

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**



**CSIC**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**TESIS DOCTORAL**

**Título**

**ACTINOBACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE NÓDULOS  
DE *MEDICAGO SATIVA*: ANÁLISIS DE SU BIODIVERSIDAD Y  
SU POTENCIAL AGRONÓMICO COMO PGPR**

***Autor***

***Pilar Martínez Hidalgo***

***Directores***

***Dr. Eustoquio Martínez Molina***

***Dra. Martha E. Trujillo Toledo***

**2012**

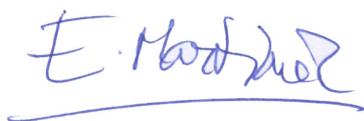


**D. Eustoquio Martínez Molina, Catedrático de Microbiología, y Dña. Martha E. Trujillo Toledo, Profesora Titular de Microbiología del departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,**

**CERTIFICAN:**

Que la Memoria titulada: "ACTINOBACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE NÓDULOS DE *MEDICAGO SATIVA*: ANÁLISIS DE SU BIODIVERSIDAD Y SU POTENCIAL AGRONÓMICO COMO PGPR", para optar al Grado de Doctor ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que conste, extendemos el presente certificado en Salamanca, a 25 de Septiembre de 2012.



Fdo. Dr. D. Eustoquio Martínez Molina



Fdo. Dr. Dña. Martha E. Trujillo Toledo



**Luis Fernández Lago, Profesor Titular de Microbiología y director del departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,**

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada "ACTINOBACTERIAS ENDOFÍTICAS AISLADAS DE NÓDULOS DE *MEDICAGO SATIVA*: ANÁLISIS DE SU BIODIVERSIDAD Y SU POTENCIAL AGRONÓMICO COMO PGPR", presentada por Pilar Martínez Hidalgo para optar al grado 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 25 de Septiembre de 2012.

Fdo. Luis Fernández Lago



## **Agradecimientos.**

Primero, a mis directores de tesis, por todo su apoyo y ayuda; pero no sólo a los oficiales, sino también a todos aquellos “directores adoptivos” a los que he tenido la suerte de poder acudir a por consejo, no sólo en Salamanca, sino también cuando las estancias me han llevado a Madrid, Granada y Perth.

El dinero, al que no siempre prestamos mucha atención, pero que especialmente ahora en época de vacas flacas nos damos cuenta lo mucho que lo necesitamos; tanto a los proyectos que han apoyado nuestra investigación, como a la beca que me ha proporcionado un sueldo, aunque me haya quejado de su importe alguna que otra vez: Gracias.

La compañía dentro del laboratorio, que siempre ha hecho más llevaderas las horas de trabajo. Gente que estaba ya aquí cuando llegué y ha tenido que marcharse, como suele ser común, y otros han venido para ocupar su lugar. Ha sido genial, todos los viajes, excursiones, los juegos online chorras, los cortos, los congresos, las noches de pinchos, vuestra ayuda e interés...

Y como olvidar la maravillosa gente que he encontrado en mis laboratorios de adopción, que me han hecho sentir como en casa, ayudándome en todo, haciendo de madres, de confidentes, de amigos de toda la vida.

Y a toda esa gente que ha estado ahí, desde el Éter, dándome ánimos, haciéndome reír, mandándome videos, haciendo de miembros del Gremio de Tipógrafos y llevándome a mundos fantásticos llenos de seres extraños.

A los que habéis andado a mi lado, haciendo tesis también, compartiendo problemas o quejándonos del curro, que siempre teníais un libro que recomendarme o prestarme, una foto que enseñarme o una historia en la cabeza que compartir.

A los que viven lejos, que ya me ayudaron a sobrevivir a la tesina y siguen ahí para contarlo y a los que viven aún más lejos, que consiguieron que los meses se me antojaran semanas, que un año sin respiro se convirtiera en unas cuantas noches de verano.

A aquellos que encontré casi sin intentarlo, con vosotros las cosas han sido más sencillas, algunos, que aunque lejos han estado cerca, otros con información para el futuro o un comic en el momento preciso, otros con un dibujo y alguno que otro con discusiones, planes y proyectos para lanzarnos al estrellato.

A la gente que conocí en Japón, y al resto del trío calavera sin los cuales quizá no hubiera ido (ni allí ni a muchos otros sitios), porque fue genial y sigue siéndolo.

A mi familia,

Y a los que os habéis quedado conmigo.



A mis padres.



# Índice



## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	3
La agricultura actual .....	4
Agricultura y legislación.....	5
Interacciones mutualistas planta microorganismo .....	6
Fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico. ....	7
Leguminosas .....	8
Género <i>Medicago</i> .....	11
La especie <i>Medicago sativa</i> .....	11
<i>Rhizobiaceae</i> .....	13
Género <i>Sinorhizobium</i> ( <i>Ensifer</i> ) .....	13
Asociación leguminosa- <i>Rhizobium</i> : proceso de nodulación .....	14
Tipos de nódulos fuera de la simbiosis leguminosa-Rhizobia .....	17
Ecosistema del nódulo .....	18
Bacterias intranodulares fijadoras de nitrógeno .....	19
Bacterias intranodulares no fijadoras de nitrógeno .....	20
<i>Actinobacteria</i> .....	21
Familia <i>Micromonosporaceae</i> .....	22
Género <i>Micromonospora</i> .....	23
Micorrizas .....	25
Importancia de PGPRs .....	26
Mecanismos para mejorar el desarrollo vegetal .....	27
Producción de fitohormonas .....	27
Nutrición vegetal .....	28
Nitrógeno .....	28
Fosfato .....	28
Sideróforos .....	28
Protección vegetal .....	29
Antibiosis .....	29
Enzimas líticas .....	30
Resistencia sistémica .....	30
Mecanismos de mejora de la tolerancia a factores ambientales .....	30
OBJETIVOS .....	35
MATERIAL Y MÉTODOS .....	39
Medios, soluciones y tampones .....	39
Aislamiento y caracterización de <i>Micromonospora</i> .....	45
Caracterización de <i>Sinorhizobium</i> .....	55
Técnicas de microscopía .....	57
Estudio de la capacidad PGPR de las cepas de <i>Micromonospora</i> .....	59
Estudio de micorrización .....	60

