Micromonospora* estaba presente. Ningún otro tipo de bacteria se encontró en los nódulos de forma tan abundante y sistemática. Sin embargo, se aislaron, más bien de forma puntual y esporádica, otras bacterias, pertenecientes a los géneros *Actinomadura*, *Bacillus*, *Microbispora*, *Paenibacillus*, *Panthoea*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Verrucosispora*.

Se puede concluir, en base a los resultados obtenidos, que los nódulos fijadores de nitrógeno, al menos en los lupinos estudiados, no forman una comunidad microbiana

compleja, dado que suelen ser dos los géneros presentes en ellos: *Bradyrhizobium* y *Micromonospora*. Sin embargo, sí se trata de una comunidad muy compleja en cuanto a su funcionamiento, dada su particularidad. Adicionalmente, existen otros grupos bacterianos que aparecen de forma esporádica, aunque podría ser interesante su estudio de cara a evaluar su posible papel como organismos promotores del crecimiento vegetal o como productores de metabolitos de interés biotecnológico.

La distribución de *Micromonospora* en los nódulos de *Lupinus*

Dado que la existencia de una relación *Micromonospora*-leguminosa es, a tenor de los resultados obtenidos, indiscutible, se planteó la necesidad de conocer el verdadero alcance de la distribución de *Micromonospora* en el interior de los nódulos. Puesto que realizar un trabajo a nivel estadístico de forma estricta supone llevar a cabo un elevado número de muestreos que por sí solo daría lugar a un trabajo de tesis doctoral, se decidió obtener unos datos preliminares que permitiesen una aproximación, aunque no exacta, sí orientativa, sobre la distribución de las poblaciones de *Micromonospora* en los diferentes nódulos.

Las plantas seleccionadas como modelo para llevar a cabo el estudio fueron *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*. Los datos recopilados muestran que la distribución de *Micromonospora* de unos nódulos a otros, incluso dentro de la misma planta, es muy desigual. Casi la mitad de los nódulos seleccionados para llevar a cabo los aislamientos no dieron lugar a ninguna colonia de tipo *Micromonospora*, mientras que de los que sí se obtuvieron este tipo de microorganismos, la cantidad de colonias desarrolladas osciló entre 1 y 29 UFC.

Similares resultados fueron obtenidos a partir de aislamientos de nódulos de plantas de *L. albus* crecidas en condiciones controladas en laboratorio, e inoculadas con una cepa de *Bradyrhizobium canariense* y diferentes cepas de *Micromonospora*, que previamente habían sido aisladas de nódulos de plantas silvestres de *L. angustifolius*. Al realizar aislamientos de todos los nódulos de una misma planta, y los resultados mostraron una vez más la distribución heterogénea de *Micromonospora* en los mismos. Más de la

mitad de los nódulos no dieron lugar a ninguna colonia de *Micromonospora*, mientras que de uno de los nódulos se contabilizó la sorprendente cifra de 354 colonias correspondientes a la cepa de *Micromonospora* inoculada. Esto demostraría que las bacterias de este género tienden a infectar algunos de los nódulos de cada planta (en torno a la mitad) y, por alguna razón todavía desconocida, en un bajo porcentaje de éstos su presencia es realmente abundante, desplazando totalmente la proporción de *Bradyrhizobium* en los mismos.

Estos resultados indicarían, además, que la presencia de *Micromonospora* en cada uno de los nódulos no es esencial para la planta, y que la función de la fijación de nitrógeno en ellos no depende de la presencia o no de estas bacterias.

Dado que no existen otros trabajos similares, los resultados obtenidos no pueden ser comparados ni contrastados. Sería interesante realizar estudios similares para otras plantas de leguminosas, de cara a conocer si se repite el mismo patrón de distribución.

La diversidad de *Micromonospora* en los nódulos de *Lupinus*

Otro de los aspectos interesantes de la interacción *Micromonospora*-leguminosa es que no está limitada a una o a unas pocas especies del género, sino que existe una enorme diversidad específica de bacterias del género *Micromonospora* capaces de establecer esta interacción. Se trata por lo tanto de una capacidad distribuida a lo largo de todo el género, lo cual supone que debió existir un ancestro común que adquirió esta capacidad y se ha transmitido a lo largo del proceso evolutivo. Este hecho da lugar a pensar que, quizá, la mayor parte de las bacterias del género podrían infectar nódulos de leguminosas.

En este trabajo se han caracterizado un total de 95 cepas de tipo actinomiceto aisladas de nódulos de *L. angustifolius* y *L. gredensis*, de las cuales 85 corresponderían, en base a la caracterización genética y fenotípica, a bacterias del género *Micromonospora*. El análisis del gen ARNr 16S de las 44 cepas de *Micromonospora* seleccionadas mostró una gran diversidad de especies, de forma similar a los datos mostrados en otros

trabajos anteriores. Las cepas aisladas se distribuyen a lo largo de todo el árbol filogenético del género, construido en base al gen ARNr 16S de todas las especies validadas del mismo. Se han aislado cepas relacionadas con un total de 15 especies de las 40 que forman el género *Micromonospora* actualmente (*M. aurantiaca*, *M. auratinigra*, *M. chaiyaphumensis*, *M. chersina*, *M. coriariae*, *M. coxensis*, *M. eburnea*, *M. echinofusca*, *M. echinospora*, *M. lupini*, *M. matsumotoense*, *M. narathiwatensis*, *M. olivasterospora*, *M. saelicesensis* y *M. viridifaciens*), algunas de las cuales representan, probablemente nuevas especies. Los nódulos fijadores de nitrógeno se sitúan, por tanto, como una de las principales fuentes de aislamientos de bacterias de este género, siendo además un nicho especialmente interesante para la búsqueda de nuevos compuestos de interés biotecnológico, no en vano se han descrito recientemente nuevas moléculas con actividad antitumoral a partir de micromonósporas aisladas de este tipo de estructuras (Igarashi *et al.*, 2007).

Los datos obtenidos hasta la actualidad demuestran que, aunque como se ha comentado son muy numerosas las especies del género *Micromonospora* aisladas de nódulos, algunas de ellas son más frecuentes. Destaca especialmente la presencia de *Micromonospora saelicesensis*, especie que se ha aislado de la gran mayoría de plantas muestreadas, tanto del género *Lupinus* como en investigaciones llevadas a cabo a partir de otras especies de leguminosas. Además, la estimación del tamaño de la cepa tipo de esta especie muestra un posible fenómeno de contracción genómica, ya que su genoma es significativamente menor que el de otras dos cepas de *Micromonospora* cercanamente relacionadas con *M. saelicesensis*. La contracción genómica es un fenómeno recurrente ampliamente descrito en la historia evolutiva, especialmente presente en organismos endosimbiontes y patógenos estrictos, vinculado a procesos evolutivos relacionados con una alta especialización, dando lugar a una reducción en el tamaño del genoma (Mira *et al.*, 2001; Normand *et al.*, 2007). El que esto se observe en *Micromonospora saelicesensis*, y que además sea la especie más presente en los nódulos de leguminosas, podría indicar que se trata de un organismo más especializado en este tipo de simbiosis.

¿Un nuevo grupo de actinobacterias diazotrofas?

Otro de los resultados más sorprendentes obtenidos a raíz del estudio y caracterización de las cepas de *Micromonospora* aisladas en este trabajo ha sido la capacidad de estas bacterias para crecer en ausencia de nitrógeno asimilable.

Desarrollando una nueva combinación de oligonucleótidos fue posible obtener la secuencia del gen *nifH*, uno de los genes estructurales de la nitrogenasa, la enzima responsable de la transformación de N_2 a NH_3 , para doce de las cepas analizadas. Puesto que la fijación de nitrógeno es un proceso llevado a cabo de forma muy similar por todos los organismos diazotrofos conocidos, exceptuando el caso de *Streptomyces thermoautotrophicus* (Ribbe *et al.*, 1997), la presencia de este gen en las micromonosporas estudiadas podría indicar la existencia de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en las mismas. Además, en todos los casos, las secuencias obtenidas para este gen presentaban una similitud superior al 98% con la correspondiente secuencia de *Frankia alni* ACN14a, lo cual podría indicar la existencia de una probable transferencia horizontal del gen *nifH* de *Frankia alni* a *Micromonospora*. La detección de otros genes implicados en la fijación de nitrógeno en *Micromonospora* podría confirmar una transferencia en bloque de todo el conjunto de genes *nif*, que hayan permitido a estas bacterias adquirir la capacidad de fijar nitrógeno.

Por otro lado, los ensayos de crecimiento en medio libre de nitrógeno, aunque no son concluyentes, parecen indicar una cierta actividad fijadora de nitrógeno en *Micromonospora*. Sin embargo, este tipo de estudios deberán ser confirmados con la aplicación de otras técnicas, especialmente relevante sería la reducción de acetileno a etileno o el análisis de incorporación de N^{15} .

De confirmarse definitivamente la capacidad de *Micromonospora* para fijar nitrógeno, sería interesante estudiar la posibilidad de que estas bacterias lleven a cabo este mismo proceso en el interior de los nódulos. Aunque en principio no hay indicios que hagan pensar que *Micromonospora* pueda fijar nitrógeno para la planta de un modo similar a los rizobia o *Frankia*, al estar presente en las estructuras especializadas, en principio de forma exclusiva, en la fijación de nitrógeno, este hecho no debería ser pasado por alto.

Otro de los hallazgos más significativos obtenidos en este trabajo ha sido la descripción de una nueva estructura que no había sido identificada anteriormente para las bacterias del género *Micromonospora*, y que podría estar relacionada con la fijación de nitrógeno. Se trata de unas estructuras globulares notablemente más grandes que las esporas, de entre 1,5 y 2,5 μm de diámetro, que aparentemente se desarrollan sólo cuando las bacterias crecen en ausencia de nitrógeno, de ahí que se deduzca que puedan estar vinculadas con este proceso. El papel de estas formaciones es aún desconocida, sin embargo, dado que la nitrogenasa es muy sensible al oxígeno y se desnaturaliza de forma irreversible en su presencia, y que *Micromonospora* es un organismo aerobio estricto, si realmente presenta la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, debe ser capaz de proteger a la nitrogenasa del oxígeno, por lo que la utilidad de estas estructuras podría ir en este sentido. Además, es evidente que existe una gran similitud entre estas estructuras globulares y las vesículas que desarrollan las bacterias del género *Frankia* para aislar a la nitrogenasa del oxígeno, pudiendo haber seguido en ambos casos un proceso adaptativo similar. Para confirmar esta hipótesis es imprescindible detectar actividad fijadora de nitrógeno en estas “vesículas”, del mismo modo que en su día se hizo con *Frankia* (Noridge & Benson, 1986; Tisa & Ensign, 1987). En este sentido se está trabajando en la actualidad.

***Micromonospora* como endosimbionte intracelular**

Gracias a los estudios realizados, en este trabajo se muestra por primera vez la ubicación exacta de las células de *Micromonospora* que penetran en los nódulos. Aunque las imágenes obtenidas a través de la técnica de microscopía electrónica de transmisión no son definitivas en cuanto a poder asegurar que las estructuras detectadas corresponden a *Micromonospora*, por lo morfología encontrada parece bastante probable que así sea. En cualquier caso, serán necesarios nuevos estudios que confirmen este punto.

Uno de los aspectos más interesantes observados en este apartado es la existencia de una membrana que envuelve las hifas de *Micromonospora* cuando infectan las células

vegetales. En todos los casos, las imágenes muestran que las estructuras encontradas, potencialmente vinculadas con *Micromonospora*, se encuentran alrededor de la membrana celular, formando invaginaciones de la misma hacia el interior de la célula vegetal. Estas estructuras recuerdan de forma inevitable a las que forman *Frankia* y las plantas actinorrizas, cuando las células bacterianas penetran en las células vegetales que forman el primordio nodular, quedando rodeadas por la membrana plasmática vegetal, dentro de la cual se desarrollan tanto las hifas como las vesículas de *Frankia* (Miller & Baker, 1985).

Tomando como buenos los resultados mostrados en este trabajo, se puede afirmar que *Micromonospora* es capaz, no sólo de infectar los nódulos, sino que se introduce en el interior de las células vegetales ubicadas en el cortex. Este dato es realmente relevante, ya que demuestra que la relación existente entre *Lupinus*, y probablemente otras leguminosas, y *Micromonospora* es muy estrecha y sus implicaciones podrían ser determinantes a la hora de analizar el papel que estas bacterias desempeñan en la planta.

Por otro lado, las interacciones establecidas entre microorganismos y plantas a este nivel, suelen requerir algún mecanismo de reconocimiento mutuo que permita el inicio de la relación simbiótica. Esta fase es imprescindible para que se den este tipo de relaciones, ya que de lo contrario los mecanismos de defensa de la planta se activarían para defenderse de la invasión bacteriana. Un proceso similar al establecido entre las leguminosas y los rhizobia, o entre *Frankia* y las plantas actinorrizas, debería ocurrir en la relación *Micromonospora*-leguminosa, lo cuál sería un interesante tema de estudio.

Además de la localización de *Micromonospora* en el interior de los nódulos, se ha descrito que estas bacterias no presentan una relación de especificidad muy estrecha a nivel de cepa o especie y de la planta con la que establecen la interacción. Por un lado, se ha visto que la especie *M. saelicesensis* está muy ampliamente distribuida en la mayoría de las especies de leguminosas estudiadas. Por otro lado, una misma cepa ha sido capaz de infectar, a partir de un cultivo *in vitro*, plantas de *Lupinus albus* y de *Medicago sativa*. Esto supone un contrapunto a otras interacciones simbióticas similares, en las que se mantiene una estrecha vinculación entre la especie bacteriana y las especies vegetales con las que esta es capaz de establecer la simbiosis, a través de un complejo sistema de reconocimiento químico mutuo.

Similitudes entre *Frankia* y *Micromonospora*

A lo largo de este trabajo se han ido viendo resultados que presentaban una clara relación con aspectos similares descritos previamente para las bacterias del género *Frankia*, lo cual supone una evidente relación entre ambos grupos de actinomicetos.

Por un lado, el hecho más evidente es que en ambos casos se han aislado numerosas cepas de estas bacterias del interior de nódulos fijadores de nitrógeno. En el caso de *Frankia*, siempre restringidas a plantas actinorrizas, con las que establece una estrecha relación simbiótica que da lugar a la aparición de nódulos en un variado grupos de plantas superiores. *Micromonospora* se ha aislado de todo tipo de nódulos fijadores, tanto asociados a *Frankia* como a los rizobia. En este sentido, la diferencia más notable es que *Micromonospora* no ha sido capaz de inducir la formación de nódulos en ninguno de los ensayos realizados.

Por otro lado, todos los aspectos relacionados con la fijación de nitrógeno presentan grandes similitudes. En primer lugar porque se trataría de los dos géneros de actinobacterias que presentan ampliamente esta interesante capacidad, que está presente en muchos tipos de organismos procariotas, muy diferentes unos de otros, pero en un número muy reducido de grupos de bacterias y arqueas. En segundo lugar, parece claro que ha existido una transferencia horizontal del gen *nifH* desde *Frankia alni* hacia *Micromonospora*, dado que la similitud entre ambos genes es muy alta, quedando aún la duda de si *Micromonospora* mantiene en su genoma otros genes *nif* similares a los de *Frankia*. Finalmente, la existencia de estructuras vesiculares en los cultivos de *Micromonospora* crecidos en ausencia de nitrógeno, similares a las vesículas desarrolladas por bacterias del género *Frankia* para poder llevar a cabo la fijación de nitrógeno en condiciones aerobias, supone un nuevo e interesante punto en común entre ambos grupos bacterianos. Sin embargo, este tipo de estructuras no han sido, hasta el momento, localizadas en el interior de los nódulos, lo que podría ser una evidencia que apuntase hacia la posibilidad de que *Micromonospora* fijase nitrógeno en su interior.

Adicionalmente, como se ha indicado anteriormente, las estructuras localizadas en el interior de las células vegetales del cortex nodular, que podrían ser hifas de *Micromonospora*, están rodeadas de una membrana plasmática muy similar a la que envuelve las hifas y vesículas de *Frankia* al penetrar en las células vegetales del primordio nodular.

Puesto que en la actualidad se está trabajando en la secuenciación de varias cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos, tanto de plantas actinorrizas como de leguminosas, los resultados obtenidos a partir de estos trabajos darán la posibilidad de compararlos con las secuencias ya disponibles de varias cepas de *Frankia*. Esta comparación podrá aportar interesantes datos sobre el verdadero alcance de las similitudes expuestas anteriormente, y de los procesos de coevolución y transferencia horizontal de genes que se hayan podido dar entre *Frankia* y *Micromonospora*.