Protección frente a patógenos vegetales por <i>Micromonospora</i> .....	62
Fijación de nitrógeno en <i>Micromonospora</i> .....	67
Equipamiento .....	69
Cepas tipo de <i>Micromonospora</i> .....	70
 Capítulo 1.	
<b>AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE MICROMONOSPORA</b>	
<b>DE NÓDULOS DE ALFALFA (<i>MEDICAGO SATIVA</i>)</b> .....	73
Introducción .....	73
Aislamiento y conservación .....	75
Muestreo .....	75
Aislamiento .....	76
Conservación .....	76
Cepas microbianas aisladas .....	76
Estudios taxonómicos.....	77
Caracterización genotípica .....	78
Caracterización por BOX-PCR .....	78
Análisis de secuencias del gen del ARN ribosómico del 16S .....	81
Análisis de secuencias del gen estructural de la subunidad B de la girasa .....	85
Estudios fenotípicos .....	89
Caracterización morfológica .....	90
Estudio microscópico .....	91
Crecimiento y morfología de las colonias .....	91
Caracterización fisiológica .....	98
Utilización de diferentes sustratos como fuente de carbono .....	98
Utilización de aminoácidos .....	107
Degradación de sustratos .....	108
Producción de catalasa y oxidasa .....	113
Factores ambientales .....	113
Temperatura .....	114
pH .....	115
Salinidad .....	117
Análisis numérico .....	123
Discusión .....	125
 Capítulo 2	
<b>AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RHIZOBIA OBTENIDOS DE</b>	
<b>NÓDULOS DE ALFALFA</b> .....	129
Introducción .....	129
Aislamiento y conservación .....	130
Muestreo .....	130
Aislamiento .....	130
Conservación .....	130
Cepas de Rhizobia aisladas .....	131
Estudios taxonómicos .....	131

Análisis de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S .....	131
MALDI-TOF MS .....	133
Eficiencia simbiótica .....	136
Efecto sobre la nodulación.....	136
Efecto sobre la raíz .....	137
Efecto sobre el tallo .....	138
Discusión .....	138
Capítulo 3	
ESTUDIOS DE LA ACCIÓN PGPR DE <i>MICROMONOSPORA</i> .....	143
Introducción .....	143
Ensayos en cámara climatizada. ....	144
Ensayos de microcosmos en invernadero .....	147
Método de análisis Biplot.....	149
Resultados y discusión .....	150
Crecimiento y nutrición nitrogenada.....	152
Longitud de la parte aérea .....	152
Peso seco de la parte aérea.....	153
Longitud raíz.....	154
Peso seco de la raíz.....	155
Número de nódulos .....	156
Clorofila .....	157
Nitrógeno .....	158
Nitrógeno total .....	160
Carbono.....	161
Relación carbono nitrógeno .....	162
Número de entrenudos.....	163
Relación ancho/largo de los folíolos.....	164
Diámetro de la corona .....	164
Evaluación global de los resultados de crecimiento y nutrición nitrogenada .....	165
Ionómica .....	168
Azufre .....	169
Boro .....	170
Zinc .....	171
Calcio .....	171
Sodio .....	172
Cobre .....	173
Fósforo .....	174
Hierro .....	175
Magnesio .....	176
Manganeso .....	177
Potasio .....	177
Evaluación global de los resultados de ionómica .....	178
Selección de cepas de interés agronómico .....	180

Evaluación en invernadero del potencial como PGPR de las cepas de <i>Micromonospora</i> seleccionadas .....	182
Procedimiento .....	182
Resultados y discusión .....	183
Potencial PGPR de las cepas aisladas en Australia.....	185
Resultados y discusión .....	186
Longitud del tallo .....	186
Peso seco del tallo .....	187
Longitud de la raíz .....	188
Peso seco de la raíz .....	188
Número de nódulos .....	189
Diseño de inoculantes .....	190
Influencia de <i>Micromonospora</i> en la micorrización .....	192
Procedimiento. ....	193
Resultados y discusión .....	194

#### Capítulo 4

ESTUDIO MICROSCÓPICO DE NÓDULOS DE <i>MEDICAGO SATIVA</i> PROCEDENTES DE PLANTAS INOCULADAS CON <i>MICROMONOSPORA</i> .....	199
Introducción .....	199
Diseño experimental .....	200
Morfología de los nódulos .....	200
Estructura de los nódulos .....	203
Microscopía óptica .....	203
Microscopía electrónica .....	208
Microscopía de barrido convencional SEM. ....	208
Microscopía electrónica de barrido SEM (criofractura). ....	210
Microscopía de transmisión TEM .....	213
Discusión. ....	219

#### Capítulo 5

PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS VEGETALES POR <i>MICROMONOSPORA</i> .....	225
Introducción .....	225
Antibiosis .....	225
Estudios <i>in vitro</i> . ....	226
Procedimiento. ....	227
Resultados y discusión .....	227
Sideróforos .....	230
Procedimiento. ....	231
Resultados y discusión. ....	231
Inducción de los mecanismos de defensa vegetales. ....	232
Estudios de protección <i>in vivo</i> (planta entera) .....	233
Procedimiento .....	233
Resultados y discusión. ....	234
Estudios de protección <i>in vivo</i> (hojas escindidas) .....	235
Resultados y discusión .....	236

Inducción de las respuestas defensivas de la planta .....	238
Procedimiento .....	238
Cuantificación del ARN mensajero .....	238
Obtención y preparación de las muestras .....	239
Genes analizados .....	240
Resultados .....	240
Discusión .....	243
Capítulo 6	
CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE <i>MICROMONOSPORA</i> .....	249
Introducción .....	249
Crecimiento en medio semisólido libre de nitrógeno .....	250
Procedimiento .....	251
Resultados .....	251
Crecimiento en medio líquido sin nitrógeno .....	252
Procedimiento .....	252
Resultados .....	252
Medida de la reducción de acetileno .....	253
Ensayos en cultivo puro .....	253
Resultados .....	254
Ensayos <i>in planta</i> .....	254
Resultados .....	254
Incorporación de Nitrógeno 15. ....	255
Ensayos en cultivo puro .....	256
Resultados .....	256
Ensayos <i>in planta</i> .....	256
Procedimiento .....	257
Resultados .....	258
Discusión .....	259
Resumen final .....	263
Conclusiones .....	277
Bibliografía .....	281



# Introducción



## INTRODUCCIÓN

La agricultura nace en el periodo Neolítico, cuando las sociedades humanas nómadas, de recolectores, cazadores y pescadores, evolucionaron hacia la agricultura y la ganadería y como consecuencia al sedentarismo. La agricultura se desarrolló en varias zonas de forma independiente (Figura 1). La más antigua tiene su origen en el denominado Creciente fértil (zona de la antigua Mesopotamia) y de ahí se extiende a Egipto. Casi con la misma antigüedad se desarrolla al este de Asia, posteriormente en África central, y por último las culturas precolombinas de América Central.