***Micromonospora*-leguminosa: una relación llena de incógnitas**

Generalmente, en el ámbito científico, las investigaciones, a medida que avanzan, van dando pie a otros estudios posteriores. Se obtienen unos resultados que suponen el punto de partida de investigaciones futuras. En el caso de la relación establecida entre bacterias del género *Micromonospora* y las leguminosas, este hecho se da de manera paradigmática. Se trata de una interacción muy estrecha que se ha observado a gran escala, involucrando, hasta la fecha, a todas las especies de leguminosas que se han muestreado. Aunque durante los últimos siete años se ha llevado a cabo un trabajo concreto y focalizado en este tema de investigación, aún son numerosas las preguntas sin respuesta, y, por lo general, las respuestas encontradas abren un gran abanico de posibilidades para continuar estudiando la interesante relación que *Micromonospora* establece con las plantas, y que se ubica en el interior de los nódulos radicales, de la que en la actualidad sólo se conocen algunos detalles.

Hasta la fecha, la mayor parte de los trabajos realizados se han centrado en la descripción y caracterización de las poblaciones de *Micromonospora* encontradas en distintas plantas de leguminosas. Esto ha permitido conocer que el alcance de la

interacción es muy amplio, involucrando a numerosas especies de *Micromonospora* y de leguminosas, así como, probablemente, a todas o casi todas las plantas actinorrizas (aunque su relación con estas plantas ha sido menos estudiada). Se está hablando por tanto, de una relación simbiótica tremendamente extensa, con una distribución posiblemente a nivel global. Este aspecto es, quizá, el único punto que está realmente claro en torno a la relación *Micromonospora*-leguminosas, y el mejor estudiado.

El resto de los datos que se han ido recopilando parecen confirmar que *Micromonospora* actúa como endosimbionte dentro de los nódulos, estimulando la nodulación y mejorando el crecimiento de las plantas (Solans, 2007; Cerda, 2008). Algunos trabajos han descrito la posibilidad de que estas bacterias tengan la capacidad de activar mecanismos de defensa de las plantas (Conn *et al.*, 2008), y presentan actividad contra hongos fitopatógenos (El-Tarabily, 1997; Coombs *et al.*, 2004). Sin embargo, no se conoce con certeza el papel que *Micromonospora* desempeña dentro de las células vegetales, dado que si realmente se introduce en ellas y queda envuelta por sus membranas plasmáticas, esto parecería apuntar más hacia el establecimiento de algún tipo de intercambio molecular, como ocurre con *Frankia*, las micorrizas o los rizobia. En este planteamiento podría tener sentido el hecho de que *Micromonospora* pudiera contribuir en mejorar el rendimiento de la fijación biológica dentro de los nódulos, sin embargo, no se tiene ninguna evidencia al respecto.

Otro de los aspectos que sería interesante analizar es el mecanismo de infección que las bacterias del género *Micromonospora* emplean para penetrar en el interior de los nódulos. Desde el punto de partida, que supone la necesidad de que bacteria y planta se reconozcan mutuamente, hasta el desarrollo de algún mecanismo de entrada, bien de forma intercelular o bien pudiendo formar alguna estructura similar a un canal de infección. Igualmente, sería conveniente realizar nuevos estudios que confirmen la ubicación final en la que las células de *Micromonospora* se localizan dentro de los nódulos, puesto que los resultados de este trabajo parecen indicar que se ubican en el interior de las células del cortex de los nódulos, mientras que los datos del FISH indicarían que también están presentes dentro de las células infectadas, junto a los bacteroides (Rodríguez, 2008). En este sentido, se ha estado trabajando en la obtención de mutantes de *Micromonospora* capaces de expresar una proteína fluorescente de tipo GFP, que permitirían llevar a cabo un seguimiento *in vivo* de todo el proceso. Sin

embargo, existen muy pocas publicaciones sobre métodos adecuados para transformar *Micromonospora*. Recientemente, Anzai *et al.* (2009), han podido obtener transformantes de *Micromonospora* a partir de un derivado del pSET152, mediante conjugación con *Escherichia coli*. Este estudio ha sido un buen punto de partida para nuestro trabajo, aunque hasta el momento no se han obtenido resultados definitivos al respecto.

Asimismo se está trabajando en la secuenciación del genoma de varias cepas de *Micromonospora*, cuyo resultado será una gran herramienta para responder a la que es, posiblemente, la mayor incógnita en torno a la interacción *Micromonospora*-leguminosa: conocer con precisión el papel que estas bacterias desempeñan para la planta. Una vez que esté claro este aspecto, se podría abrir un nuevo campo de aplicación encaminado a buscar el modo de analizar el potencial biotecnológico de estas bacterias y aplicarlo para mejorar los rendimientos agrícolas.

Como se ha expuesto, el conocimiento de la interacción *Micromonospora*-leguminosa es aún escaso y, sin duda, este campo de investigación se seguirá desarrollando y ampliando durante los próximos años.

Publicación en el ISME

Parte de los resultados presentados en este trabajo, han sido recientemente aceptados para ser publicados en el ISME Journal, en especial, los aspectos referentes a la relación que las bacterias del género *Micromonospora* establecen con *Lupinus angustifolius*, u otras leguminosas, en el interior de los nódulos radicales.

Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P. & Martínez-Molina, E. The genus *Micromonospora* is widely spread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *International Society of Microbial Ecology (ISME) Journal*. May 6th 2010 (Doi: 10.1038/ismej.2010.55).

Otras publicaciones

Alonso-Vega, P., Santamaría, R. I., Martínez-Molina, E. & Trujillo, M. E. (2008) *Promicromonospora kroppenstedtii* sp. nov., isolated from garden soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **58**: 1476-1481.

Albarracín, V. H., Alonso-Vega, P., Trujillo, M. E., Amoroso, M. J. & Abate, C. M. (2010) *Amycolatopsis tucumanensis* sp. nov., a copper-resistant actinobacterium isolated from polluted sediments. *Int J Syst Evol Microbiol.* **60**: 397-401.

Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Carro, L., Martínez-Hidalgo, P. & Martínez-Molina, E. Nódulos fijadores de nitrógeno: una fuente inesperada de poblaciones de *Micromonospora* con gran potencial biotecnológico. En: Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones II. SEFIN. (Aceptado, en proceso de publicación).

Igarashi, Y., Wu, L.G., Alonso-Vega, P., Miyana, S., Saitoh, N., Sakurai, H., Saiki, I., Trujillo, M. E. Abyssomicin I, a tetronic acid-containing polycyclic polyketide from *Streptomyces* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (Pendiente de revisión).

Alonso-Vega, P., Carro, L., Martínez-Molina, E. & Trujillo, M. E. *Auraticoccus monumenti* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete isolated from a deteriorated sandstone monument. *Int J Syst Evol Microbiol.* (Pendiente de revisión).

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo han permitido llegar a una serie de conclusiones que, aunque se han comentado de forma más extensa en cada uno de los respectivos capítulos, se resumen de forma global a continuación.

- 1.- La diversidad bacteriana presente en los nódulos de *Lupinus* es muy baja, apareciendo tan sólo dos poblaciones cultivables de forma recurrente: *Bradyrhizobium* y *Micromonospora*.
- 2.- El estudio de la diversidad bacteriana presente en nódulos de *Lupinus* a través de técnicas no dependientes de cultivo (DGGE) no permite obtener mejores resultados que las técnicas dependientes de cultivo.
- 3.- *Bradyrhizobium canariense* es la especie bacteriana que induce la nodulación en todos los *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis* de Salamanca estudiados.
- 4.- El aislamiento de bacterias del género *Micromonospora* en nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*, recogidos en Salamanca, es sistemática. Estos microorganismos presentan una distribución desigual entre distintos nódulos, tendiendo a acumularse en mayores cantidades en unos pocos nódulos.
- 5.- La diversidad encontrada para bacterias del género *Micromonospora* en los nódulos de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis* es muy alta, predominando representantes de las especies *M. coriariae*, *M. echinofusca*, *M. lupini*, *M. olivasterospora* y *M. saelicesensis*. Incluso dentro de un mismo nódulo, existen bacterias pertenecientes a distintas especies del género.
- 6.- Existen numerosas evidencias que parecen indicar que las bacterias del género *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Además, poseen en su genoma un gen *nifH* probablemente adquirido por transferencia horizontal de *Frankia alni*.
- 7.- Cepas de *Micromonospora* aisladas de *Lupinus angustifolius* son capaces de reinfectar, a partir de cultivo puro, nódulos de *Lupinus albus* y de *Medicago*

sativa, siempre y cuando se coinoculen con una bacteria capaz de inducir la nodulación en la mismas.

- 8.- Las células de *Micromonospora* pueden penetrar en el interior de las células vegetales del cortex del nódulo, a través de invaginaciones de la membrana plasmática de las propias células vegetales.

MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales
Métodos**

LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO Y MUESTREO

Todas las cepas estudiadas en este trabajo han sido aisladas de nódulos radiculares de leguminosas salvajes del género *Lupinus*, en concreto de *Lupinus angustifolius* y *Lupinus gredensis*, recogidas en la provincia de Salamanca, en la localidad de Cabrerizos (40° 58' 43" N - 5° 36' 46" W), situada a unos 5 kilómetros de la capital salmantina (Figura 1).

Figura 1.- Zona de muestreo.

En la esquina superior izquierda, un mapa de España (el asterisco rojo en el mapa señala la localidad de Cabrerizos). En la parte inferior, una vista aérea de Cabrerizos (la planta de *Lupinus* indica la zona en la que se recogieron los lupinos).

Las plantas de ambas especies crecían en la cuneta de una carretera secundaria, en un suelo muy arenoso y pobre en nitrógeno, formado en gran parte por los materiales de

construcción de la carretera (arena y grava fina) que se depositaron al preparar la superficie de la calle a modo de terraplén (figura 2A). Se trata de una zona poco transitada en la que los lupinos crecen de forma salvaje entremezclándose entre ellos y con otras especies de herbáceas anuales.

La selección de las plantas se llevó a cabo de forma aleatoria. Se decidió llevar a cabo tres muestreos a lo largo del mes de abril, el primero se realizó a principios del mes de abril, cuando faltaba en torno a un mes para la floración (Figura 2A). El segundo de ellos pocas semanas antes de la floración de los lupinos, debido a que éste es el periodo de máxima actividad en cuanto a la fijación de nitrógeno atmosférico, siendo por tanto los nódulos numerosos y muy efectivos (Figura 2B y 2C). El tercer muestreo se realizó al comienzo de la floración.

Figura 2.- Plantas muestreadas.
Ejemplar de *Lupinus gredensis* silvestre (A). Raíz de *Lupinus gredensis* con algunos nódulos (B). Corte longitudinal de un nódulo en el que se aprecia el color rosado característico, indicativo de una buena fijación de N₂ (C).

Todas las plantas se recogieron con ayuda de una pala, procurando conservar un buen cepellón del suelo original alrededor de las raíces que posteriormente se mando analizar en el Departamento de Edafología de la Universidad de Salamanca, con el fin de poder obtener más información acerca del sustrato en el que crecen los lupinos. Una vez en el laboratorio las plantas fueron regadas y mantenidas en una cámara climatizada con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, una temperatura de 25°C y 15°C respectivamente y una humedad relativa del 55% hasta ser procesadas al día siguiente.

Antes de llevar a cabo los aislamientos de los microorganismos todas las plantas fueron numeradas y medidas (se tomó como referencia la altura de la parte aérea y la máxima longitud que alcanzaba el sistema radicular).

AISLAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

El primer paso para realizar los aislamientos fue separar la tierra de las raíces, para ello se lavaron repetidamente con agua destilada estéril. Una vez limpias las raíces se efectuó un recuento de los nódulos, para posteriormente proceder a separarlos de los pelos radiculares con la ayuda de un bisturí.

La mayor parte de los nódulos fueron congelados a -80°C en glicerol al 20%, una pequeña proporción de ellos (seleccionados entre los aparentemente más efectivos) y sólo de algunos ejemplares de ambas especies fueron procesados para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos presentes en ellos. Para este propósito se empleó el método de Vincent (1970), consistente en la esterilización de los nódulos en una disolución de cloruro de mercurio (HgCl₂) al 2,5% (p/v), manteniéndolos completamente sumergidos durante 2 minutos. Tras este primer paso los nódulos fueron lavados cinco veces en agua destilada estéril para retirar todos los restos del cloruro de mercurio que pudiesen quedar, todo ello en un ambiente estéril. Cada nódulo fue triturado con una varilla de vidrio estéril y el macerado obtenido fue sembrado en placas de Petri con tres medios de cultivo distintos: YMA, Caseína-Almidón y Ácido Húmico (ver Apéndice). Como control de la esterilización se emplearon dos nódulos sin triturar,

uno de ellos que no había sido esterilizado (control negativo) y otro que sí había sido sometido al proceso de esterilización con HgCl_2 (control positivo).

Todas las placas se incubaron a 28°C durante cinco semanas. Durante este tiempo las colonias que iban apareciendo se recogían para purificarlas en nuevas placas de Petri con medio YMA en el caso de microorganismos que presentaban una morfología distinta de los actinomicetos y en M65 (ver Apéndice) para los que sí presentaban características típicas del grupo de los actinomicetales. Estos nuevos cultivos también fueron incubados a 28°C el tiempo necesario para obtener un buen crecimiento y poder recoger suficientes células y conservarlas en una suspensión de glicerol al 20% (v/v) a -80°C.

ENSAYOS DE DGGE

Extracción de ADN de nódulos de *Lupinus*

La extracción del pool de ADN de nódulos de *L. angustifolius* y *L. gredensis* se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito por (Ramírez, 1999), con ligeras modificaciones:

1. Seleccionar un nódulo radical y separarlo de la raíz.
2. Lavar con agua destilada y macerar en un tubo Eppendorf, empleando un micropistilo y nitrógeno líquido.
3. Añadir 200 µl de lisozima (5 mg/ml) e incubar a 37°C durante 20 minutos.
4. Añadir 350 µl de CTAB al 2% (p/v) e incubar en un baño a 65°C durante 60 minutos. Mezclar el contenido ocasionalmente.
5. Añadir 150 µl de CTAB al 1% (p/v), agitando vigorosamente, y añadir 500 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1, v/v).
6. Mezclar con el vortex hasta formar una emulsión y centrifugar a 11000 rpm durante 5 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo, determinando el volumen recogido.

7. Añadir 0,1 volúmenes de tampón CTAB al 10% (p/v) previamente calentado a 65°C y un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1).
8. Repetir los puntos 5 y 6 hasta que no se aprecien restos de proteínas en la interfase del tubo Eppendorf.
9. Precipitar el ADN recogido en el sobrenadante añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 5,2) y un volumen de isopropanol a temperatura de congelación, manteniendo las muestras a -20°C durante al menos una hora.
10. Centrifugar la solución a 13000 rpm durante 15 minutos para precipitar el ADN y descartar el isopropanol. Lavar el pellet con 500 µl de etanol (70%, v/v) frío y centrifugar de nuevo 5 minutos, retirando con cuidado el etanol y dejando secar el pellet al aire.
11. Resuspender el ADN obtenido en 50 µl de tampón TE (pH 8) estéril. Calentar la muestra a 40-45°C durante unos minutos para facilitar el proceso.
12. Mantener el ADN a -20°C hasta su uso.

Amplificación enzimática del gen ARNr 16S

A la hora de seleccionar un marcador genético con el que realizar experimentos de DGGE es importante tener en cuenta que se trate de un fragmento de ADN previamente descrito, secuenciado y depositado en las bases de datos, de tal forma que posteriormente se pueda contrastar la información obtenida, por esta razón el gen que codifica para el ARNr 16S es el más empleado.

Para seleccionar los cebadores más indicados para llevar a cabo la amplificación del gen ribosómico 16S se recurrió a la bibliografía existente de DGGE, seleccionando dos pares de oligonucleótidos: 968F-1401R y 341F-907R (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer & Smalla, 1998). En ambos se trata de oligonucleótidos universales para el dominio *Bacteria*.

El primer par de oligonucleótidos (968F-1401R) amplifica un fragmento de ADN de unas 440 pares de bases, comprendido entre las posiciones 968 y 1401 del mismo. Las secuencias de estos cebadores son:

⇒ 968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3')

⇒ 1401R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3')

En el extremo 5' del oligonucleótido 968F se añade una “cola” de 40 nucleótidos (Casamayor *et al.*, 2000), se trata de una secuencia muy rica en guaninas y citosinas, que forman el llamado GC-clamp. Su misión es actuar como una zona de alto grado de resistencia a condiciones desnaturalizantes, evitando que la doble cadena de ADN se separe por completo y favoreciendo el anclaje de la cadena en el gel. La secuencia correspondiente es:

⇒ GC-clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGGG-3')

La pareja de cebadores 341F-907R amplifica un fragmento de ADN de unas 580 pares de bases. Las respectivas secuencias de ambos oligonucleótidos son:

⇒ 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')

⇒ 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3')

En el extremo 5' del oligonucleótido 341F se añade el mismo GC-clamp descrito anteriormente.