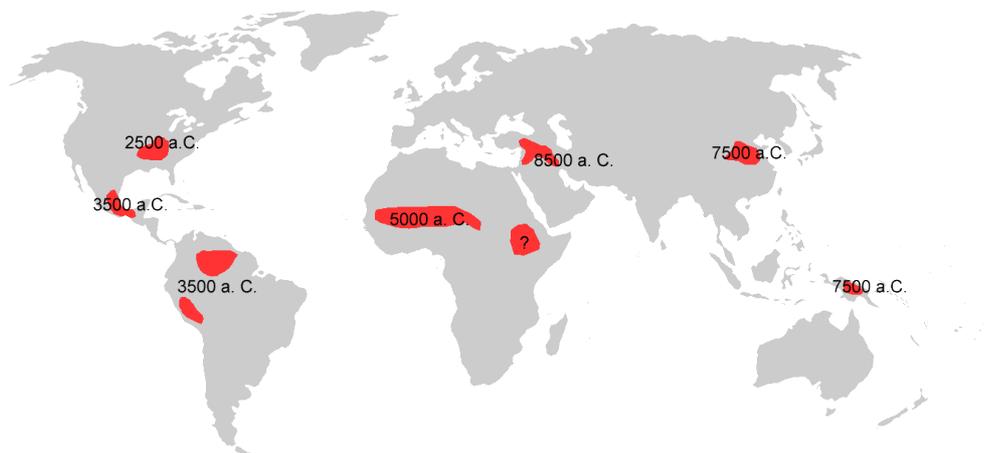


Figura 1. Desarrollo independiente de la agricultura en los diferentes continentes.

Se produce una transición gradual, desde una sociedad nómada basada en la caza y recolección, a la sociedad agrícola. La agricultura permite los primeros asentamientos estables, en los que de forma progresiva, se acentúa la división del trabajo y surge una sociedad más variada y compleja. Adquieren cada vez más importancia los oficios artesanales y comerciales, se crean los primeros sistema jurídicos y de gobierno para resolver los conflictos que surgen en esta sociedad, cada vez más diversa de los primeros asentamientos agrícolas.

Desde sus inicios, hace más de 10.000 años, la agricultura ha ido evolucionando en la mejora de los instrumentos de labranza, la consideración social de los agricultores y en la gestión de la economía agraria, pero se ha mantenido el manejo y la estructura básica del sistema productivo durante milenios.



Figura 2. Representaciones de las prácticas agrícolas en el antiguo Egipto encontradas en Set Maat y las tumbas de Menna y Nakht.

Tras la era de los descubrimientos, se produce un intercambio de cultivos entre los países del Viejo y el Nuevo mundo. Se introducen en América, con gran éxito, cultivos tradicionales del mediterráneo como el trigo, la vid y el olivo junto a cultivos de zonas cálidas como la caña de azúcar, el algodón y el café. Desde el Nuevo Mundo se importan cultivos de gran importancia económica: maíz, frijol, patata, cacao, tomate, pimiento etc. que suponen cambios en la diversidad de la agricultura y en los hábitos alimentarios en todos los continentes.

El gran cambio en la agricultura se produce en la segunda mitad del siglo XX, es la denominada revolución verde, que tiene tres pilares básicos, los avances en genética de plantas con especies de alta productividad, la mecanización del campo y la utilización masiva de agroquímicos de síntesis (fertilizantes y pesticidas). Esta nueva agricultura, que podemos denominar también agricultura de mercado, es cada vez más dependiente de los plaguicidas y abonos químicos y trae como consecuencia, graves problemas medioambientales (contaminación de la atmósfera, suelos y acuíferos) y una severa reducción de la biodiversidad. La respuesta a esta situación es la denominada agricultura sostenible.

## La agricultura actual

Las técnicas agrícolas actuales, como se ha comentado, están basadas en el uso masivo de productos químicos, tanto para la fertilización de los cultivos como para la protección de la planta contra patógenos y malas hierbas. Todo esto, junto al desarrollo de nuevos cultivares de las especies agrícolas de más uso, ha permitido alcanzar y mantener las altas tasas de producción que son necesarias

en la actualidad. Sin embargo, pese a los beneficios innegables de la utilización de estas técnicas productivas, su uso masivo e indiscriminado ha originado problemas medioambientales tales como la eutrofización de las aguas y aumento de gases de efecto invernadero en la atmósfera (Gruber & Galloway, 2008) así como peligros para la salud humana, debidos a la formación de aerosoles y la acumulación de nitratos en acuíferos (Figura 3).

- **SALUD HUMANA**
  - Metahemoglobinemia
  - Cancer
  - Problemas respiratorios
- **MEDIO AMBIENTE**
  - **CONTAMINACIÓN DE AGUAS**
    - Calidad del agua
    - Eutrofización
  - **CONTAMINACIÓN DEL AIRE**
    - Destrucción de la capa de ozono
    - Efecto invernadero
    - Lluvia ácida
  - **CONTAMINACIÓN DEL SUELO**
    - Toxicidad en plantas
    - Crecimiento vegetal excesivo
    - Acidificación

Figura 3. Efectos adversos en el medio ambiente y salud causados por el uso masivo de fertilizantes nitrogenados (Bohlool *et al.*, 1992).

Para resolver estos problemas, es importante desarrollar métodos nuevos de producción, que sean sostenibles a nivel ecológico, pero al mismo tiempo permitan mantener el nivel de producción actual con inversiones razonables.

## Agricultura y legislación

Los problemas derivados del uso de agroquímicos han despertado el interés y la preocupación, de los consumidores, empresas y administraciones públicas y en la actualidad se están buscando alternativas a los productos químicos, por diversas vías. Esta preocupación se ha plasmado en directivas europeas y legislaciones nacionales que se han dirigido a mejorar el aprovechamiento de los recursos del propio suelo y la utilización sistemas naturales y respetuosos con el medio ambiente, para la promoción del crecimiento vegetal, evitando en lo posible el uso de agroquímicos. Entre estos nuevos sistemas se incluyen los microorganismos PGPB, que incrementan la producción vegetal por diferentes vías: (i) mejorando la nutrición de las plantas por medio de la fijación, solubilización y movilización de nutrientes, (ii) mediante la síntesis de fitohormonas y (iii) mejorando la salud de las plantas (control microbiano de patógenos) mediante las síntesis de sustancias que inhiben el crecimiento de los

patógenos o induciendo las rutas defensivas de las plantas. (Bloemberg & Lugtenberg, 2001) (Schrey & Tarkka, 2008).

La ley de Sanidad Vegetal (43/2002 del 20 de noviembre de 2002) incluye en uno de sus capítulos la utilización de los microorganismos como agentes biológicos útiles para los cultivos y también la renovación de la Directiva 414/1995 contempla la sustitución de pesticidas y nutrientes químicos por otros sistemas biológicos de producción integrada, con el objetivo de minimizar los riesgos para la salud. Según la directiva de la Agencia de Seguridad Alimentaria, utilizando microorganismos como biofertilizantes, por su potencial para favorecer la nutrición de las plantas y además como elicitores de los sistemas de resistencia frente a patógenos, así como de producción de fitohormonas, se puede conseguir el efecto deseado.

Recientemente, en septiembre de 2012, se ha aprobado el marco de actuación para el uso sostenible de productos fitosanitarios que contempla medidas para el sector de la distribución, los agricultores y otros usuarios a partir de 2014. El objetivo de este Real Decreto es garantizar el menor impacto posible por el uso de agroquímicos fomentando el principio de gestión integrado de plagas a partir de 2014 que se basa en la utilización de sistemas de control biológico junto con los tradicionales de control químico sin que afecte a la rentabilidad económica.

## **Interacciones mutualistas planta microorganismo**

Disponemos de alternativas a los métodos tradicionales de abonado y control de enfermedades, basados en productos químicos, son los PGPRs (del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria), que son microorganismos promotores del crecimiento vegetal y su utilidad ya ha sido demostrada. Los mecanismos que producen los efectos beneficiosos sobre los cultivos pueden ser indirectos como el control de patógenos o la inducción de rutas de defensa de la planta y también directos como la fijación biológica de nitrógeno, aumento de la disponibilidad de ciertos nutrientes, aumento de la superficie radicular, efecto sinérgico con otras bacterias beneficiosas del interior de la planta, etc. (Vessey, 2003).

Existen también bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (como *Azospirillum*, *Bacillus Paenibacillus*...) cuya actividad supone una fuente de nitrógeno para plantas que no pueden formar nódulos, por lo que aunque su capacidad fijadora suele ser mucho menor, pueden adaptarse a más tipos de cultivos (Okon & Itzigsohn, 1995) (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998) (Elvira-Recuenco & van Vuurde, 2000) (Pedrosa, 2001) (Baldani & Baldani, 2005) (Valverde *et al.*, 2005). Estas bacterias se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Figura 4).

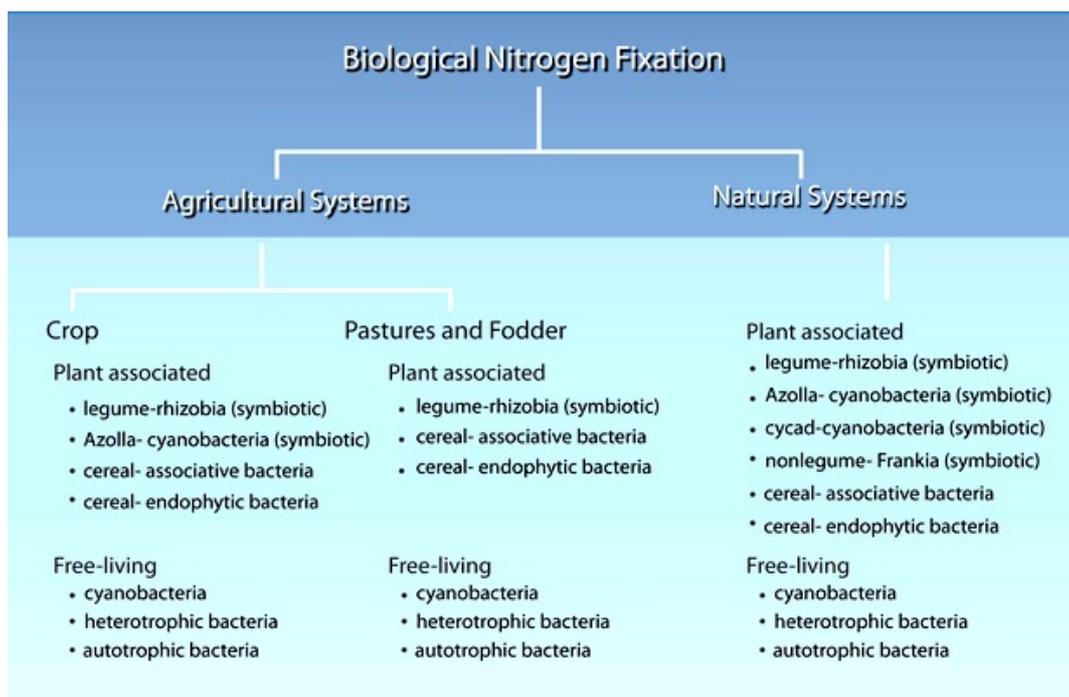


Figura 4. Esquema de la fijación biológica de nitrógeno en los diferentes sistemas (Wagner, 2011).

Los mejores resultados, se han obtenido con de bacterias capaces de fijar el nitrógeno atmosférico y proporcionárselo a la planta en formas que pueda absorber. Las simbiosis mutualistas entre bacterias fijadoras de nitrógeno y plantas son un hecho evolutivo de gran importancia, ya que unen dos rutas bioquímicas esenciales para el mantenimiento de la vida: fijación de carbono y de nitrógeno. Estas asociaciones tienen una gran importancia medioambiental, ya que las plantas actúan como sumideros de CO<sub>2</sub>, pero si además son autónomas en cuanto a la nutrición nitrogenada, retiran más cantidad de este gas con efecto invernadero de la atmósfera que otro tipo de plantas. Esto es especialmente importante en plantas leñosas (Sprenst & Parsons, 2000) (Temperton *et al.*, 2003).

### Fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico

Este proceso tiene lugar entre bacterias que pertenecen a un reducido grupo de géneros y las leguminosas y plantas actinorrízicas. Las actinorrizas son árboles o arbustos capaces de colonizar suelos pobres en nitrógeno y tienen importancia desde un punto de vista ecológico y forestal. Estas plantas establecen simbiosis fijadoras de nitrógeno con bacterias del género *Frankia*.

La asociación mutualista entre leguminosas y bacterias que denominamos genéricamente Rhizobia, tiene mucha más importancia, desde el punto de vista de la producción agrícola. El desarrollo de esta interacción es un proceso complejo en el que la planta y el microsimbionte establecen una serie de

intercambios a nivel fisiológico, bioquímico y genético que culmina con la formación del nódulo fijador de nitrógeno atmosférico (Figura 7).

### Leguminosas

Las leguminosas engloban un grupo de plantas, consideradas ahora como una familia monofilética nombrada indistintamente *Leguminosae* y *Fabaceae*, ambos nombres están aceptados (Lewis *et al.*, 2005). La palabra leguminosa proviene del latín *legumen*, que significa semillas con vaina y es el carácter que justifica uno de los nombres de esta familia del orden *Fabales*. Este orden se encuentra en la clase *Magnoliopsidae*, dentro de la División *Magnoliophita*.

Las características distintivas de este grupo de plantas son la producción de un fruto envuelto en una vaina, la forma de sus flores, en muchas ocasiones papilionáceas y la simbiosis mutualista que muchos de sus componentes mantienen con microorganismos formadores de nódulos fijadores de nitrógeno.