Para cada reacción de amplificación se emplearon los siguientes reactivos y cantidades:

▪ Tampón (10X)	5 µl	<i>Perkin-Elmer</i> [®]
▪ MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	<i>Perkin-Elmer</i> [®]
▪ Seroalbúmina (0,1%)	2 µl	<i>Sigma</i> [®]
▪ Oligonucleótido 1 (20µM)	0,5 µl	<i>Isogen</i> [®]
▪ Oligonucleótido 2 (20µM)	0,5 µl	<i>Isogen</i> [®]
▪ Mezcla dNTP's (10 mM, cada uno)	1 µl	<i>Pharmacia</i> [®]
▪ Taq Gold Polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	<i>Perkin-Elmer</i> [®]
▪ ADN molde	4 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	31,6 µl	

De esta forma se obtiene un volumen final de 50 µl para cada reacción. Para llevar a cabo la amplificación se empleó la técnica “Touchdown PCR”, de acuerdo con el siguiente esquema:

* En cada ciclo la temperatura de anillamiento descende 0,4°C, desde los 59°C hasta los 55,4°C finales.

Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante

El gel con gradiente desnaturalizante se preparó en un equipo Ingeny Phor U-2 (*Ingeny*[®]) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a la metodología descrita por Schäfer *et al.* (2001), empleando un gradiente máximo de 60% en la parte inferior del gel y de 35% en la superior.

Para conseguir esto se partió de dos soluciones stock, preparadas en fresco o con pocos días de antelación. La preparación de cada una de estas soluciones se llevó a cabo de la siguiente forma:

	<u>Solución stock 0%</u>	<u>Solución stock 80%</u>
Acrilamida - Bisacrilamida (37:1) 40% (v/v) (<i>AppliChem</i> [®])	20 ml	20 ml
Tampón TAE 50X	2 ml	2 ml
Urea (<i>Fluka</i> [®])	0 g	33,6 g
Formamida desionizada (<i>AppliChem</i> [®])	0 ml	32 ml
Agua miliQ	78 ml	Ajustar a 100 ml

El gradiente desnaturalizante del gel de poliacrilamida se preparó empleando la pieza gradiente incluida en el equipo y una bomba de caudal fijo de 5 ml/min. La parte

inferior del gel estaba formada por una concentración desnaturalizante fija del 80%, la intermedia es el propio gradiente (de 60% hasta 35%) y la superior, que formaba los pocillos del peine, se preparó empleando una solución de relleno del 0%. Los volúmenes empleados de cada una de las soluciones stock fueron los siguientes:

	<u>Solución stock 0%</u>	<u>Solución stock 80%</u>
Parte superior del gel (0%)	6 ml	0 ml
Inicio del gradiente (35%)	12,4 ml	9,6 ml
Fin del gradiente (60%)	6 ml	18 ml
Parte inferior del gel (80%)	0 ml	3 ml

De esta forma se consigue un gel con una concentración de acrilamida del 8% en tampón TAE 1X. Se cargan 25 µl de reacción de PCR y se someten a electroforesis a temperatura fija de 60°C, en tampón TAE a 90 V durante 17 horas.

El gel de acrilamida se tiñe en un baño de bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 20 minutos, y se lava posteriormente en agua miliQ durante otros 20 minutos. Posteriormente se visualiza y fotografía, y las bandas de interés son seguidamente cortadas en un transiluminador y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

Reamplificación y secuenciación

El ADN presente en las bandas de acrilamida cortadas se recupera en agua MiliQ. Para ello, las bandas son sumergidas en primer lugar en 200 µl de agua MiliQ durante dos horas a temperatura ambiente, permitiendo que se rehidraten. Posteriormente se retira el volumen de agua sobrante y se añaden 50 µl de agua MiliQ, dejando que el ADN se eluya durante la noche a 4°C (Schäfer & Muyzer, 2001).

La reamplificación se lleva a cabo según el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la única diferencia de la sustitución del oligonucleótido con GC-

clamp por su equivalente sin la “cola”. En este caso no es necesario realizar una “Touchdown PCR”, quedando el programa de PCR de la siguiente manera:

Para obtener la secuencia de los genes estudiados se emplearon los mismos oligonucleótidos reversos que en la PCR respectiva. Las secuencias obtenidas fueron corregidas de forma manual con el programa Chromas y comparadas con las depositadas en las bases de datos BLASTn (Brenner, 1995) y EzTaxon (Chun *et al.*, 2007), a fin de conocer las bacterias presentes en las muestras analizadas.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PERTENECIENTES AL GÉNERO *Bradyrhizobium*

Extracción de ADN

Tras dos días de incubación en medio YMA se obtuvo un cultivo suficientemente crecido como para recoger en un tubo Eppendorf una pequeña cantidad de células, que se resuspendieron en 300 µl de agua estéril. Se centrifugó la biomasa a 12000 rpm durante 10 minutos y posteriormente se retiró el sobrenadante. Las células se lavaron con 200 µl de sarcosil (N-Laurilsarcosina) y se volvió a centrifugar de la misma forma, retirando igualmente el sarcosil. Tras estos pasos previos se añadieron 100 µl de NaOH (0,05M), se resuspendieron las células y se calentaron en un termoblock a 100°C durante 5 minutos. En este paso se produce la lisis de las células. Finalmente se añadieron 600 µl de agua miliQ estéril y la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos para separar la biomasa del ADN, recogiendo 500 µl del sobrenadante (ADN suspendido en agua) manteniéndolo a -20°C hasta su utilización.

Caracterización mediante TP-RAPD's

Con el fin de establecer un agrupamiento de los aislados en función de su similitud se decidió obtener los perfiles de bandas de TP-RAPD (Rivas *et al.*, 2001a).

La reacción en cadena de la polimerasa se llevó a cabo empleando dos oligonucleótidos diseñados en base a zonas especialmente conservadas del gen ribosómico 16S. La secuencia de ambos oligonucleótidos se expone a continuación:

⇒ 879F (5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA-3')

⇒ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3')

Los números 879 y 1522 corresponden a esas mismas posiciones en el gen ribosómico 16S de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978).

Para cada reacción de RAPD se emplearon los siguientes reactivos y cantidades:

▪ Tampón (10X)	2,5 µl	Perkin-Elmer [®]
▪ MgCl ₂ (25 mM)	5,9 µl	Perkin-Elmer [®]
▪ Seroalbúmina (0,1 %)	1 µl	Sigma [®]
▪ Oligonucleótido 879F (20µM)	2,5 µl	Isogen [®]
▪ Oligonucleótido 1522R (20µM)	2,5 µl	Isogen [®]
▪ Mezcla dNTP's (10 mM, cada uno)	0,5 µl	Pharmacia [®]
▪ Taq Gold Polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	Perkin-Elmer [®]
▪ ADN molde	2 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	7,7 µl	

De esta forma se obtuvo un volumen final de 25 µl. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo con los siguientes parámetros:

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (*Seakem LE agarose*, Rockland) con bromuro de etidio. Se empleó el tampón TAE en una cubeta de BIO-RAD[®] (*Wide Mini-Sub Cell GT*) cargando 15 µl de cada reacción. Como referencia de peso molecular se utilizó un marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker VI*, 0.15-2.1 Kbp. ROCHE[®]). La electroforesis se llevó a cabo con una intensidad de 80 voltios durante dos horas.

Amplificación y secuenciación del espacio intergénico ITS1

A partir de las cepas seleccionadas mediante TP-RAPD se llevó a cabo la amplificación por PCR del fragmento intergénico comprendido entre los genes codificantes para el ARNr 16S y 23S (ITS1). Para obtener una cantidad de producto de PCR suficiente para llevar a cabo la secuenciación se emplearon dos reacciones de 50 μ l cada una con los siguientes reactivos y volúmenes:

▪ Tampón (10X)	5 μ l	Perkin-Elmer [®]
▪ MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l	Perkin-Elmer [®]
▪ Seroalbúmina (0,1 %)	2 μ l	Sigma [®]
▪ Oligonucleótido ITSP1F (20 μ M)	0,5 μ l	
▪ Oligonucleótido ITSPN1R (20 μ M)	0,5 μ l	
▪ Mezcla dNTP's (10 mM, cada uno)	1,25 μ l	Pharmacia [®]
▪ Taq Gold Polimerasa (5 U/ μ l)	0,8 μ l	Perkin-Elmer [®]
▪ ADN molde	3 μ l	
▪ Agua MiliQ estéril	32,95 μ l	

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la amplificación son:

⇒ ITSP1F (5'-TGCGGCTGGATCACCTCC-3')

⇒ ITSPN1R (5'-CMCGTCCTTCATCGSCTC-3')

Las reacciones de PCR se realizaron según el esquema de tiempos y temperaturas que se expone a continuación:

Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa al 1% en TAE y teñidos con bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento ITS1 fue cortada con un bisturí.

Una vez extraídas las bandas del gel de agarosa se realizó la purificación de los productos amplificados de acuerdo al sistema de purificación de Qiagen (*Qiaquick spin columns*[®]) según el siguiente protocolo:

1. Añadir 300 µl de tampón QG por cada 100 mg de agarosa.
2. Calentar las muestras a 50 °C para disolver completamente la agarosa en el tampón.
3. Pasar el volumen completo a una columna de purificación y centrifugar a 14000 rpm durante un minuto.
4. Eliminar el líquido del fondo de la columna y añadir 500 µl de tampón QG, centrifugando del mismo modo que en el punto 3.
5. Eliminar el líquido filtrado y añadir 700 µl de tampón PE, dejando que actúe durante cinco minutos antes de centrifugar nuevamente a 14000 rpm durante un minuto, eliminando posteriormente el líquido resultante y centrifugando una vez más para limpiar la membrana.
6. Pasar la columna de purificación a un tubo Eppendorf y añadir 40 µl de tampón EB sobre la membrana, esperando cinco minutos y centrifugando un minuto a 14000 rpm. En el tubo Eppendorf queda recogido el fragmento de ADN amplificado.

Tras la purificación de las bandas se empleó 1 µl de los productos obtenidos para separarlos por electroforesis en un gel de agarosa al 1% para determinar la cantidad necesaria para llevar a cabo la secuenciación (se requieren 100 ng de ADN). Una vez determinada la cantidad de producto purificado necesaria, se enviaron las reacciones al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. La secuenciación se realizó en un secuenciador capilar ABI PRISM (Applied Biosystems), empleando “Big Dye Terminador v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems). Para obtener la secuencia completa del espacio intergénico ITS1 se emplearon dos oligonucleótidos:

- 3 µl de ITSP1F (1 µM)

- 3 µl de ITSPN1R (1 µM)

Análisis del espacio intergénico ITS1

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y corregidas empleando el programa Chromas. Las dos secuencias correspondientes a cada parte del espacio intergénico ITS1 se ensamblaron empleando el programa Seqman, incluido en el paquete informático DNA Star (Lasergene), obteniendo una secuencia consenso correspondiente al espacio intergénico completo.

Los ITS de todos los aislados analizados fueron alineados empleando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998), generándose con ello un archivo .aln que fue procesado con el programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007), mediante el cual se llevaron a cabo los análisis filogenéticos presentados en este trabajo.

ENSAYOS DE NODULACIÓN EN *Lupinus albus* CON CEPAS DE *Bradyrhizobium canariense*

A fin de analizar la capacidad noduladora de los aislados de tipo *Bradyrhizobium*, se llevaron a cabo ensayos de inoculación en plantas de *Lupinus albus*. Se seleccionó esta planta debido a que presenta semillas con alto poder de germinación y su porte es el adecuado para poderse mantener en cámaras iluminadas y pertenece al mismo género que las plantas de las que fueron aisladas las cepas bacterianas (*Lupinus gredensis* y *Lupinus angustifolius*).

La cepa de *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 fue empleada como control positivo. Del mismo, las cepas depositadas en la colección alemana de cultivos (DSMZ) como *Rhizobium lupini* (DSM 30140^T y DSM 30134) fueron incluidas en el estudio con el fin de resolver la complicada situación taxonómica de esta especie. Como control negativo se dejaron varias plantas sin inocular.

Las semillas de *Lupinus albus* fueron esterilizadas en una solución de hipoclorito sódico comercial, quedando sumergidas en agitación durante doce minutos. Posteriormente se lavaron cinco veces sucesivas con agua destilada estéril y se dejaron sumergidas completamente en agua durante una hora, para conseguir reblandecer su cutícula exterior y permitir una fácil germinación. Las semillas se depositaron en placas de Petri rodeadas en su parte inferior y superior con papel del filtro estéril, siendo regadas con 2-3 ml de agua cada vez que el papel se secaba. La germinación de las semillas tarda entre 4 y 8 días, en función de la humedad y la temperatura. Tras este periodo son introducidas en vasos con vermiculita estéril (en autoclave, a 121°C y 15 atmósferas de presión, durante una hora).

Las plantas se mantuvieron en una cámara climatizada con un fotoperiodo de 16 horas de luz, seguido de 8 horas de oscuridad, a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 55%. Las plantas fueron alternativamente regadas con agua y con una solución de nutrientes libre de nitrógeno (Rigaud & Puppo, 1975).

Después de 7 días las plantas emergieron y los cotiledones aparecieron separados, con las primeras hojas saliendo. En este momento se inocularon con una suspensión de *Bradyrhizobium canariense* (McFarland 5) sobre la base del tallo.

Una vez transcurridas 6 semanas, las plantas son extraídas de los vasos de vermiculita y las raíces separadas de la parte aérea. Se lavaron las raíces con agua abundante y se realizó un recuento de nódulos. Finalmente, se llevó a cabo un reaslamiento de las bacterias presentes en los nódulos. Los nódulos restantes fueron mantenidos a -80°C en una suspensión de glicerol (20%, v/v).

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CEPAS DE TIPO ACTINOMICETO

Tinción Gram, morfología y características de cultivo

Se emplearon cultivos jóvenes, de unos 7 días de edad, para realizar tinciones de Gram. Las tinciones obtenidas fueron observadas a través de un microscopio óptico, prestando atención a la coloración resultante, así como a la morfología que presentaban los aislados.

Del mismo modo se seleccionaron cultivos de varias edades para realizar estudios de microscopía electrónica de barrido, con el fin de estudiar al detalle la morfología de las células y de las esporas.

Finalmente, se utilizaron diferentes tipos de medios de cultivo para estudiar las condiciones óptimas de crecimiento de las actinobacterias aisladas, analizando igualmente la producción de pigmentos, aparición de micelio aéreo, coloración y forma de las colonias. Para ello se emplearon diferentes medios de cultivo: YMA, Avena, Bennett, M65 y SA1.

Caracterización fisiológica de los aislados

Para la realización de las diferentes pruebas fenotípicas que a continuación se exponen, se prepararon inóculos de todos los aislados. Para ello las cepas fueron cultivadas en medio M65 durante una semana, incubándolas a 28 °C. Tras este periodo de crecimiento se realizaron suspensiones de los cultivos en solución salina (NaCl 0,85%, p/v) y se tomaron 10 µl de cada suspensión para inocular las distintas pruebas.

*** Utilización de fuentes de carbono**

La capacidad de las cepas aisladas para emplear diferentes carbohidratos y aminoácidos como fuentes de carbono se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Williams *et al.* (1983). Se analizaron un total de 28 compuestos:

Alanina	Gluconato de sodio	Melibiosa	Sorbitol
Almidón	Glucosa	Prolina	Sorbosa
Arabinosa	Histidina	Rafinosa	Tirosina
Arginina	Lisina	Ramnosa	Trehalosa
Celobiosa	Maltosa	Sacarosa	Valina
Fructosa	Manosa	Salicina	Xilosa
Galactosa	Melecitosa	Serina	Xylitol

La preparación de los medios se realiza en tres partes:

Fuente de carbono → Se empleó una concentración final del 1% en el caso de los hidratos de carbono y del 0,1% para los aminoácidos. Las soluciones se esterizaron por tindalización a 100°C durante 30 minutos, repitiendo el proceso tres días consecutivos.

Fuente de nitrógeno → Se empleó una base de nitrógeno pura (Yeast nitrogen base 10X de DIFCO®) según las instrucciones del fabricante. Esta solución se esterilizó por filtración.

Solución mineral y agar → Se preparó una solución mineral de KH_2PO_4 y MgSO_4 , teniendo en cuenta que la concentración final será de 50 mg por cada 100 ml de medio. En esta solución se añadió el agar (con una concentración final de 1,8%) y se esterilizó en autoclave. A esta solución se le añadieron las otras dos, para finalmente repartir su contenido en placas de Petri.

El control positivo se obtuvo añadiendo glucosa al medio y el control negativo dejándolo sin ningún tipo de fuente de carbono. Todas las placas se inocularon con las

respectivas suspensiones bacterianas y se incubaron a 28°C. Los resultados se recogieron a los 7, 14 y 21 días.

*** Tolerancia a pH**

El rango de tolerancia a pH de los aislados se estudió empleando como medio basal el M65, ajustándolo a los diferentes pHs analizados (4,5; 5,5; 7; 8 y 9) mediante diferentes soluciones tampón.