Figura 5. Representantes de la familia *Leguminosae*, mostrando características distintivas del grupo.

La forma de las flores papilionáceas se caracteriza por presentar un pétalo principal erguido llamado estandarte que envuelve al resto, dos pétalos laterales denominados alas y por último dos inferiores generalmente soldados que conforman la quilla que se ven envueltos a su vez por las alas. En otros casos (principalmente en *Mimosoidea*) las flores son actinomorfas, de diversos tamaños. Estas flores pueden encontrarse solitarias o en racimos, incluso a veces en umbelas.

Las legumbres son monocarpelares y generalmente polispérmicas, con frecuencia son dehiscentes por la nervadura media, pero existen algunos géneros con frutos indehiscentes. Algunas especies tienen curiosas adaptaciones como *Arachis*, cuyo fruto se entierra en el suelo, y *Tipuana* cuyo fruto está convertido en una sámara.

La familia *Leguminosae* se subdivide a su vez en tres subfamilias: *Faboideae*, *Mimosoideae* y *Cesalpinioideae* (Figura 6). Aunque esta subdivisión ha quedado obsoleta y parece que deberían aceptarse un número mayor de subfamilias entre las *Leguminosae*, todavía no hay acuerdo sobre el número que podrían entrar a formar parte de esta familia. Por ahora sólo existe consenso en que *Cercideae* podría ser una de estas nuevas subfamilias (Souza & Lorenzi, 2008).

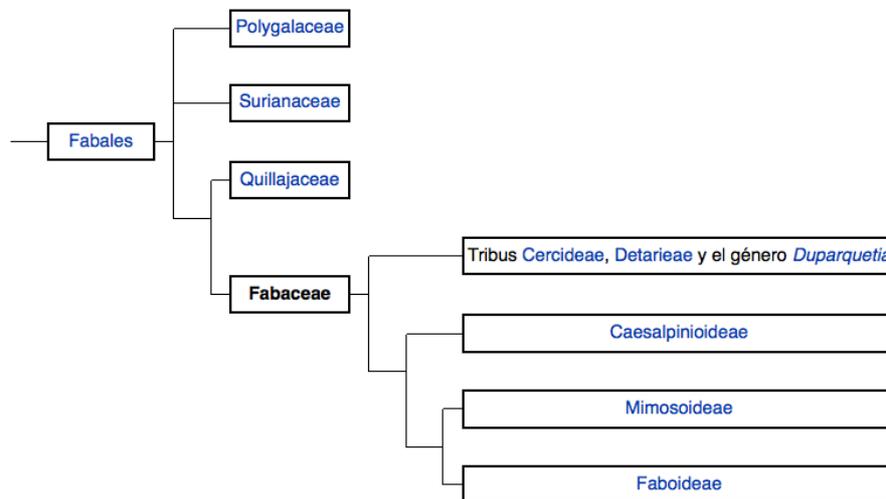


Figura 6. Árbol filogenético de la situación de la familia *Fabaceae*.

Aunque en las tres subfamilias clásicas se han encontrado especies formadoras de nódulos, son principalmente las dos primeras las que se consideran como principales subfamilias simbióticas. En las *Cesalpinioideae*, de hecho, se piensa que muchos de sus géneros no pueden formar nódulos.

Esta familia tiene una distribución cosmopolita, contiene alrededor de 730 géneros y 19.400 especies, lo que hace que esta sea la tercera familia con más especies después de las compuestas y las orquídeas (Judd *et al.* 2002).

La importancia económica de las leguminosas es amplia. Muchas de sus especies han sido utilizadas como sustitutos de sustancias tan conocidas y utilizadas como el café, jabón o el tabaco (Lewis *et al.*, 2005). Como recurso alimenticio, las leguminosas han sido utilizadas desde hace miles de años, de hecho, se cree que una de las primeras especies cultivadas fue la lenteja, una leguminosa. Junto con los cereales componen la base de la alimentación humana. La contribución alimenticia de estas plantas es de enorme importancia gracias a su alto contenido proteico (alrededor del 20% del peso) y su riqueza en carbohidratos, fibra y vitamina B, además de ser, por lo general, bajas en lípidos. A la extendida utilización de algunas de sus especies como forraje para ganado (como *Medicago sativa* o *Trifolium repens*) se añade también su uso para la recuperación de suelos, como abono verde, gracias a su alto contenido en nitrógeno, o planta pionera en suelos pobres o que han perdido fertilidad, debido a su independencia del contenido en nitrógeno asimilable en esos suelos.

Como contrapunto, hay algunos factores negativos de estas plantas que se supone que han evolucionado como defensa, frente a la gran cantidad de herbívoros que las buscaban como alimento por su contenido en nitrógeno. La producción de alcaloides es un buen ejemplo, además de otros problemas como su deficiencia en aminoácidos azufrados y ciertos componentes biológicamente activos que afectan a la digestibilidad de proteínas y azúcares. Aunque no siempre son perjudiciales, se ha empleado la mejora genética en algunos casos para disminuir o eliminar el contenido en estos compuestos de determinadas leguminosas.

En la alimentación de ganado, también hay muchas especies que se utilizan por sus beneficios en cuanto a la calidad de la carne y la leche, por lo que se suelen sembrar en asociación con gramíneas forrajeras. Su único problema es la baja adaptabilidad de la mayoría de las leguminosas a suelos ácidos o pobres en fósforo, pero aún así, hay algunas especies que se adaptan a estos terrenos, como *Ornithopus* o *Lupinus*.

Las leguminosas también son útiles en la industria, a partir de ellas se pueden obtener gomas, como la goma arábiga u otras con las que se pueden fabricar pegamentos, aceites para cosméticos y también tintes, tanto para tejidos como para histología. Uno de los colorantes más conocidos, el índigo, se extrae de una especie de *Indigofera*. Algunas especies leñosas son cultivadas para madera como *Dalbergia nigra*. Muchas especies son utilizadas como ornamentales, por sus llamativas flores y variedad de formas y tamaños para jardines, como arbustos de vallas y también es común ver algunas especies en floristerías.

La simbiosis mutualista que mantienen las leguminosas y los Rhizobia es exclusiva de esta familia y de un género de *Ulmaceae*: *Parasponia*, y fuera de ella, tan sólo unas pocas especies vegetales tiene la capacidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno en conjunto con bacterias no Rhizobia. Uno de los ejemplos más conocidos es la simbiosis actinorrícica de *Frankia* (una actinobacteria) con *Alnus*, *Hippophae*, *Casuarina*, *Eleagnus*, *Myrica*, *Morella*, *Comptonia* etc.. Sin embargo, son las leguminosas las que acumulan el mayor porcentaje de plantas fijadoras de nitrógeno. Este proceso se lleva a cabo en nódulos generalmente radiculares, aunque en algunas excepciones se encuentran en el tallo. Aunque las tres subfamilias de leguminosas tienen especies capaces de producir nódulos, son menos frecuentes en las *Cesalpinoidae*, siendo las *Papilionoideae* las que presentan un mayor número de especies capaces de nodular. Sin embargo, el hecho de que en ningún caso todas las especies de las subfamilias sean capaces de formar nódulos indica que esta capacidad surgió varias veces en el transcurso de la evolución de estas plantas y que en algunas ramas se ha perdido.

## Género *Medicago*

Dentro de la subfamilia *Faboideae*, tribu *Trifolieae* (figura 7), es un género cuyos límites están poco claros, algunas de sus especies se han reubicado en otros grupos, al contrario que *Trifolium*, cuyos límites parecen más claros. Contiene 83 especies y es originaria de Europa y Asia occidental.

Este género se compone de plantas de porte herbáceo o arbustivo, de climas templados y mediterráneos, anuales y perennes, con hojas alternas y trifoliadas. Sus flores son papilionáceas de tonos morados o amarillos. Y se disponen de forma individual, en racimos, en parejas o en las axilas foliares.

El fruto se caracteriza por ser una vaina de forma helicoidal frecuentemente con espinas, dentro de la cual se encuentran varias semillas, por lo general de forma arriñonada.

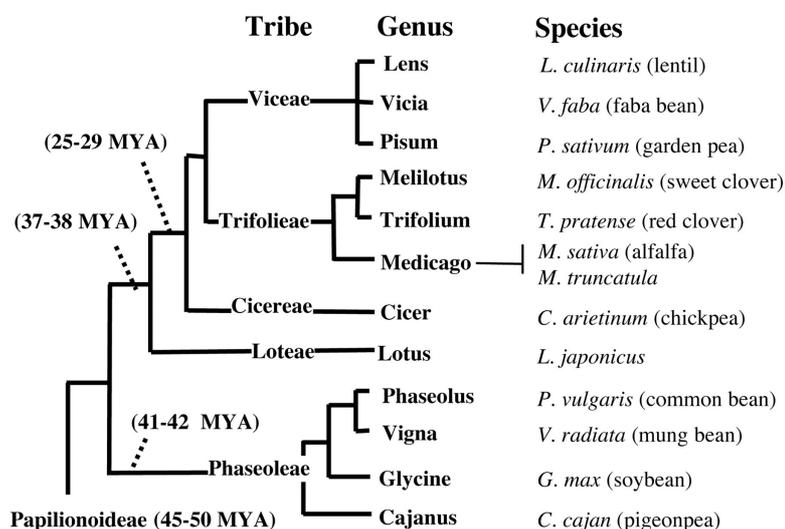


Figura 7 Relaciones taxonómicas entre los dos clados de mayor magnitud entre las leguminosas cosechables. Tiempos de divergencia estimados por "Penalised Likelihood analysis". La mayoría se encuentra en el clado de los galegoideos, con las tribus *Vicia*, *Trifolieae* y *Cicereae* o en el clado de los *Phaseoloideae*, sinónimo de la tribu *Phaseoleae* (Choi *et al.*, 2004).

La especie *Medicago sativa*: De nombre común alfalfa (Figura 8), es una de las especies forrajeras más importantes a nivel mundial. Su origen se sitúa en Asia Menor y el Sur del Cáucaso y es conocida su utilización por los romanos y griegos en cosechas para alimentar ciertos tipos de ganado. Su nombre científico viene de medica, ya que se creía que esta planta era originaria de la antigua Medas (ahora Irán), probablemente una creencia acertada. El nombre en español viene del árabe y fue llevado a América con los colonos, que sembraron allí esta planta para alimentación de caballos, donde el nombre fue adoptado también por los colonos ingleses.

Además de como forrajera, la alfalfa ha sido utilizada en medicina tradicional, usada para mejorar la digestión, problemas de riñones, etc.

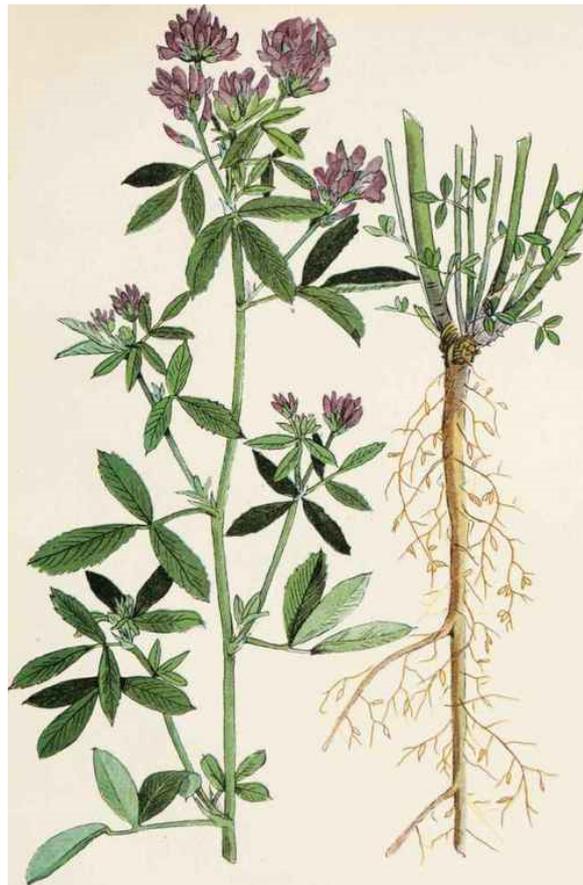


Figura 8. Dibujo de una planta de alfalfa (Clark *et al.* 1913).

Son tetraploides, su morfología es típica de leguminosas (Figura 9), con hojas trifoliadas, flores papilionáceas que son generalmente polinizadas por abejas y frutos en vainas helicoidales que suelen dar de 2 a 3 vueltas y contienen entre 10 y 20 semillas en su interior, que son autotóxicas: se inhibe su germinación si hay otra semilla próxima. Otras características propias de la especie son la presencia de raíz pivotante que puede alcanzar hasta 4 metros de profundidad (se han encontrado casos en los que la raíz medía hasta 15 metros). Sus tallos pueden alcanzar hasta los 90 centímetros de altura y a partir de la corona pueden salir más de 25 rebrotes. La cosecha suele realizarse cuando un 10% del campo de alfalfa ha llegado a floración, el momento en el que hay una mayor cantidad de carbohidratos, esta puede hacerse entre 4 y 10 veces al año en la práctica agrícola habitual en nuestra zona. Los tallos cortados para cosechar rebrotarán de la corona, que puede sobrevivir entre 5 y 12 años.