Solución tampón ácido cítrico - hidrogenofosfato disodio:

Para los medios con pH ácido (4,5 y 5,5) se empleó una solución de ácido cítrico 0,2M y otra de Na₂HPO₄ 0,4M. Se añadieron a 100 ml de medio M65 (doblemente concentrado) los volúmenes de cada una de ellas que a continuación se indican:

<u>pH</u>	<u>X ml de ácido cítrico</u>	<u>Y ml de Na₂HPO₄</u>
4,5	54,6	45,4
5,5	43,1	56,9

Solución tampón de Tris (hidroximetil) aminometano:

Para obtener los medios con pH básico (8 y 9), se preparó una solución de Tris 0,2M y otra de HCl 0,2M. Se añadió, por cada 100 ml de medio M65, 50 ml de Tris 0,2M y el respectivo volumen de HCl 0,2M, que se indica en la siguiente tabla:

<u>pH</u>	<u>X ml HCl</u>
8	29,2
9	0,2

El control positivo (pH 7) se obtuvo preparando el medio normalmente, ajustándolo con KOH. Todas las placas se inocularon e incubaron a 28°C. Los resultados se recogieron a los 7, 14 y 21 días.

*** Tolerancia a temperatura**

El estudio de la capacidad de las actinobacterias para crecer a diferentes temperaturas se realizó empleando el medio M65. Las placas fueron preparadas normalmente, inoculadas e incubadas a 4°C, 12°C, 22°C, 28°C, 37°C y 44°C. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

*** Tolerancia a salinidad (NaCl)**

La capacidad de las cepas aisladas para crecer a diferentes concentraciones de salinidad (cloruro sódico) fue analizada empleando el medio M65, añadiendo la cantidad necesaria de NaCl para obtener las concentraciones de estudio (1%, 3%, 5%, 7%, p/v). El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

*** Hidrólisis de almidón**

La capacidad de las bacterias aisladas de producir enzimas amilolíticas (como las amilasas) que hidrolizan el almidón se evaluó suplementando el medio M65 con un 10% de almidón de patata. Las placas se incubaron tras la inoculación de las bacterias a 28°C durante 14 días. Tras ello, las placas se cubrieron con lugol, que es empleado como revelador. El almidón no degradado reacciona con el lugol (yodo) dando lugar a la aparición de un color marrón o azul oscuro. La ausencia de un halo alrededor de las bacterias indica un resultado negativo.

*** Hidrólisis de arbutina y esculina**

La arbutina es un glucósido que puede ser hidrolizado por la acción de algunas bacterias mediante la acción de la enzima β -glucosidasa, originando un color negro en el medio que contiene sales de hierro.

La esculina es un derivado cumarínico que puede ser hidrolizado dando como resultado glucosa y esculetina de aglucona. La esculetina es un derivado aromático que reacciona con el hierro dando lugar a la aparición de un color negro.

En ambos casos se empleó el medio diseñado por Williams *et al.* (1983) para llevar a cabo las pruebas (ver Apéndice). El resultado es negativo si tras la incubación mantiene su color previo, siendo positivo si se oscurece. Los cultivos se incubaron a 28°C, realizando lecturas a 7, 14 y 21 días. Como control negativo, se utilizó un medio carente de arbutina o esculina.

*** Degradación de la caseína**

La caseína es una fosfoproteína presente en la leche que puede ser degradada por la acción de caseinasas. Para analizar la capacidad de las cepas bacterianas de asimilar este compuesto, se empleó el medio M65 suplementado con 1% (p/v) de leche desnatada en polvo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días. El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si a pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

*** Degradación de gelatina**

La gelatina es una proteína resultante de la degradación parcial del colágeno. Con esta prueba se evaluó la capacidad de las bacterias estudiadas de producir enzimas proteolíticas (gelatinasas) que degraden la gelatina. Para ello se suplementó el medio M65 con 0,4% (p/v) de gelatina en polvo. Las placas se incubaron durante 14 días a 28°C, tras lo cual se cubrieron con una solución reveladora compuesta por HgCl₂ (ver Apéndice). La aparición de un halo de degradación transparente alrededor de las bacterias indica un resultado positivo.

*** Degradación de urea**

La urea es un compuesto químico nitrogenado resultante del metabolismo de las proteínas. Dicho compuesto puede ser degradado por aquellos microorganismos capaces de sintetizar la enzima ureasa, produciendo con ello amoníaco y dióxido de carbono. La capacidad bacteriana de liberar al medio la enzima ureasa se evaluó en caldo de urea (Fluka), que incluye un indicador de pH (rojo fenol) que vira de rosa a púrpura al liberarse el amoníaco, dando lugar a un resultado positivo. Si el medio se mantiene amarillo, el resultado sería ureasa negativo. Se emplean cepas de *Proteus mirabilis* y *Escherichia coli* como controles positivo y negativo respectivamente.

*** Hidrólisis de Tween**

La hidrólisis de polisorbatos de la serie tween se produce por la acción de enzimas lipasas. En este caso se emplearon como sustratos el tween 20 (monolaurato de polioxietilén sorbitán) y el tween 80 (monooleato de polioxietilén sorbitán). El medio utilizado (ver Apéndice) contenía uno de los dos polisorbatos, además de cloruro de calcio y otros nutrientes (Sierra, 1957). La hidrólisis del tween libera ácidos grasos que reaccionan con el ión Ca^{2+} , formando un precipitado alrededor de las bacterias. No se observa precipitado si los microorganismos no son capaces de degradar el tween.

*** Prueba de la catalasa**

La catalasa es una proteína que se encuentra en una gran mayoría de los organismos expuestos al oxígeno, ya que supone una defensa ante la acción del peróxido de oxígeno resultante del metabolismo del oxígeno, que debe ser eliminado rápidamente debido a su alta toxicidad. Cataliza la descomposición del peróxido de oxígeno en agua y oxígeno (McLeod & Gordon, 1923). La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de H_2O_2 al 30% (Panreac) sobre un cultivo bacteriano joven, siendo visible gracias a la aparición instantánea de burbujas de oxígeno.

*** Prueba de la oxidasa**

La citocromo C oxidasa es una compleja proteína transmembrana, presente en bacterias y mitocondrias, que interviene en la cadena transportadora de electrones, permitiendo a los organismos emplear el oxígeno en la generación de energía (Kovacs, 1956). La presencia de la oxidasa se evalúa mediante la adición de unas gotas de N, N, N', N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina diclorhidrato (Fluka) al 1% en agua, sobre un cultivo bacteriano fresco. La fenilendiamina se oxida rápidamente a azul de indofenol en presencia de la citocromooxidasa y oxígeno, siendo un resultado positivo si aparece una coloración azul-morada en menos de 20 segundos.

Estudio de la capacidad de crecimiento de los aislados en medio sin nitrógeno

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las bacterias del género *Micromonospora* para fijar nitrógeno atmosférico, se seleccionaron las cepas LUPAC 08, LUPAC 09 y MIA 32 para llevar a cabo estudios de crecimiento en medio sin nitrógeno. Cultivos de *Paenibacillus polymyxa* y *Streptomyces coelicolor* fueron empleados como cepas control.

Las cepas de *Micromonospora* fueron crecidas en medio M65 líquido durante 4 días, mientras que las cepas de *Paenibacillus polymyxa* y *Streptomyces coelicolor* fueron cultivadas durante 48 horas en medio YMA y M65 respectivamente. Parte de la biomasa obtenida se inoculó en los diferentes medios empleados:

- Medio sólido: Siembra en estría.
- Medio semisólido: Inóculo por picadura hasta el fondo del tubo.
- Medio líquido: Se inocularon 100 µl de cultivo.

En todos los casos se empleó el medio BAP modificado N^-C^+ (ver Apéndice) para realizar los estudios. Como control positivo se utilizó el medio N^+C^+ mientras que el medio N^-C^- se empleó como control negativo.

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS DE TIPO ACTINOMICETO

Extracción de ADN

A partir de cultivos frescos en medio M65 (tras cinco días de incubación), se recogió una pequeña cantidad de células, suspendiéndolas en un tubo Eppendorf con 300 µl de agua destilada estéril. La biomasa obtenida se precipitó por centrifugación a 12000 rpm durante 10 minutos y se mantuvo a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN, para lo cual se empleó el Kit de SIGMA[®] “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” con el siguiente protocolo:

1. Añadir 80 µl del “extraction solution”, de forma que el pellet de células este totalmente cubierto. Resuspender la biomasa.
2. Incubar a 95 °C durante 10 minutos para provocar la lisis celular.
3. Añadir seguidamente 80 µl de “dilution solution”.
4. Agregar 100 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (en solución 25:24:1). Mezclar hasta conseguir una suspensión de color lechoso y centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos.
5. Recoger 100 µl de la fase superior y añadir 100 µl de cloroformo-isoamílico (en solución 24:1), mezclando bien la solución hasta obtener una sola fase.
6. Centrifugar de nuevo a la misma velocidad durante cinco minutos y recoger 80 µl de la fase superior (ADN bacteriano). Conservar a -20°C hasta su uso.

Caracterización mediante BOX-PCR

A partir del ADN recogido de todos los aislados que morfológicamente se identificaron como pertenecientes al grupo de las actinobacterias se elaboraron los patrones genéticos correspondientes a la técnica BOX-PCR (Versalovic *et al.*, 1994).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo empleando el Kit de SIGMA® “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit”. Para cada reacción de PCR se emplearon los siguientes reactivos y volúmenes:

- Mezcla de PCR 10 µl Sigma®
- Mezcla “extraction-dilution” 2 µl Sigma®
- Oligonucleótido BOXA1R (20µM) 2,5 µl
- ADN molde 2 µl
- Agua MiliQ estéril 3,5 µl

⇒ BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')

Los parámetros de tiempo y temperatura empleados para la amplificación fueron los que se exponen en el siguiente gráfico:

Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v) en TBE. Se cargaron 4 µl de cada reacción y 3 µl de la escalera XIV (dilución 1 en 3), empleando unos pocillos de 3 mm de ancho y 1 mm de grosor. El voltaje empleado fueron 75 voltios, aplicados durante tres horas.

Caracterización mediante TP-RAPD

Del mismo modo que en el caso de los perfiles de BOX-PCR, se obtuvieron los perfiles de bandas basados en la técnica de TP-RAPD (Rivas *et al.*, 2001a) para el mismo grupo de aislados. Igualmente se empleó, para la amplificación mediante PCR, el Kit de SIGMA® “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” en base a los reactivos y volúmenes que se explican a continuación:

▪ Mezcla de PCR	10 µl	Sigma®
▪ Mezcla “extraction-dilution”	2 µl	Sigma®
▪ Oligonucleótido 879F (20µM)	2,5 µl	
▪ Oligonucleótido 1522R (20µM)	2,5 µl	
▪ ADN molde	2 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	1 µl	

Los cebadores empleados para realizar la amplificación están basados en regiones conservadas del gen ribosómico 16S:

⇒ 879F (5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGCA-3')

⇒ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3')

Los números 879 y 1522 corresponden a esas mismas posiciones en el gen ribosómico 16S de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1978).

El programa de la temperatura y el tiempo empleados para la obtención de los perfiles de TP-RAPD está representado en el siguiente gráfico:

Una vez obtenidos los productos resultantes de la PCR se llevó a cabo su separación mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (p/v), empleando el tampón de corrido TAE 1X. Se cargaron 5 µl de los productos de PCR y 1,2 µl del marcador VI. El voltaje empleado fueron 80 voltios, durante 135 minutos para obtener una buena separación de las bandas.

Caracterización mediante ARDRA

La técnica ARDRA se basa en la digestión con enzimas de restricción del gen ribosómico 16S. Es necesario por tanto, en un primer paso, amplificar el gen ARNr 16S, para ello se realizó una PCR a partir de los reactivos del “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®]:

▪ Mezcla de PCR	12 µl	<i>Sigma</i> [®]
▪ Mezcla “extraction-dilution”	2,5 µl	<i>Sigma</i> [®]
▪ Oligonucleótido SF1 (20µM)	0,8 µl	
▪ Oligonucleótido 1522R (20µM)	0,8 µl	
▪ ADN molde	1 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	8 µl	

Los oligonucleótidos empleados en la PCR están contruidos en base a regiones conservadas del gen ribosómico 16S, cuyas secuencias son las siguientes:

- ⇒ SF1 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')
- ⇒ 1522R (5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3')

El oligonucleótido SF1 corresponde a la posición 27 del gen ribosómico 16S de *Escherichia coli*, mientras que el 1522R se corresponde con la posición 1522 (Brosius *et al.*, 1978).

El siguiente gráfico representa los parámetros de tiempo y temperatura empleados en la “reacción en cadena de la polimerasa”.

Tras comprobar la correcta amplificación de los productos de PCR (en un gel de agarosa al 1% y cargando 2 µl de los mismos para someterlos a electroforesis) se digiere el gen con las enzimas de restricción. En este caso los perfiles se obtuvieron a partir de cuatro enzimas distintas, seleccionadas entre las que presentaban una mayor diversidad de los patrones teóricamente obtenidos para las cepas tipo con el programa informático Workbench 3:

<u>Enzima</u>	<u>Sitio de corte (↓)</u>	<u>Casa comercial</u>
Bsh1285I	5'- CGRY↓CG -3'	<i>Fermentas</i> [®]
FspBi	5'- C↓TAG -3'	<i>Fermentas</i> [®]
Hin6I	5'- G↓CGC -3'	<i>Fermentas</i> [®]
PstI	5'- CTGCA↓G -3'	<i>Fermentas</i> [®]

Las digestiones se llevaron a cabo para cada enzima por separado, siguiendo el siguiente protocolo:

1. Mezclar los reactivos en un tubo Eppendorf:
 - 1 µl de tampón 10X (el correspondiente a cada enzima)
 - 0,5 µl de enzima (de concentración 10 U/µl)
 - 3,5 µl de H₂O MiliQ
 - 5 µl del producto de PCR
2. Incubar las reacciones a 37 °C durante toda la noche.
3. Separar los fragmentos cortados en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE a 120 V durante 135 minutos.

Análisis de los perfiles obtenidos para BOX-PCR, TP-RAPD y ARDRA

Para cada una de las tres técnicas de tipado empleadas se obtuvieron las respectivas imágenes digitales de los geles, a partir de las cuáles se llevaron a cabo los análisis de los perfiles mediante el programa Bionumerics (Applied Maths®), aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

Además, el programa Bionumerics permite el análisis conjunto de varios patrones de bandas, por lo que se aprovechó esta posibilidad para obtener un único dendrograma para todas las pruebas realizadas.

A modo de control, para evaluar la correcta agrupación de nuestros aislados empleando el programa Bionumerics, se seleccionó una cepa (MIA 10) que se analizó por triplicado (tanto al llevar a cabo las técnicas de caracterización genotípica, como el análisis informático propiamente dicho).

Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S

Se realizó la amplificación de la secuencia correspondiente al gen ribosómico 16S de las cepas seleccionadas en función de la caracterización genotípica. La amplificación del gen ARNr 16S se realizó siguiendo los pasos indicados anteriormente en el apartado “Caracterización mediante ARDRA”.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v), incorporando al mismo el bromuro de etidio correspondiente y utilizando el tampón TAE 1X. Se empleó un voltaje de 80V durante una hora. Tras este tiempo, se observó el gel en una lámpara ultravioleta y se cortaron las bandas amplificadas, siendo conservadas en un tubo Eppendorf a -20°C. En función del rendimiento obtenido en la

PCR, pudo ser necesario realizar dos reacciones para cada cepa como las indicadas anteriormente.

Una vez se obtuvo suficiente producto del gen amplificado, se procedió a la purificación de las bandas de agarosa, empleando para ello el kit comercial “*Qiaquick spin columns*” de QIAGEN®, siguiendo el protocolo descrito en el apartado “Amplificación y secuenciación del espacio intergénico ITS1”. Una vez se obtuvo el gen purificado, se realizó una cuantificación en gel de agarosa (1%), empleando para la electroforesis el tampón TAE 1X. Se carga 1 µl de cada reacción y para la cuantificación se emplea 1 µl del plásmido pGEM (Roche®), equivalente a 100 ng de ADN.

Para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S se utilizan los siguientes oligonucleótidos:

- SR2: 5'- GWATTACCGCGGCKGCTG -3' (posición 519 de *E. coli*)
- SR3: 5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT -3' (posición 907 de *E. coli*)
- SR4: 5'- GGGTTGCGCTCGTTG -3' (posición 1100 de *E. coli*)
- 1522R: 5'- AAGGAGGTGWTCCARCC -3' (posición 1522 de *E. coli*)

Las reacciones de secuenciación deben prepararse en un volumen final de 8 µl, incluyendo en este volumen 100 ng del ADN a secuenciar, 3 picomoles del oligonucleótido correspondiente y la cantidad de agua miliQ necesaria. Las reacciones se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, que se encargó de procesar las muestras.

Análisis del gen ribosómico 16S

Tras la secuenciación se obtuvieron cuatro fragmentos correspondientes al gen codificante para el ARNr 16S (uno por cada oligonucleótido empleado en la secuenciación). Estas secuencias fueron corregidas manualmente empleando el programa Chromas y se ensamblaron utilizando el programa Seqman, incluido en el paquete informático DNA Star (Lasergene), obteniendo una secuencia consenso de unos 1400 nucleótidos, correspondientes al gen prácticamente completo.

Una vez obtenidas las secuencias del gen ribosómico 16S para todos los aislados seleccionados, éstas fueron alineadas empleando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998), generándose con ello el archivo correspondiente que fue procesado con el programa Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007), mediante el cual se llevaron a cabo los análisis filogenéticos que se exponen en este estudio. En este análisis se incluyeron las cepas tipo del género *Micromonospora*, de forma que se pudiese tener una visión global de la distribución específica de las cepas aisladas en el conjunto del género.

Estimación del tamaño del genoma por electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Para estimar el tamaño del genoma se seleccionaron tres cepas de *Micromonospora*, MIA 10, MIA 32 y LUPAC 09. Para ello se empleó la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE). El protocolo empleado se basó en el descrito previamente por Blumel (1998). Para ello se emplearon cultivos de *Micromonospora* en medio líquido M65, con agitación vigorosa y matraces con deflectores, con el fin de evitar la formación de grupos de células compactos. Tras cuatro días de incubación se midió la densidad óptica de los cultivos y en base a ello se tomaron diferentes volúmenes de cada uno, estandarizando así la cantidad de biomasa recogida para cada cepa (teniendo finalmente 50 ml de células con una OD₆₀₀ en torno a 1).

Las células recogidas por centrifugación se lavaron dos veces con tampón TEN (ver Apéndice) y se resuspendieron finalmente en 5 ml de tampón EC (ver Apéndice). Esta suspensión se mezcló con un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión (“Low melting preparative-grade agarose”, Biorad) al 1%, que previamente había sido fundida a 50°C. Con la solución resultante se rellenaron 20 bloques (“Disposable plug mold”, Biorad) para cada cepa estudiada, colocándolos sobre hielo a 4°C, al menos durante tres horas. Una vez solidificados los bloques de agarosa, se extrajeron del molde y se llevó a cabo la extracción de ADN:

- 1.- Los 20 bloques de cada cepa se tratan de forma conjunta, sumergiéndolos en 10 ml de tampón EC con 100 mg/ml de lisozima. Incubar a 37°C durante dos horas.
- 2.- Retirar el tampón EC y añadir 10 ml de tampón ESP con 5 mg/ml de proteinasa K. Incubar a 50°C durante 24 horas.
- 3.- Lavar las muestras tres veces con tampón TE (unos 15 ml de tampón y dejándolo 2 horas entre cada lavado). No deben quedar restos de proteinasa, ya que destruiría las enzimas de restricción que se añadirán más adelante.
- 4.- Mantener los bloques a 4°C en tampón TE hasta su utilización.

El ADN se debe digerir con enzimas de restricción que corten en pocos puntos a lo largo de todo el genoma. Para ello se seleccionaron enzimas con alto contenido en adenina y timina, dado que las especies de *Micromonospora* suelen tener un contenido en guanina y citosina superior al 70%. Las enzimas de restricción seleccionadas fueron:

<u>Enzima</u>	<u>Sitio de corte (↓)</u>	<u>Casa comercial</u>
BcuI	5'- A↓CTAGT -3'	Promega®
BspTI	5'- C↓TTAAG -3'	Roche®
DraI	5'- TTT↓AAA -3'	Roche®
SspI	5'- AAT↓ATT -3'	Roche®
VspI	5'- AT↓TAAT -3'	Roche®
XbaI	5'- T↓CTAGA -3'	Roche®

Las reacciones de digestión se llevan a cabo para cada combinación enzima-cepa por separado, de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1.- Incubar en un tubo Eppendorf un bloque de agarosa con 500 µl del tampón correspondiente a la enzima que se va a emplear, con una concentración final de 1X, en agua ultra pura. Se mantiene a 37°C durante 30 minutos.
- 2.- Repetir el proceso anterior, retirando el tampón anterior y sustituyéndolo por nuevo. Incubar otros 30 minutos.
- 3.- Volver a retirar el tampón de la enzima y añadir 500 µl de tampón nuevo y 50 unidades de la enzima, incubando las muestras durante la noche a 37°C.
- 4.- Añadir otras 50 unidades de la enzima durante tres horas más, a 37°C.

Los bloques se cargan en un gel de agarosa especial para PFGE (“Pulse field certified”, Biorad) al 1% en TBE 0,5X, rellenándose los huecos del pocillo con agarosa disuelta de bajo punto de fusión. La electroforesis se realiza en campo pulsante a 14°C. Se realizaron dos programas diferentes, en función de si las enzimas generaban fragmentos más o menos grandes (lo cual se comprobó tras una prueba preliminar):

- Programa 1 → Para separar fragmentos de entre 240 y 2200 kb. Se empleó para las enzimas DraI, SspI y BspTI.
 - Tiempo del pulso: Incremento lineal de 60 a 120 segundos
 - Tiempo de electroforesis: 24 horas
 - Ángulo: 120°
 - Gradiente de voltaje: 6 V/cm
- Programa 2 → Para separar fragmentos de entre 50 y 1000 kb. Se empleó para las enzimas VspI, BcuI y XbaI.
 - Tiempo del pulso: Incremento lineal de 50 a 90 segundos
 - Tiempo de electroforesis: 22 horas
 - Ángulo: 120°
 - Gradiente de voltaje: 6 V/cm

El gel se tiñe en un baño de bromuro de etidio durante 20 minutos, y se lava posteriormente en agua miliQ durante otros 20 minutos. Tras ello se visualiza y fotografía. Los archivos digitales de las imágenes son analizados para estimar el tamaño de cada fragmento de ADN visible en el gel en relación a los patrones empleados, que fueron el fago lambda concatemerizado de 45 Kb (Promega®) y el genoma completo de *Sacharomyces cerevisiae* (Biorad®). Sumando el tamaño de todos los fragmentos tenemos la estimación del tamaño total del genoma para cada cepa en relación a cada enzima.

Amplificación y secuenciación parcial del gen *nifH*

La amplificación parcial del gen *nifH* de algunos de los aislados de *Micromonospora* se llevó a cabo empleando una combinación de touchdown y nested PCR.

La primera amplificación consiste en una “touchdown PCR” de la que se obtuvo un fragmento de unas 650 pares de bases. Se empleó el Kit de SIGMA® “REExtract-N-Amp Plant PCR Kit”. Se utilizaron los oligonucleótidos MGf y MGrc (basado en el MGr2 con algunas modificaciones), que habían sido diseñados de acuerdo al gen *nifH* de *Frankia* (Normand *et al.*, 1988; Gtari *et al.*, 2007).

⇒ MGf (5'-CACGGATCCGCAAGGGTGGTATT-3')

⇒ MGrc (5'-GTACTCGATGACCGTCATCCG-3')

Para cada reacción de PCR se utilizaron los siguientes reactivos y volúmenes:

▪ Mezcla de PCR	10 µl	Sigma ®
▪ Mezcla “extraction-dilution”	2 µl	Sigma ®
▪ Oligonucleótido MGf (20µM)	0,25 µl	
▪ Oligonucleótido MGrc (20µM)	0,25 µl	
▪ ADN molde	1 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	6,5 µl	

Los parámetros de tiempo y temperatura empleados fueron:

* En cada ciclo la temperatura de anillamiento desciende 0,4°C, desde los 61°C hasta los 57,4°C finales.

Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis, y la banda correspondiente al gen *nifH* fue cortada y purificada. El producto resultante de la purificación fue empleado para una segunda PCR, en la que se utilizaron los oligonucleótidos ELA1 (Gtari *et al.*, 2007) y PolR (Poly *et al.*, 2001), dando como resultado un fragmento de unos 350 nucleótidos.

- ⇒ ELA1 (5'-ATGGCKGCCATGGCCGAG-3')
- ⇒ PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3')

En esta PCR se emplearon los reactivos convencionales, según la siguiente mezcla:

▪ Tampón (10X)	5 µl	Perkin-Elmer®
▪ MgCl ₂ (25 mM)	4 µl	Perkin-Elmer®
▪ Seroalbúmina (0,1 %)	2 µl	Sigma®
▪ ELA1 (20µM)	0,5 µl	
▪ PolR (20µM)	0,5 µl	
▪ Mezcla dNTP's (10 mM, cada uno)	1,25 µl	Pharmacia®
▪ Taq Gold Polimerasa (5 U/µl)	0,4 µl	Perkin-Elmer®
▪ ADN molde	1 µl	
▪ Agua MiliQ estéril	35,35 µl	

Los parámetros de tiempo y temperatura empleados fueron:

Los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis. Se cortaron las bandas correspondientes al tamaño esperado y se purificaron. El fragmento del gen fue secuenciado empleando el oligonucleótido PolR.

En el caso de la cepa LUPAC09, se pudo obtener la secuencia de un fragmento adicional del gen *nifH*. Para ello se llevó a cabo una tercera PCR, partiendo del mismo ADN molde que en el caso de la segunda PCR (es decir, el fragmento purificado MGf-MGrc). Se emplearon los mismos reactivos y cantidades que los expuestos en la anterior

PCR, pero utilizando los oligonucleótidos ELA1 y MGrc). Para ello se utilizó el mismo programa de touchdown PCR que el descrito para amplificar el fragmento MGf-MGrc.

En este caso se amplificó un fragmento de unas 600 pares de bases, que fue secuenciado con el oligonucleótido NF462, diseñado por nosotros mismos en base a las secuencias obtenidas para diversas cepas de *Micromonospora*.

⇒ NF462 (5'-AGGCCGGCGCGTACGAGGAC-3')

ENSAYOS DE REINFECCIÓN DE *Micromonospora* EN PLANTAS

Inoculación en plantas de *Lupinus albus*

La capacidad de las cepas *Micromonospora lupini* LUPAC 08 y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T para reinfectar nódulos de *Lupinus albus*, fue evaluada mediante la realización de ensayos de coinoculación con *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65.

Como control positivo se emplearon plantas inoculadas solamente con la cepa ISLU 65, mientras que como control negativo se dejaron varias plantas sin inocular. Adicionalmente, se inocularon varias plantas con cultivos de *Micromonospora* de forma individual, para confirmar que estas cepas no son capaces de inducir la nodulación por sí solas.

La esterilización y germinación de las semillas de *Lupinus albus*, así como el mantenimiento de las plantas, se llevó a cabo tal y como se ha explicado anteriormente.

Los inóculos se realizaron una vez aparecieron las primeras hojas, a partir de soluciones McFarland 5 en agua destilada estéril, de cada cultivo. Dichas soluciones se prepararon empleando cultivos de cinco días de edad, crecidos en medio líquido M65 en el caso de *Micromonospora*, y en medio YMA para *Bradyrhizobium*.

Una vez transcurridas 6 semanas, las plantas extrajeron de la vermiculita y las raíces fueron lavadas con agua abundante. Finalmente, se llevó a cabo el reaislamiento e identificación mediante el gen ARNr 16S de las bacterias presentes en los nódulos.

Inoculación en plantas de *Medicago sativa*

Con el objetivo de evaluar la capacidad de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus* de infectar otras leguminosas, se realizaron ensayos de coinoculación en plantas de *Medicago sativa*. Se emplearon la mismas cepas, *Micromonospora lupini* LUPAC 08 y *Micromonospora saelicesensis* LUPAC 09^T, que las utilizadas en los ensayos con *Lupinus*. Como microorganismo capaz de inducir la formación de nódulos radiculares en *Medicago* se empleó la cepa *Ensifer meliloti* Sm1021.

Al igual que en el ensayo con *Lupinus*, se inocularon plantas sólo con la cepa de *Ensifer meliloti* y sólo con *Micromonospora*, además de dejar plantas sin ningún tipo de inóculo, como controles.

Las semillas de *Medicago sativa* se esterilizaron con etanol y cloruro de mercurio. En primer lugar se sumergieron durante 30 segundos en etanol 70% (v/v), y posteriormente, tras retirar el etanol, en HgCl₂ durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron repetidas veces con agua estéril. Por último, las semillas se repartieron en placas de agar-agua, manteniéndolas en oscuridad hasta su germinación (unos dos o tres días).

Las semillas germinadas se colocaron sobre una tira de papel de filtro estéril, en tubos de ensayo con 15 ml de solución Rigaud-Puppo (ver Apéndice). Estos tubos deben estar envueltos con algún material opaco, para que la luz llegue sólo a la parte aérea de las plantas. Entre dos y tres días más tarde se realizaron los inóculos, preparados del mismo modo al explicado en el apartado anterior.

Después de 6 semanas, las plantas extrajeron de los tubos y se realizó el reaislamiento e identificación, mediante la secuenciación del gen ARNr 16S, de las bacterias presentes en los nódulos.

CLONACIÓN DEL FRAGMENTO *gyrB* DE *Micromonospora* A PARTIR DE NÓDULOS

Amplificación del gen *gyrB*

El pool de ADN extraído de los nódulos de *Lupinus* según lo explicado en el apartado “Ensayos de DGGE” se empleó igualmente como ADN molde en la amplificación de un fragmento de unas 500 pares de bases del gen de la girasa. La PCR se realizó según el protocolo descrito previamente por Carro (2009), para la amplificación del primer fragmento del gen *gyrB*, utilizando los oligonucleótidos GYF1 y GYR1B, cuya secuencia completa se muestra a continuación:

⇒ GYF1 (5'- TCCGGYGGYCTGCACGGCGT -3')

⇒ GYR1B (5'- CGGAAGCCCTCYTCGTGSGT -3')

Los parámetros de tiempo y temperatura de la amplificación se muestran en el siguiente gráfico:

El producto resultante fue cargado en gel de agarosa al 1% (p/v) y sometido a electroforesis. La banda correspondiente al fragmento de interés fue cortada y purificada, con el fin de eliminar del proceso las bandas inespecíficas que aparecían y que, por su tamaño, no eran de interés.

Clonación del fragmento *gyrB*

El producto purificado fue ligado al vector pGEM. Para ello se empleó el kit comercial pGEM-T-easy (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante. En este kit el vector pGEM está ya abierto, teniendo extremos conjugativos con timina, pudiendo unirse a las adeninas que suelen dejar las Taq polimerasas en los extremos de los productos de PCR.

La reacción de ligación es la siguiente:

▪ Vector (pGEM)	1 µl	Promega®
▪ Tampón de ligación	5 µl	Promega®
▪ Ligasa	1 µl	Promega®
▪ Inserto (producto de PCR purificado)	3 µl	

Tras incubar durante toda la noche a temperatura ambiente, el producto obtenido se emplea para transformar células competentes de *Escherichia coli* JM109 según el siguiente procedimiento:

1. Añadir 100 µl de células competentes a la reacción de ligación.
2. Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 30 minutos.
3. Incubar un minuto a 42°C.
4. Enfriar en hielo un minuto.
5. Añadir 500 µl de medio LB líquido.
6. Incubar una hora a 37°C.
7. Sembrar en placas de LB con 50 µg/ml de ampicilina como marcador de resistencia. En cada placa se añadieron previamente 20 µl del sustrato X-gal (50 mg/ml), para que las células no transformadas adquirieran color azul, y 80 µl de eIPTG (0,1 M), que actúa como inductor, aumentando la expresión del gen *lacZ*, que codifica la enzima β-galactosidasa.

Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas y tras ello se procede a la selección de los transformantes que hayan adquirido el plásmido pGEM-*gyrB*. En este caso se trataría de colonias resistentes a la ampicilina y de color blanco (ya que el gen *lacZ* estaría interrumpido por el fragmento de ADN clonado).

Obtención y secuenciación del plásmido

Se seleccionaron un total de 15 colonias, que se pasaron a medio LB fresco con 50 µg/ml de ampicilina, incubándose a 37°C durante 24 horas. Las células fueron recogidas por centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se empleó el kit Wizard Plus Minipreps (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Añadir 250 µl de Wizard Plus SV Cell Resuspension Solution. Resuspender el pellet y pasar el volumen a un tubo Eppendorf.
2. Añadir 250 µl de Wizard Plus SV Cell Lysis Solution. Mezclar el contenido invirtiendo el tubo Eppendorf. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 10 µl de Solution Alkaline Protease. Mezclar el contenido invirtiendo el tubo Eppendorf. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Añadir 350 µl de Wizard Plus SV Neutralization Solution. Mezclar el contenido invirtiendo el tubo Eppendorf.
5. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos.
6. Transferir a una columna el sobrenadante y centrifugar un minuto a velocidad máxima.
7. Descartar el volumen filtrado y añadir 750 µl de Wizard Plus SV Wash Solution. Centrifugar un minuto a velocidad máxima.
8. Descartar el volumen filtrado y añadir 250 µl de Wizard Plus SV Wash Solution. Centrifugar de nuevo dos minutos a velocidad máxima.
9. Pasar la columna a un tubo Eppendorf limpio y añadir 60 µl de agua libre de nucleasas.
10. Centrifugar un minuto a velocidad máxima.

Para llevar a cabo la secuenciación se emplearon los oligonucleótidos universales, siguiendo las indicaciones descritas anteriormente.

ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los nódulos seleccionados fueron procesados enteros o cortados con bisturí en una gota de solución fijadora. Para realizar la fijación de las muestras se empleó una solución fijadora fresca compuesta por glutaraldehído (Grado I, Sigma[®]) al 2,5% en tampón de cacodilato (0,05M, pH 7,3) (Sigma[®]). Cada nódulo se cubrió completamente con esta solución y se sometió a vacío durante 20 minutos (Speed vac, Savant[®]). Posteriormente las muestras fueron mantenidas a 4°C durante toda la noche en una solución fijadora fresca.

En el caso de los cultivos puros, las células fueron centrifugadas para retirar los restos de medio, y lavadas con solución salina (NaCl 0,85%, p/v). Se empleó la misma fijación fijadora de glutaraldehído en tampón cacodilato, cubriendo las células y manteniéndolas durante toda la noche a 4°C. Tras este proceso se retiró la solución de fijación y se resuspendió la biomasa en tampón de cacodilato (0,05M, pH 7,3).

Las muestras fueron enviadas al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca o al Instituto John Innes (Norwich, UK) para completar el proceso de preparación y observación.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los nódulos seleccionados fueron cortados con bisturí en una gota de solución fijadora, sometándose posteriormente a un proceso de fijación. Para ello se empleó una solución fijadora fresca compuesta por glutaraldehído (Grado I) al 2,5% en tampón de cacodilato (0,05M, pH 7,3). Cada nódulo se cubrió completamente con esta solución y se sometió a vacío durante 20 minutos (Speed vac, Savant). Posteriormente las muestras fueron mantenidas a 4°C durante toda la noche en la solución fijadora fresca. Tras ello se

realizó una deshidratación con etanol, empleando soluciones seriadas de 25%; 50%; 75%; 90% y 100%, de menos a más concentradas, y manteniendo las muestras diez minutos en cada una.

Las células de cultivos puros se fijaron y prepararon de la misma forma que en el caso de la microscopía electrónica de transmisión.

Las muestras fueron enviadas al Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Salamanca para completar el proceso de preparación y observación.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-169.
- Antal, N., Fiedler, H. P., Stackebrandt, E., Beil, W., Stroch, K. & Zeeck, A. (2005).** Retymicin, galtamycin B, saquayamycin Z and ribofuranosyllumichrome, novel secondary metabolites from *Micromonospora* sp. Tu 6368. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot* **58**, 95-102.
- Anzai, Y., Iizaka, Y., Li, W., Idemoto, N., Tsukada, S., Koike, K., Kinoshita, K. & Kato, F. (2009).** Production of rosamicin derivatives in *Micromonospora rosaria* by introduction of D-mycinose biosynthetic gene with PhiC31-derived integration vector pSET152. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**, 1013-1021.
- Ara, I. & Kudo, T. (2007).** Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J Gen Appl Microbiol* **53**, 29-37.
- Asano, K., Masunaga, I. & Kawamoto, I. (1989).** *Catellatospora matsumotoense* sp. nov. and *C. tsunoense* sp. nov., Actinomycetes found in woodland soils. *Int J Syst Bacteriol Rev* **39**, 309-313.
- Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., Garcia, F. J., Hernandez-Lucas, I., Davila, G., van Berkum, P. & Martinez-Romero, E. (1997).** Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1086-1091.
- Bauer, D. (1981).** Infection of legumes by rhizobia. *Ann Rev Plant Phys* **32**, 407-449.
- Bauer, W. D. & Mathesius, U. (2004).** Plant responses to bacterial quorum sensing signals. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 429-433.
- Benson, D. R. & Silvester, W. B. (1993).** Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* **57**, 293-319.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbino-witsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147.
- Bergersen, F. J. (1982).** Anatomy and structure of nodules. En Root nodule of legumes: structure and functions, pp. 23-50. Baldock, UK: Research Studies Press.
- Berry, A. M. (1994).** Recent developments in the actinorhizal symbioses. *Plant and Soil* **161**, 135-145.

- Bister, B., Bischoff, D., Strobele, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Bull, A. T., Zahner, H., Fiedler, H. P. & Sussmuth, R. D. (2004).** Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucospora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 2574-2576.
- Blumel, J., Blumel, E., Yassin, A. F., Schmidt-Rotte, H. & Schaal, K. P. (1998).** Typing of *Nocardia farcinica* by pulsed-field gel electrophoresis reveals an endemic strain as source of hospital infections. *J Clin Microbiol* **36**, 118-122.
- Boogerda, F. C. & van Rossum, D. (1997).** Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol Rev* **21**, 5-27.
- Bouizgarne, B., Lanoot, B., Loqman, S., Sproer, C., Klenk, H. P., Swings, J. & Ouhdouch, Y. (2009).** *Streptomyces marokkonensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Argania spinosa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2857-2863.
- Brenner, S. E. (1995).** BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY: sequence comparison on the net. *Trends Genet* **11**, 330-331.
- Brosius, J., Palmer, M. L., Kennedy, P. J. & Noller, H. F. (1978).** Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 4801-4805.
- Callaham, D., Deltredici, P. & Torrey, J. G. (1978).** Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. *Science* **199**, 899-902.
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. & Zhou, S. (2004).** Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Lett Appl Microbiol* **39**, 425-430.
- Carro, L. (2009).** Avances en la sistemática del género *Micromonospora*: Estudio de cepas aisladas de la rizosfera y nódulos de *Pisum sativum*. En Microbiología y genética. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Casamayor, E. O., Schafer, H., Baneras, L., Pedros-Alio, C. & Muyzer, G. (2000).** Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **66**, 499-508.
- Castroviejo, S. & Pascual, H. (1999).** Familia *Leguminosae*. En Flora Ibérica Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Editado por S. Castroviejo. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Cerda, M. E. (2008).** Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal. En Microbiología y Genética. Salamanca: Universidad de Salamanca.

- Cérémonie, H., Debelle, F. & Fernandez, M. (1999).** Structural and functional comparison of *Frankia* root hair deforming factor and rhizobia Nod factor. *Can J Bot* **77**, 1293-1301.
- Colmer, A. R. & McCoy, E. (1943).** *Micromonospora* in relation to some Wisconsin lakes and lake population. *Trans Wisconsin Acad Sci* **35**, 187-220.
- Conn, V. M., Walker, A. R. & Franco, C. M. (2008).** Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 208-218.
- Coombs, J., Michelsen, P. & Franco, C. (2004).** Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control* **29**, 359-366.
- Coombs, J. T. & Franco, C. M. (2003).** Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5603-5608.
- Copeland, A., Lapidus, A., Del Rio, T. G., Nolan, M., Lucas, S., Chen, F., Tice, H., Cheng, J., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Mikhailova, N., Pati, A., Ivanova, N., Mavromatis, K., Chen, A., Palaniappan, K., Chain, P., Land, M., Hauser, L., Chang, Y., Jeffries, C., Chertkov, O., Brettin, T., Detter, J. C., Han, C., Ali, Z., Tindall, B. J., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C. & Klenk, H. P. (2009).** Complete genome sequence of *Catenulisporea acidiphila* type strain. *Standards in Genomic Sciences* **1**, 119-115.
- Cosson, M. P. & Pantaloni, D. (1977).** Investigations on the structural perturbations induced by the binding of mercuric chloride to L-glutamate dehydrogenase. *Biochemistry and Biophysics* **180**, 49-56.
- Chelius, M. K. & Triplett, E. W. (2001).** The diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. *Microb Ecol* **41**, 252-263.
- Chien, Y. T. & Zinder, S. H. (1996).** Cloning, functional organization, transcript studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *J Bacteriol* **178**, 143-148.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. & Lim, Y. W. (2007).** EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2259-2261.
- de Araujo, J. M., da Silva, A. C. & Azevedo, J. L. (2000).** Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Braz Arch Biol Technol* **47**, 434-451.
- de Felipe, M. R. (2007).** Biotecnologías limpias en agricultura: Fijación Biológica de nitrógeno. Estructura-función de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. En Contaminación y Salud, pp. 103-151. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia.

- de Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H. E. & McCarthy, A. J. (2008).** Cellulose degradation by micromonósporas recovered from freshwater lakes and classification of these actinomycetes by DNA gyrase B gene sequencing. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7080-7084.
- Dixon, R. & Kahn, D. (2004).** Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat Rev Microbiol* **2**, 621-631.
- Dixon, R. A. (1984).** The genetic complexity of nitrogen fixation. The ninth Fleming lecture. *J Gen Microbiol* **130**, 2745-2755.
- Eckhardt, M. M., Baldwin, I. L. & Fred, E. B. (1931).** Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. *J Bacteriol* **21**, 273-285.
- El-Tarabily, K. (1997).** The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. *New Phytol* **137**, 495-507.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. E. & Sivasithamparam, K. (2009).** Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *J Appl Microbiol* **106**, 13-26.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H. & Sivasithamparam, K. (2008).** Promotion of growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in a calcareous soil by a phosphate-solubilizing, rhizosphere-competent isolate of *Micromonospora endolithica*. *Appl Soil Ecology* **39**, 161-171.
- Fedorova, E. E., de Felipe, M. R., Pueyo, J. J. & Lucas, M. M. (2007).** Conformation of cytoskeletal elements during the division of infected *Lupinus albus* L. nodule cells. *J Exp Bot* **58**, 2225-2236.
- Fernández-Molinero, C. R. (2005).** Análisis de la diversidad de actinomicetos asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. En Microbiología y genética. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G. (2005).** Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**, 37-42.
- Fiedler, H. P., Bruntner, C., Riedlinger, J., Bull, A. T., Knutsen, G., Goodfellow, M., Jones, A., Maldonado, L., Pathom-aree, W., Beil, W., Schneider, K., Keller, S. & Sussmuth, R. D. (2008).** Proximicin A, B and C, novel aminofuran antibiotic and anticancer compounds isolated from marine strains of the actinomycete *Verrucosispora*. *J Antibiot* **61**, 158-163.
- Fischer, S. G. & Lerman, L. S. (1980).** Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 4420-4424.

- Fischer, S. G. & Lerman, L. S. (1983).** DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1579-1583.
- Foulerton, A. G. R. (1905).** New species of *Streptothrix* isolated from the air. *Lancet* **1**, 1199-1200.
- Franco, C. M., Michelsen, P., Percy, N., Conn, V. M., Listiana, E., Moll, S., Loria, R. & Coombs, J. T. (2007).** Actinobacterial endophytes for improved crop performance. *Australasian Plant Pathology* **36**, 524-531.
- Frank, A. B. (1885).** Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber Dtsch Bot Ges* **3**, 128-145.
- Frank, A. B. (1889).** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges* **7**, 332-346.
- Gallon, J. R. (2004).** Nitrogen fixation by non-heterocystous cyanobacteria. En *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free living bacteria*, pp. 111-133. Editado por W. Klipp, B. Masepohl, J. R. Gallon and W. E. Newton. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- García, L. C., Martínez-Molina, E. & Trujillo, M. E. (2010).** *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 331-337.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J. & Pace, N. R. (1988).** Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J Bacteriol* **170**, 720-726.
- Gladstones, J. S. (1970).** Lupin as crop plants. *Fields crop abstracts* **23**, 123-128.
- Grau, F. H. & Wilson, P. W. (1962).** Physiology of nitrogen fixation by *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol* **83**, 490-496.
- Grayston, S. J., Wang, S., Campbell, C. D. & Edwards, A. C. (1998).** Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **30**, 369-378.
- Gtari, M., Daffonchio, D. & Boudabous, A. (2007).** Assessment of the genetic diversity of *Frankia* microsymbionts of *Elaeagnus angustifolia* L. plants growing in a Tunisian date-palm oasis by analysis of PCR amplified *nifD-K* intergenic spacer. *Can J Microbiol* **53**, 440-445.
- Guerin-Laguet, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C. & Mousain, D. (2003).** The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* **13**, 17-25.

- Hanada, M., Ohkuma, H., Yonemoto, T., Tomita, K., Ohbayashi, M., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., Kawaguchi, H. & Forenza, S. (1991).** Maduropeptin, a complex of new macromolecular antitumor antibiotics. *J Antibiot* **44**, 403-414.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harsono, K. D., Kaspar, C. W. & Luchansky, J. B. (1993).** Comparison and genomic sizing of *Escherichia coli* O157:H7 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3141-3144.
- Hauser, G. (1985).** Über Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. En Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze. Vogel, Leipzig.
- Henson, B. J., Watson, L. E. & Barnum, S. R. (2004).** The evolutionary history of nitrogen fixation, as assessed by *NifD*. *J Mol Evol* **58**, 390-399.
- Heuer, H. & Smalla, K. (1997).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. En Modern Soil Microbiology. Editado por J. Dirk Van Elsas, J. T. Trevors and E. M. Wellington. Nueva York: Marcel Dekker Inc.
- Hirsch, A. M., McKhann, H. I., Reddy, A., Liao, J., Fang, Y. & Marshall, C. R. (1995).** Assessing horizontal transfer of *nifHDK* genes in eubacteria: nucleotide sequence of *nifK* from *Frankia* strain HFPCc13. *Mol Biol Evol* **12**, 16-27.
- Hirsch, A. M. & Valdés, M. (2010).** *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* **42**, 536-542.
- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P. & Stackebrandt, E. (2004).** Cryptoendolithic actinomycetes from antarctic sandstone rock samples: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Syst Appl Microbiol* **27**, 166-174.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M. & Ruan, J. S. (2009).** Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs* **7**, 24-44.
- Horan, A. C. & Brodsky, B. C. (1986).** *Micromonospora rosaria* sp. nov. nom. rev., the rosaramicin producer. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 478-480.
- Howard, J. B. & Rees, D. C. (1996).** Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chem Rev* **96**, 2965-2982.
- Huang, H., Lv, J., Hu, Y., Fang, Z., Zhang, K. & Bao, S. (2008).** *Micromonospora rifamycinica* sp. nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 17-20.
- Igarashi, Y., Trujillo, M. E., Martinez-Molina, E., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. & Furumai, T. (2007).** Antitumor anthraquinones

from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 3702-3705.

Ishizawa, S., Araragi, M. & Suzuki, T. (1969). Actinomycete flora of Japanese soils. III Actinomycete flora of paddy soils. *Soil Sci Plant Nutr* **15**, 104-112.

Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 1416-1429.

Jain, D. K., Prévost, D. & Bordeleau, L. M. (1990). Role of bacterial polysaccharides in the derepression of ex-planta nitrogenase activity with rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* **73**, 167-174.

Jambrina, J. L. (1996). El Atramuz. En *El cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León*, pp. 27-75. Editado por F. F. Jubete and A. R. Monreal. Valladolid: Junta de Castilla y León, Conserjería de Agricultura y Ganadería.

Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velazquez, E., Hernandez, M., Temprano, F., Martinez-Molina, E., Ruiz-Argueso, T. & Leon-Barrios, M. (2003). Genetic diversity of bradyrhizobial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. *Syst Appl Microbiol* **26**, 611-623.

Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* **23**, 403-405.

Jensen, H. L. (1932). Further observations on the genus *Micromonospora*. En *Contributions to our knowledge of the actinomyetes*, pp. 173-180. N.S.W.: Proc. Linnean Soc.

Jiang, S., Sun, W., Chen, M., Dai, S., Zhang, L., Liu, Y., Lee, K. J. & Li, X. (2007). Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**, 405-416.

Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008a). *Micromonospora chaiyaphumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 924-928.

Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008b). *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. *J Gen Appl Microbiol* **54**, 127-133.

Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int J Syst Bacteriol* **32**, 136-139.

Jordan, D. C. (1984). Family *Rhizobiaceae*. En Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, 1st Ed. Editado por C. Krieg and B. F. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Karma, A. (1993). Chemical properties of organic soils. En Soil sampling and methods of analysis, pp. 459-471. Editado por R. Martin: Canadian Society of Soil Science & Lewis Publishers.

Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S. (2000). Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int J Syst Evol Microbiol* **50 Pt 1**, 127-134.

Kawamoto, A., Yamamoto, M. & Nara, T. (1983). *Micromonospora olivasterospora* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**, 107-112.

Kawamoto, I. (1989). Genus *Micromonospora*. En Bergey's Manual of Systematics Bacteriology, pp. 2442-2450. Editado por S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kawamoto, I., Oka, T. & Nara, T. (1982). Spore resistance of *Micromonospora olivasterospora*, *Micromonospora sagamiensis*, and related organisms. *Agric Biol Chem* **46**, 221-231.

Kawamoto, I., Okachi, R., Kato, H., Yamamoto, S. & Takahashi, I. (1974). The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization. *J Antibiot* **27**, 492-501.

Khamna, S., Yokota, A. & Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production *World J Microbiol Biotechnol* **25**.

Kieser, T., Hopwood, D. A., Bibb, J. M., Chater, K. F., Buttner, M. J. (2000). Practical Streptomyces Genetics, Norwich.

Kirby, B. M. & Meyers, P. R. (2009). *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int J Syst Evol Microbiol*.

Koguchi, T., Yamada, K., Yamato, M., Okachi, R., Nakayama, K. & Kase, H. (1986). K-4, a novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Actinomadura spiculosospora*. *J Antibiot* **39**, 364-371.

Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* **178**, 703.

Kriss, A. E. (1939). The micromonospora an actinomycete-like organism (*Micromonospora globosa*). *Mikrobiologiya* **8**, 175-178.

Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C. & Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca*

sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov. *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **28**, 328-339.

Kurkdjian, A. & Guern, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**, 271-303.

Kuykendal, L. D. (2005). Genus *Bradyrhizobium*. En *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, pp. 438-443. Editado por D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kuykendal, L. D., Roy, M. A., O'Neil, J. J. & Devine, T. E. (1988). Fatty Acids, Antibiotic Resistance, and Deoxyribonucleic Acid Homology Groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 358-361.

Kuykendal, L. D., Saxena, B., Devine, T. E. & Udell, S. E. (1993). Validation List Nº45. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 398-399.

Kuykendal, L. D., Young, M. J., Martínez-Romero, E., Kerr, A. & Sawada, H. (2005). Genus *Rhizobium*. En *Bergey's Manual of Systematics Bacteriology*, pp. 325-340. Editado por D. J. Brenner, N. R. Krieg and J. T. Staley. Baltimore: Williams & Wilkins.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z. & Swings, J. (2004). BOX-pCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol* **27**, 84-92.

Lawrie, A. C. & Wheeler, C. T. (1974). The effects of flowering and fruit formation on the supply of flowering and fruit formation on the supply of photosynthetic assimilates to the nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytol* **73**, 1119-1127.

Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. & Borders, D. B. (1987). Calicheimicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calicheimicin (gamma 11). *J Am Chem Soc* **109**, 3464-3466.

Lee, S. D., Goodfellow, M. & Hah, Y. C. (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. nov. *FEMS Microbiol Lett* **178**, 349-354.

Lee, S. O., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Park, D. J., Kim, C. J. & Kim, J. C. (2008). Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae*. *J Microbiol Biotechnol* **18**, 1741-1746.

- Leski, T., Pietras, M. & Rudawska, M. (2010).** Ectomycorrhizal fungal communities of pedunculate and sessile oak seedlings from bare-root forest nurseries. *Mycorrhiza* **20**, 179-190.
- Liao, Z. L., Tang, S. K., Guo, L., Zhang, Y. Q., Tian, X. P., Jiang, C. L., Xu, L. H. & Li, W. J. (2009).** *Verrucosipora lutea* sp. nov., isolated from a mangrove sediment sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2269-2273.
- Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. & Forney, L. J. (1997).** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4516-4522.
- Long, S. R. (1996).** *Rhizobium* symbiosis: nod factors in perspective. *Plant Cell* **8**, 1885-1898.
- Loria, R., Bukhalid, R. A., Fry, B. A. & King, R. R. (1997).** Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* **81**, 836-846.
- Luedemann, G. M. (1971).** *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis, 1916) comb. nov. (subjective synonym: *Micromonospora fusca* Jensen, 1932). *Journal Int J Syst Bacteriol* **21**, 240-247.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. (1964a).** *Micromonospora carbonacea* sp. N., an Everninomicin-Producing Organism. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* **10**, 47-52.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. (1964b).** Taxonomy of gentamycin-producing *Micromonospora*. *J Antimicrob Agents Chemother* **1963**, 116-124.
- Luedemann, G. M. & Casmer, C. J. (1973).** Electron microscope study of whole mounts and thin sections of *Micromonospora chalcone* ATCC 12452. *Int J Syst Bacteriol* **23**, 243-255.
- Mateos, P. F., Baker, D. L., Petersen, M., Velazquez, E., Jimenez-Zurdo, J. I., Martinez-Molina, E., Squartini, A., Orgambide, G., Hubbell, D. H. & Dazzo, F. B. (2001).** Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Can J Microbiol* **47**, 475-487.
- McLeod, M. B. & Gordon, J. (1923).** Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide among bacteria with a scheme of classification based on these properties. *J Pathol Microbiol* **26**, 326-331.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982).** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114-122.
- Mercan, N., Aslim, B., Nur, Z., Ksekdaú, Y. & Beyatli, Y. (2002).** Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by some *Rhizobium* bacteria. *Turk J Biol* **26**, 215-219.

Miller, I. M. & Baker, D. (1985). Initiation, development and structure of root nodules in *Elaeagnus angustifolia* L. (*Elaeagnaceae*). *Protoplasma* **128**, 107-119.

Mira, A., Ochman, H. & Moran, N. A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* **17**, 589-596.

Miyoshi-Saitoh, M., Morisaki, N., Tokiwa, Y., Iwasaki, S., Konishi, M., Saitoh, K. & Oki, T. (1991). Dynemicins O, P and Q: novel antibiotics related to dynemicin A isolation, characterization and biological activity. *J Antibiot* **44**, 1037-1044.

Murray, A. E., Hollibaugh, J. T. & Orrego, C. (1996). Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2676-2680.

Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695-700.

Muyzer, G. & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.

Mylona, P., Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **7**, 869-885.

Neumann, G. & Martinoia, E. (2002). Cluster roots--an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci* **7**, 162-167.

Neumann, G., Massonneau, A., Langlade, N., Dinkelaker, B., Hengeler, C., Römheld, V. & Martinoia, E. (2000). Physiological aspects of cluster root function and development in phosphorus-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* **85**, 909-919.

Nimnoi, P., Pongsilp, N. & Lumyong, S. (2010). Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. *World J Microbiol Biotechnol* **26**, 193-203.

Niner, B. M., Brandt, J. P., Villegas, M., Marshall, C. R., Hirsch, A. M. & Valdes, M. (1996). Analysis of partial sequences of genes coding for 16S rRNA of actinomycetes isolated from *Casuarina equisetifolia* nodules in Mexico. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3034-3036.

Noridge, N. A. & Benson, D. R. (1986). Isolation and nitrogen-fixing activity of *Frankia* sp. strain Cp11 vesicles. *J Bacteriol* **166**, 301-305.

Normand, P. & Bousquet, J. (1989). Phylogeny of nitrogenase sequences in *Frankia* and other nitrogen-fixing microorganisms. *J Mol Evol* **29**, 436-447.

Normand, P. & Lalonde, M. (1982). Evaluation of *Frankia* strains isolated from provenances of two *Alnus* species. *Can J Microbial* **28**, 1133-1142.

Normand, P., Lapierre, P., Tisa, L. S., Gogarten, J. P., Alloisio, N., Bagnarol, E., Bassi, C. A., Berry, A. M., Bickhart, D. M., Choisne, N., Couloux, A., Cournoyer, B., Cruveiller, S., Daubin, V., Demange, N., Francino, M. P., Goltsman, E., Huang, Y., Kopp, O. R., Labarre, L., Lapidus, A., Lavire, C., Marechal, J., Martinez, M., Mastronunzio, J. E., Mullin, B. C., Niemann, J., Pujic, P., Rawnsley, T., Rouy, Z., Schenowitz, C., Sellstedt, A., Tavares, F., Tomkins, J. P., Vallenet, D., Valverde, C., Wall, L. G., Wang, Y., Medigue, C. & Benson, D. R. (2007). Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res* **17**, 7-15.

Normand, P., Orso, S., Cournoyer, B., Jeannin, P., Chapelon, C., Dawson, J., Evtushenko, L. & Misra, A. K. (1996). Molecular phylogeny of the genus *Frankia* and related genera and emendation of the family *Frankiaceae*. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 1-9.

Normand, P., Simonet, P. & Bardin, R. (1988). Conservation of *nif* sequences in *Frankia*. *Mol Gen Genet* **213**, 238-246.

Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R. I., Ludwig, W. & Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* **178**, 5636-5643.

Okazaki, T., Takahashi, K., Kizuka, M. & Enokita, R. (1995). Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. *Annu Rev Sankyo Res Lab* **47**, 97-106.

Oke, V. & Long, S. R. (1999). Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* **2**, 641-646.

Ørskov, J. (1923). Investigations into the Morfology of the Ray Fungi. Copenhagen.

Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.

Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J. & Olsen, G. J. (1985). Analyzing natural microbial populations by rRNA sequences. *ASM News* **51**, 4-12.

Pardo-García, E., Santano-Arías, J. & Fernández-Seoane, L. (2000). Fertilidad y morfología de suelos con uso olivar en superficies de Raña (Montes de Toledo). *Edafología* **7-2**, 135-145.

Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1996). Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* **8**, 1899-1913.

Phillips, D. H. & Johnson, M. J. (1961). Oxygen transfer in fermentations. *Sci Rep Ist Super Sanita* **1**, 190-195.

Poly, F., Monrozier, L. J. & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* **152**, 95-103.

Postgate, J. R. & Eady, R. R. (1988). The evolution of biological nitrogen fixation. En *Nitrogen Fixation: Hundred Years After*, pp. 31-40. Editado por H. Bothe, F. J. de Bruijn and W. E. Newton. Stuttgart: Gustav Fischer.

Prazmowski, A. (1880). Untersuchung uber die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Charla inaugural, Hugo Voigt, Leipzig, pp. 1-58.

Pudelko, K. & Madnak, C. J. (1996). Populations of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nodulating *Lupinus* in Poland. En *Abstracts of Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. 2nd European Nitrogen Fixation Conference and NATO Advanced Research Workshop, pp. 156. Poznan, Poland: Scientitic Publishers OWN.

Qin, S., Zhao, G. Z., Li, J., Zhu, W. Y., Xu, L. H. & Li, W. J. (2009). *Actinomadura flavalba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 2453-2457.

Racette, S. & Torrey, J. G. (1989). Root nodule initiation in *Gymnostoma* (*Casuarinaceae*) and *Shepherdia* (*Elaeagnaceae*) induced by *Frankia* strain HFPGp11. *Can J Bot* **67**, 2873-2879.

Ramirez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodriguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Willems, A. & Velazquez, E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1929-1934.

Ramírez, H. C. (1999). Molecular ecology of *Frankia* and other soil bacteria under natural and chlorobenzoate-stressed conditions. En *Laboratory of Microbiology*. Wageningen: Wageningen Agricultural University.

Raoult, D., Ogata, H., Audic, S., Robert, C., Suhre, K., Drancourt, M. & Claverie, J. M. (2003). *Tropheryma whipplei* Twist: a human pathogenic actinobacteria with a reduced genome. *Genome Res* **13**, 1800-1809.

Rappe, M. S. & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**, 369-394.

Rawsthorne, S., Hadley, P., Summerfield, J. & Roberts, E. H. (1985). Effects of supplemental nitrate and thermal regime on the nitrogen nutrition of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant and Soil* **83**, 279-293.

Raymond, J., Siefert, J. L., Staples, C. R. & Blankenship, R. E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mol Biol Evol* **21**, 541-554.

- Ribbe, M., Gadkari, D. & Meyer, O. (1997).** N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem* **272**, 26627-26633.
- Riedlinger, J., Reicke, A., Zahner, H., Krismer, B., Bull, A. T., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Goodfellow, M., Bister, B., Bischoff, D., Sussmuth, R. D. & Fiedler, H. P. (2004).** Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosispora* strain AB-18-032. *J Antibiot* **57**, 271-279.
- Rigaud, J. & Puppo, A. (1975).** Indol-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**, 223-228.
- Rivas, R., García-Fraile, P. & Velázquez, E. (2009).** Taxonomy of bacteria nodulating legumes: A review. *Microbiology Insights* **2**, 1-19.
- Rivas, R., Velazquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. & Martinez-Molina, E. (2001a).** A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* **22**, 1086-1089.
- Rivas, R., Velazquez, E., Valverde, A., Mateos, P. F. & Martínez-Molina, E. (2001b).** A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* **6**, 1086-1089.
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J. L., Garcia-Benavides, P., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Gillis, M. & Velazquez, E. (2004).** *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1271-1275.
- Robledo, M., Jimenez-Zurdo, J. I., Velazquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Pineiro, J. L., Ramirez-Bahena, M. H., Ramos, B., Diaz-Minguez, J. M., Dazzo, F., Martinez-Molina, E. & Mateos, P. F. (2008).** *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7064-7069.
- Rodríguez, R. (2008).** Análisis de la población bacteriana presente en nódulos de *Lupinus*: Interacción y localización *in situ*. En Microbiología y genética. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Ruvkun, G. B. & Ausubel, F. M. (1980).** Interspecies homology of nitrogenase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 191-195.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & T. Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, C. L., Vieira, J., Tavares, F., Benson, D. R., Tisa, L. S., Berry, A. M., Moradas-Ferreira, P. & Normand, P. (2008).** On the nature of fur evolution: a phylogenetic approach in actinobacteria. *BMC Evol Biol* **8**, 185.

- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, S., Petrolini, B., Borgonovi, G. E. & Merli, S. (1992).** Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. *Appl Environ Microbiol* **58**, 2691-2693.
- Schäfer, H. & Muyzer, G. (2001).** Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. London: Academic Press.
- Scheinerta, P., Krausse, R., Ullmann, U., Söller, R. & Kruppa, G. (1996).** Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S rRNA spacer. *J Microbiol Meth* **26**, 103-117.
- Schlinkert-Miller, M. & Pepper, I. L. (1988).** Physiological and biochemical characteristics of a fast-growing strain of lupin rhizobia isolated from the Sonoran Desert. *Soil Biol Biochem* **20**, 319-322.
- Schroeter, J. (1886a).** Die Pilze Schlesiens. *Cohn's Kryptogamen-Flora von Schlesien* **9**.
- Schroeter, J. (1886b).** Die Pilze Schlesiens. En Kryptogamenflora von Schlesien, pp. 131-256. Editado por F. Cohn. Breslau: J. U. Kern's Verlag.
- Schultz, N. A. & Benson, D. R. (1989).** Developmental potential of *Frankia* vesicles. *J Bacteriol* **171**, 6873-6877.
- Sierra, G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* **23**, 15-22.
- Sillanpää, M. (1982).** Micronutrients and the nutrient status of soils: a global study. Rome: FAO Soils Bulletin.
- Skerman, V. B. D., Mc Gowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**, 225-340.
- Solans, M. (2007).** *Discaria trinervis* - *Frankia* symbiosis promotion by saprophytic actinomycetes. *J Basic Microbiol* **47**, 243-250.
- Solans, M., Vobis, G., Cassán, F., Masciarelli, O., Luna, V. & Wall, L. G. (2006).** Producción de fitohormonas por rhizoactinomycetes: posibles efectos sobre la simbiosis *Discaria trinervis*-*Frankia*. En Book of abstracts de la XXVI Reunión de la Asociación Argentina de Fisiología Vegetal. Buenos Aires, Argentina.
- Solans, M., Vobis, G. & Wall, L. G. (2009).** Saprophytic actinomycetes promote nodulation in *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis in the presence of high N. *J Plant Growth Regulation* **28**, 106-114.
- Solovieva, N. K. (1972).** Actinomycetes of littoral and sub. littoral zones of the White Sea. *Antibiotiki* **17**, 778-781.

- Spaink, H. P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P. J. J. (1998).** The *Rhizobiaceae*: Molecular Biology of Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Stacey, G., Burris, R. H. & Evans, H. (1992).** Preface. En Biological nitrogen fixation. Editado por G. Stacey, R. H. Burris and H. Evans. Londres: Chapman and Hall.
- Stanley, J., Brown, G. G. & Verma, D. P. (1985).** Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *J Bacteriol* **163**, 148-154.
- Stepkowski, T., Hughes, C. E., Law, I. J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A. & Moulin, L. (2007).** Diversification of lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Appl Environ Microbiol* **73**, 3254-3264.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. & Song, W. (2008).** Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol* **55**, 415-424.
- Sveshnikova, M. A., Maksimova, T. S. & Kudrina, E. S. (1969).** Species of the genus *Micromonospora* Oerskov, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya* **38**, 883-893.
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. & Lumyong, S. (2005).** Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology* **151**, 1691-1695.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tamura, T., Ishida, Y., Nozawa, Y., Otoguro, M. & Suzuki, K. (2009).** Transfer of *Actinomadura spadix* Nonomura and Ohara 1971 to *Actinoallomurus spadix* gen. nov., comb. nov., and description of *Actinoallomurus amamiensis* sp. nov., *Actinoallomurus caesius* sp. nov., *Actinoallomurus coprocola* sp. nov., *Actinoallomurus fulvus* sp. nov., *Actinoallomurus iriomotensis* sp. nov., *Actinoallomurus luridus* sp. nov., *Actinoallomurus purpureus* sp. nov. and *Actinoallomurus yoronensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1867-1874.
- Tanasupawat, S., Jongrungruangchok, S. & Kudo, T. (2009).** *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T. (2004).** *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica* **18**, 8-14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T. (2006).** *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J Gen Appl Microbiol* **51**, 229-234.

- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K., Suzuki, K. & Kudo, T. (2005).** *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008).** *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1516-1521.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. & Kudo, T. (2007).** *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J Gen Appl Microbiol* **53**, 287-293.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thong, K. L., Puthucheary, S. D. & Pang, T. (1997).** Genome size variation among recent human isolates of *Salmonella typhi*. *Research in Microbiology* **148**, 229-235.
- Tian, X., Cao, L., Tan, H., Han, W., Chen, M., Liu, Y. & Zhou, S. (2007).** Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice. *Microb Ecol* **53**, 700-707.
- Tisa, L. S. & Ensign, J. C. (1987).** Isolation and nitrogenase activity of vesicles from *Frankia* sp. strain EAN1pec. *J Bacteriol* **169**, 5054-5059.
- Tomita, K., Y., H., Ohkusa, N. & Miyaki, T. (1992).** *Micromonospora chersina* sp. nov. . *Actinomicetol* **6**, 21-28.
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Carro, L., Cerda, M. E., Rodriguez, R. & Martinez-Molina, E. (2007a).** Are *Micromonosporae* widespread amongst legumes? En 14th ISBA Meeting. Newcastle.
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Carro, L., Martínez-Hidalgo, P. & Martinez-Molina, E. (2010).** Nódulos fijadores de nitrógeno: una fuente inesperada de poblaciones de *Micromonospora* con gran potencial biotecnológico. En Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones II, pp. Aceptado, en proceso de publicación: SEFIN.
- Trujillo, M. E., Fernandez-Molinero, C., Velazquez, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Mateos, P. F. & Martinez-Molina, E. (2005a).** *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 877-880.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernandez-Molinero, C., Schumann, P. & Martinez-Molina, E. (2007b).** *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2799-2804.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L. & Martinez-Molina, E. (2006).** *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 2381-2385.

- Trujillo, M. E., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A. M., Rivas, R., Ludena, D., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. & Velazquez, E. (2005b).** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1318-1327.
- Valdés, M. (2002).** La bacteria filamentosa *Frankia*. En Microbiosenlinea, pp. 1-22. México D.F.: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- Valdés, M., Pérez, N. O., Estrada-de Los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Pena-Cabriaes, J. J., Normand, P. & Hirsch, A. M. (2005).** Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl Environ Microbiol* **71**, 460-466.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. & Lupski, J. (1994).** Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. En *Methods in Molecular and Cellular Biology*.
- Vincent, J. M. (1970).** The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. En *Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*, pp. 1-13. Editado por J. M. Vincent. Oxford: Blackwell Scientific.
- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Werner, D. & Martinez-Romero, E. (2005).** *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. genistearum, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 569-575.
- Waksman, S. A. & Curtis, R. E. (1916).** The actinomycetes of the soil. *Soil Sci* **1**, 99-134.
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E. & Vivanco, J. M. (2003).** Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol* **132**, 44-51.
- Wall, L. G., Hellsten, A. & Huss-Danell, K. (2000).** Nitrogen, phosphorus, and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis* **29**, 91-105.
- Wang, B. & Qiu, Y. L. (2006).** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* **16**, 299-363.
- Wang, S. Z., Chen, J. S. & Johnson, J. L. (1988).** The presence of five *nifH*-like sequences in *Clostridium pasteurianum*: sequence divergence and transcription properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 439-454.
- Watanabe, I., Ke-Zhi, B., Berja, N. S., Espinas, C. R., Ito, O. & Subuchi, B. P. (1981).** The *Azolla-Anabaena* complex and its use in rice culture. *IRRI Publication* **69**, 1-11.

- Watson, E. T. & Williams, S. T. (1974).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol Biochem* **6**, 43-52.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M. & Wagman, G. H. (1968).** Halomicin, a new *Micromonospora*-produced antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 435-441.
- Weyland, H. (1969).** Actinomycetes in North Sea and Atlantic ocean sediments. *Nature* **223**, 858.
- Whiley, R. A., Duke, B., Hardie, J. M. & Hall, L. M. (1995).** Heterogeneity among 16S-23S rRNA intergenic spacers of species within the '*Streptococcus milleri* group'. *Microbiology* **141**, 1461-1467.
- Willems, A. (2006).** The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant and Soil* **287**, 3-14.
- Willems, A., Munive, A., de Lajudie, P. & Gillis, M. (2003).** In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA Hybridizations. *Syst Appl Microbiol* **26**, 203-210.
- Williams, S. T., Lanning, S. & Wellington, E. M. H. (1983).** Ecology of actinomycetes. En *The biology of actinomycetes*, pp. 421-528. Editado por M. Goodfellow, M. Mordarsdi and S. T. Williams. London: Academic Press Inc.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**, 221-271.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J. & Fan, H. (1995).** *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 706-711.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yao, Z. Y., Kan, F. L., Wang, E. T., Wei, G. H. & Chen, W. X. (2002).** Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 2219-2230.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. & Steward, G. F. (2003).** Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* **5**, 539-554.
- Zhang, C. C., Laurent, S., Sakr, S., Peng, L. & Bedu, S. (2006).** Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus of signals. *Mol Microbiol* **59**, 367-375.
- Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D. B. & Goodacre, R. (2004).** Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of Fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the

amplified fragment length polymorphism technique. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6619-6627.

APÉNDICE

Apéndice

Medios de
cultivo

Soluciones
Tampones

Equipos
empleados

Oligonucleótidos

MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Además de las cepas aisladas en este trabajo, nombradas con los códigos CAR, CGR, MIA y MIG, se han utilizado otros microorganismos con diferentes motivos, los cuales se exponen a continuación.

Cepa	Referencia
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA6 ^T	Jordan, 1982
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> JM109	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Ensifer meliloti</i> Sm1021	Meade <i>et al.</i> , 1982
<i>Frankia alni</i> ACN14a	Normand & Lalonde, 1982
<i>Micromonospora chersina</i> DSM 44151 ^T	Tomita <i>et al.</i> , 1992
<i>Micromonospora citrea</i> DSM 43903 ^T	Kroppenstedt <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora coriariae</i> NAR 01 ^T	Trujillo <i>et al.</i> , 2006
<i>Micromonospora eburnea</i> DSM 44814 ^T	Thawai <i>et al.</i> , 2005
<i>Micromonospora echinospora</i> DSM 43816 ^T	Luedemann & Brodsky, 1964a
<i>Micromonospora endolithica</i> DSM 44398 ^T	Hirsch <i>et al.</i> , 2004
<i>Micromonospora lupini</i> LUPAC 08	Trujillo <i>et al.</i> , 2007b
<i>Micromonospora lupini</i> LUPAC 14N ^T	Trujillo <i>et al.</i> , 2007b
<i>Micromonospora matsumotoense</i> DSM 44100 ^T	Asano <i>et al.</i> , 1989
<i>Micromonospora olivasterospora</i> DSM 43868 ^T	Kawamoto <i>et al.</i> , 1983
<i>Micromonospora rosaria</i> DSM 803 ^T	Horan & Brodsky, 1986
<i>Micromonospora saelicesensis</i> LUPAC 09 ^T	Trujillo <i>et al.</i> , 2007b
<i>Paenibacillus polymyxa</i> DSM 36 ^T	Prazmowski, 1880
<i>Proteus mirabilis</i> DSM 4479 ^T	Hauser, 1985
<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30140 ^T	Schroeter, 1886
<i>Rhizobium lupini</i> DSM 30134	Schroeter, 1886
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Kieser, 2000

MEDIOS DE CULTIVO

Salvo que se indique lo contrario, todos los medios, una vez mezclados sus componentes, se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 15 psi de presión (121°C).

Medio Ácido Húmico (HA)

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Extracto de levadura	1,0 g
Ácido húmico	0,2 g
Agar	18,0 g

Medio Avena

Se pone la avena a ebullición durante 20 minutos al 2% (p/v), posteriormente se filtra mediante una gasa de algodón y se ajusta de nuevo al volumen inicial para recuperar el agua evaporada y se añade agar al 1,8% y una solución de sales (1 ml/l).

Solución de sales:

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 g

Medio Basal (SA1)

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Glucosa	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Tryptona	5,0 g
Almidón	2,0 g
Triptosa	2,0 g
CaCO ₃	0,1 g
CoCl ₂	trazas g
Citrato de hierro	trazas g
Agar	18,0 g

Medio Base para fuentes de carbono (Medio de Stevenson)

Cada fuente de carbono se prepara de acuerdo a una concentración final del 3% (p/v) ó 0,3% (p/v) en agua destilada, según se trate de un azúcar o un aminoácido, respectivamente. Las soluciones son esterilizadas tres veces por tindalización a 100 °C durante 20 minutos.

La base de nitrógeno (Difco®) se prepara según las instrucciones del fabricante. Esta solución se esteriliza por filtración.

Por otro lado se prepara una solución de sales minerales, con agar al 1,8% (p/v), que se esteriliza en autoclave

Solución de sales:

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
KH ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Agar	18,0 g

Finalmente se mezclan las tres soluciones y se reparte el medio en placas.

Medio BAP Modificado

La composición del medio BAP se adecuó a los requerimientos de crecimiento de *Micromonospora*, según se indica a continuación.

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Glucosa	2,00 g
NH ₄ NO ₃	1,00 g
KH ₂ PO ₄	0,95 g
K ₂ HPO ₄	0,60 g
NH ₄ Cl	0,27 g
MgSO ₄	0,06 g
CaCl ₂	0,01 g
Solución de hierro *	1,00 ml
Solución de oligoelementos *	0,10 ml
Solución de vitaminas *	1,00 ml

*Solución de hierro:

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por 100 ml</u>
Citrato de hierro	1,00 g
Ácido cítrico	1,00 g

*Solución de oligoelementos:

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por 100 ml</u>
H ₃ BO ₃	2,86 g
MnCl ₂	1,81 g
ZnSO ₄	0,22 g
CuSO ₄	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,02 g
CoSO ₄	0,01 g

*Solución de vitaminas (se esteriliza por filtración):

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por 100 ml</u>
Tiamicina	0,01 g
Piridoxina	0,05 g
Ácido nicotínico	0,02
Biotina	0,01
Pantotenato de calcio	0,01
Riboflavina	0,01 g

Los componentes indicados sirven para preparar el medio BAP empleado como control positivo en las pruebas de fijación de nitrógeno (BAP N⁺C⁺). Para preparar el medio sin nitrógeno (BAP N⁻C⁺) no deben añadirse NH₄NO₃ ni NH₄Cl. En el caso del control negativo (BAP N⁻C⁻) no se añadió tampoco glucosa.

El medio sólido se preparó añadiendo 1,8% de agar, mientras que para el medio semisólido se añadió un 0,6% de agar.

Medio Bennett

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Extracto de carne	10,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Glucosa	10,0 g
Almidón	0,1 g
Triptosa	2,0 g
CaCO ₃	0,1 g
CoCl ₂	trazas g

Citrato de hierro amónico	trazas g
Agar	18,0 g

Medio Caseína-Almidón

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Almidón soluble	10,0 g
Caseína	0,3 g
KNO ₃	2,0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	trazas g
CaCO ₃	trazas g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	trazas g
Agar	18,0 g

Medio LB (Luria-Bertami)

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Bacto triptona	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
NaCl	10,0 g
Agar	18,0 g

Medio YMA (Yeast Manitol Agar)

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Manitol	10,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
K ₂ HPO ₄	0,2 g
MgSO ₄	0,2 g
Agar	20,0 g

Medio 65 o ISP-2

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Glucosa	4,0 g
Extracto de levadura	4,0 g
Extracto de malta	10,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Agar	18,0 g

El pH se ajusta a $7,2 \pm 0,2$ a 25°C con KOH antes de añadir el agar.

En el caso de preparar medio líquido no se añade CaCO₃.

Medio de Williams para pruebas de arbutina y esculina

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Citrato amónico-férrico	0,5 g
Extracto de levadura	3,0 g
Arbutina o esculina	1,0 g
Agar	7,5 g

Se ajusta a un pH de 7,2 y se funde el medio para repartir en tubos con 2 ml de medio, antes de esterilizar en autoclave.

En el caso del medio control no se añade ni arbutina ni esculina.

Medio de degradación de gelatina (solución de revelado)

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad</u>
Cl ₂ Hg	12,50 g
HCl	16,80 ml
Agua destilada	83,20 ml

Medio de degradación de Tween

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
Bacto peptona	10,0 g
Cloruro de calcio	5,0 g
Cloruro de sodio	0,1 g
Solución de Tween (Sigma®)	10,0 ml
Agar	15,0 g

El Tween se autoclava por separado y se mezcla posterior.

TAMPONES Y SOLUCIONES

Bromuro de etidio

Se emplea una solución stock de 10 mg/ml, añadiendo a cada gel la cantidad correspondiente para una concentración final de 0,5 µg/ml.

Solución Rigaud & Puppo

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
KH ₂ PO ₄	0,200 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,200 g
KCl	0,200 g
EDTA Fe Na ₂	0,025 g
Na ₂ Mo ₄	0,004 g
H ₃ BO ₃	0,018 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,020 g
ZnSO ₄	0,003 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,002 g

Tampón de carga

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Sacarosa	40,00% (p/v)
Azul de bromofenol	0,05% (p/v)

Tampón TEN

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Tris-Cl	0,10 M
EDTA · 2H ₂ O	0,10 M
NaCl	0,15 M

Ajustar a pH 8 con NaOH.

Tampón TBE

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Tris	100 mM
H ₃ BO ₃	83 mM
EDTA	1 mM

Tampón TAE

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1 mM

Tampón TE

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Tris (pH 8 con HCl)	10 mM
EDTA	1 mM

Tampón EC

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
Tris-Cl	6,0 mM
EDTA · 2H ₂ O	0,1 M
NaCl	1,0 M
Na Lauril Sarcosina	1,0% (p/v)
Desoxicolato de sodio	0,2% (p/v)

Ajustar a pH 7,6 con NaOH.

Tampón ESP

<u>Componentes</u>	<u>Concentración</u>
EDTA · 2H ₂ O	0,5 M
Na Lauril Sarcosina	1,0% (p/v)
Ajustar a pH 9,5 con NaOH.	

EQUIPOS EMPLEADOS

Baño de agua: *MultiTemp III* (Pharmacia Biotech[®])

Centrífuga de tubos Eppendorf: *Centrifuge 5418* (Eppendorf[®])

Centrífuga de tubos Falcon: *Allegra X-22R Centrifuge* (Beckman Coulter[®])

Cubetas de electroforesis: *Mini-Sub Cell GT* y *Wide Mini-Sub Cell GT* (Biorad[®])

Electroporador: *Electroporator 2510* (Eppendorf[®])

Equipo de DGGE: *Ingeny PhorU-2 System* (Ingeny[®])

Equipo de electroforesis en campo pulsante: *CHEF-DR III System* (Biorad[®])

Espectrofotómetro: *CO8000 Cell Density Meter* (Bioware[®])

Fuentes de electroforesis: *Power Pac 300* (Biorad[®])

Medidor de pH: *microPH 2000* (Crison[®])

Lupa Estereoscópica: *SM7800* (Nikon[®])

Termociclador: *GeneAmp PCR System 900* (Applied Biosystems[®])

Secuenciador capilar: *ABI PRISM System* (Applied Biosystems[®])

SpeedVac: *Speed Vac SPD101B* (Savant[®])

Termoblock: *Tembloc* (Selecta[®])

OLIGONUCLEÓTIDOS

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm	
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	68,2 °C	BOX-PCR
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	60,0 °C	DGGE
907R	CCGTCAATTCMTTGTAGTTT	52,2 °C	
968F	AACGCGAAGAACCTTAC	50,4 °C	
1401R	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	69,6 °C	
1522R	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	60,4 °C	Gen ARNr 16S
SF1	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	56,3 °C	
SR2	GWATTACCGCGGCKGCTG	59,4 °C	
SR3	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	52,2 °C	
SR4	GGGTTGCGCTCGTTG	54,7 °C	
ELA1	ATGGCKGCCATGGCCGAG	61,7 °C	Gen <i>nifH</i>
ELA2	GTTGAGRCGGCGGGCGA	61,2 °C	
IGK	TACGGYAARGCBGGYATCGG	61,7 °C	
NF462	AGGCCGGCGCGTACGAGGAC	67,6 °C	
NF480	ACCTCGACTTCGTCACCTAC	59,4 °C	
MGF	CACGGATCCGCAAGGGTGGTATT	64,2 °C	
MGR1	TGAAGCTTCTCGATGACCGTCAT	60,6 °C	
MGR2	TGAAGCTTCTCGATGACCGTCATCCG	66,4 °C	
MGrC	GTACTCGATGACCGTCATCCG	61,8 °C	
NDR-1	TTGGAGCCGGCRTANGCRCA	62,4 °C	
PolF	TGCGAYCCSARRGCBGGYATCGG	69,0 °C	
PolR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	59,4 °C	
GYF1	TCCGGYGGYCTGCACGGCGT	68,6 °C	Gen <i>gyrB</i>
GYR1B	CGGAAGCCCTCYTCGTGSGT	64,5 °C	
ITSP1F	TGCGGCTGGATCACCTCC	64,5 °C	ITS1 <i>Bradyrhizobium</i>
ITSPN1R	CMCGTCCTTCATCGSCTC	59,9 °C	
879F	GCCTGGGGAGTACGGCCGCA	67,6 °C	TP-RAPD
1522R	AAGGAGGTGATCCANCCRCA	60,4 °C	

Códigos: M: (AC), R: (AG), W: (AT), S:(CG), Y: (CT), K: (GT), V: (ACG), H: (ACT), D: (AGT), B: (CGT), N:(ACGT)