Figura 9. Detalle de la flor de *Medicago sativa* (izquierda) y de una hoja (derecha).

Se considera que la alfalfa tiene una resistencia moderada a la salinidad en los primeros estadios de su crecimiento y esta se ve incrementada con la edad de la planta. También, gracias a su sistema radicular especialmente profundo, su resistencia a la sequía es alta.

Sin embargo, el pH del suelo debe ser neutro para su correcto crecimiento, siempre alrededor de 7 así como un suelo que drene bien el agua, ya que soporta muy mal el encharcamiento, también necesita un aporte adecuado de fósforo y potasio.

### Rhizobiaceae

Es una familia de bacterias bastante heterogénea cuyas características comunes son una forma bacilar, ser Gram negativas y aerobias. Se considera que los géneros con capacidades formadoras de nódulos de esta familia son *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (ahora *Ensifer*) y *Shinella*, los cuales también comparten una capacidad de crecimiento muy rápida, de alrededor de 3 días.

La taxonomía de los Rhizobia ha sufrido una gran cantidad de cambios desde que los primeros fueron descubiertos en el interior de nódulos de leguminosas. El primer género y especie fueron descritos por Frank (1889) y debido a las nuevas técnicas moleculares y al análisis de diferentes especies de leguminosas, el número de especies de Rhizobia descritas han aumentado significativamente. Además se han descrito especies capaces de nodular pero no estaban consideradas dentro de los Rhizobia clásicos.

### *Género Sinorhizobium (Ensifer)*

Este género está compuesto por bacilos Gram negativos, de un tamaño aproximado que oscila entre los 0,5 y 1  $\mu\text{m}$  de ancho por 1,2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo. Son aerobios y por lo general poseen gránulos de  $\beta$ -hidroxibutirato. No son

esporulados. Presentan un flagelo que les proporciona movilidad y su situación puede ser polar o subpolar, o en mayor cantidad (hasta seis) si son peritricos.

Las colonias que forman son semiesféricas blancas y translúcidas y de aspecto muy mucoso.

*Sinorhizobium*, renombrado recientemente *Ensifer* después de varios años de controversia en la comunidad científica, contiene 16 especies siendo *S. fredii* la especie tipo.

Pese a que ya es un hecho que todas las especies de *Sinorhizobium* han sido renombradas de manera oficial como *Ensifer* por el Comité Judicial de Taxonomía de Bacterias, ya que el término *Sinorhizobium* aún es utilizado ampliamente y en algunos casos con renuencia a cambiarlo, esta será la forma en la que se nombrará al género a partir de ahora.

La especie que nodula a *M. sativa* es tradicionalmente *S. meliloti*, pero recientes estudios han descubierto que la eficiencia de la nodulación con *S. medicae* es muy alta, aunque no tanto como con *meliloti* (Terpolilli *et al.*, 2008).

#### Asociación leguminosa *Rhizobium*: Proceso de nodulación

Las leguminosas aparecieron hace 60 millones de años aproximadamente, la nodulación hace 58 (Sprent, 2007) lo que nos da una idea de lo intrínsecamente unidos que están los organismos que forman parte de esta asociación.

Los Rhizobia en general son incapaces por sí mismos de generar el ambiente necesario para la fijación de nitrógeno, en el que es necesaria una baja concentración de oxígeno para proteger la nitrogenasa, por lo que necesitan a la planta para crear este ambiente por medio de los nódulos.

Esta simbiosis es la fuente más importante de fijación biológica de nitrógeno en sistemas agrícolas. El proceso es el siguiente: *Rhizobium* infecta las células corticales de la raíz, provocando una inducción de la formación de estos órganos vegetales: los nódulos, en cuyo interior las bacterias fijan nitrógeno atmosférico.

La formación del nódulo se lleva a cabo por medio de varios procesos. El primero es la inducción de la división celular coordinada en el córtex y el periciclo de la raíz. Después se produce la organogénesis del nódulo, en la cual es necesaria la interacción entre hormonas endógenas y moléculas señal. Se ha demostrado que todo el proceso de formación de los nódulos y también el número de nódulos que se forman están controlados por hormonas: Las primeras fases de diferenciación están regidas por auxinas, giberelinas y citoquininas entre otros como reguladores positivos y el etileno, ácido abscísico, jasmónico y salicílico actúan como reguladores negativos de la nodulación (Lluch *et al.*, 2011).

Por parte de la bacteria la forma de penetración al interior de la planta se puede producir por diferentes mecanismos: a través de pelos radicales, por heridas o grietas de las células de la raíz o por los espacios intercelulares (Figura 10).

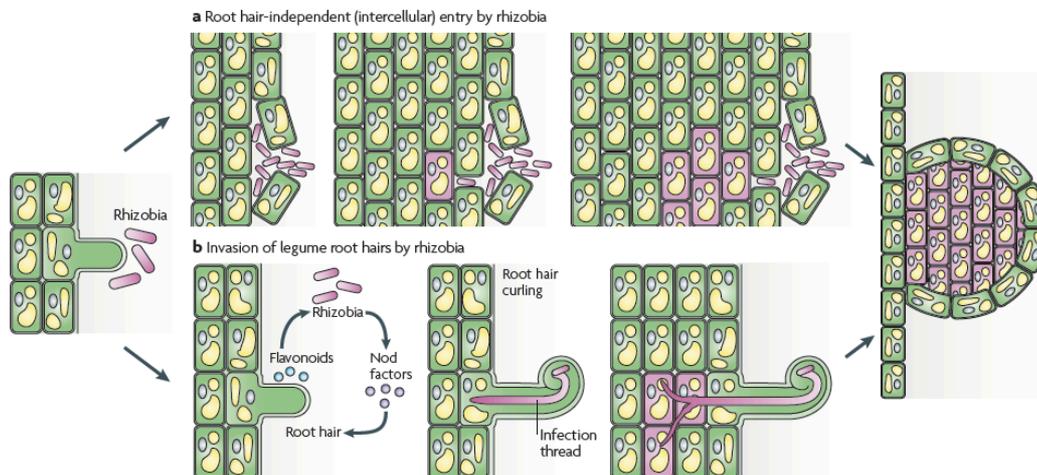


Figura 10. Tipos de mecanismos de entrada de *Rhizobium* en el nódulo. (Deakin & Broughton, 2009).

Por pelos radicales: En la mayoría de leguminosas se produce este tipo de entrada, que se realiza por la punta de los pelos radicales, en los que las bacterias y la planta forman un canal tubular denominado canal de infección, que entra hasta el interior de la célula donde se transformarán en bacteroides, formas bacterianas incapaces de reproducirse pero fijadoras de nitrógeno y se formará el nódulo. Hay una serie de metabolitos secundarios producidos y excretados por la bacteria para comunicarse con la planta y viceversa (Figura 10).

Por "cracks" (aberturas o grietas): A partir de roturas en la epidermis o de zonas de emergencia de raíces laterales, las bacterias pueden llegar al interior de las células que conforman el primordio nodular. En los casos en los que la grieta no sea suficientemente profunda, la infección puede continuar por vía inter o intracelular. Este mecanismo se da fundamentalmente en leguminosas tropicales o en plantas acuáticas.

Por espacios intercelulares: Es independiente de los factores de nodulación y puede darse incluso en plantas que no poseen los receptores adecuados o no producen ningún factor de nodulación propio. Se supone que este modelo fue el inicial, más rudimentario y que después fue evolucionando hacia mecanismos más desarrollados como el de los pelos radicales, que son mucho más eficientes en la fijación de nitrógeno. Este sistema es poco conocido y aún se especula con los posibles detonantes de la formación de nódulos en las infecciones por espacios intercelulares, ya que no hay factores ni hormonas conocidas involucradas.

Es importante para la planta controlar las respuestas defensivas al ser infectada por Rhizobia, ya que una respuesta demasiado alta impediría la colonización de las células vegetales por parte de la bacteria. Esta es la razón de que la bacteria deba entrar en el interior de la planta evitando la activación de sus sistemas defensivos. Los factores de nodulación influyen en la intensidad de la respuesta defensiva vegetal y los Rhizobia producen metabolitos similares a los de patógenos para evitar las defensas de la planta, como pueden ser antioxidantes o inhibidores de etileno (Soto *et al.*, 2006).

La respuesta de la planta hospedadora suele ser local y poco duradera, para que la formación del nódulo pueda llevarse finalmente a cabo.

La estructura de los nódulos es variada de tal forma que se han subdividido en tipos según su forma. Los dos tipos fundamentales de nódulos son los siguientes:

Nódulos determinados. Tienen forma esférica y no poseen meristemo persistente. Las plantas que presentan este tipo de nódulos son mucho menos abundantes que aquellas que forman nódulos indeterminados. Algunos ejemplos de plantas formadoras de nódulos determinados son *Arachis*, *Phaseolus* o *Glycine*.

Nódulos indeterminados. Contienen un meristemo persistente que les confiere una forma característica piriforme, semejante a dedos y que a menudo se presentan en grupos o se subdividen en varias lóbulos.

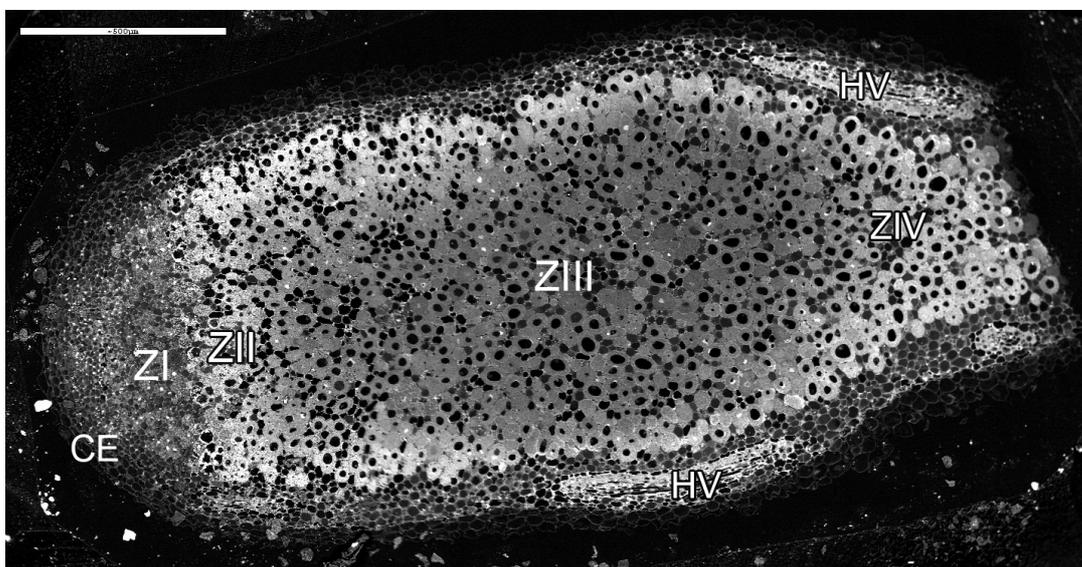


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido en un corte longitudinal de un nódulo de *Medicago sativa* incluido en resina. CE: corteza externa, HV: haz vascular, ZI: zona meristemática, ZII: zona de invasión, ZIII: zona de fijación, ZIV: zona de senescencia (Original).

Un subgrupo especial dentro de los nódulos indeterminados lo conforma *Lupinus*, un género cuyos nódulos se forman alrededor de la raíz en un anillo engrosado que carece de meristemo terminal.

Los nódulos indeterminados se diferencian en varias zonas, como muestra la figura 11, que son: Zona meristemática (en la que las células vegetales se dividen activamente), zona de invasión (en la que las células son infectadas con Rhizobia), zona de prefijación (interzonas II y III), zona de fijación (donde se realiza la fijación de nitrógeno) y zona de senescencia.

Ejemplos de nódulos indeterminados son los que proceden de *Medicago* o *Trifolium*.

### Tipos de nódulos fuera de la simbiosis leguminosa-Rhizobia

Además de los nódulos determinados e indeterminados propios de leguminosas en simbiosis con Rhizobia, existen nódulos formados por otros tipos de microorganismos, en otras familias de plantas o ambas a la vez. Dada la diversidad de estos, únicamente nos centramos en las asociaciones de plantas con *Actinobacteria* o de leguminosas con microorganismos no Rhizobia, que son especialmente interesantes para este trabajo por poseer características similares a los nódulos encontrados en los ensayos realizados.

- Nódulos de plantas actinorrícicas (Figura 12): Se basan en la interacción entre *Frankia* y más de 200 especies de plantas no leguminosas entre las que se encuentran *Alnus*, *Casuarina*, *Comptonia* etc. Se diferencian de los nódulos de leguminosas por poseer un haz vascular central rodeado de tejido infectado por la *Actinobacteria*. (Wall, 2000).



Figura 12. Izquierda: nódulos actinorrícicos en *Alnus* (<http://blog.targethealth.com/?p=779>) Derecha: Microscopía electrónica de transmisión de este tipo de nódulos. V. vesícula que contiene al simbiote (Valverde & Wall, 1999).

- Nódulos de *Parasponia* (Figura 13): Se forman también por modificaciones en la raíz lateral, del mismo modo que ocurre en los nódulos actinorrhízicos (Soltis *et al.*, 1995).

La peculiaridad de esta simbiosis es que la bacteria permanece en el interior de los canales de infección, sin llegar a invadir la célula.

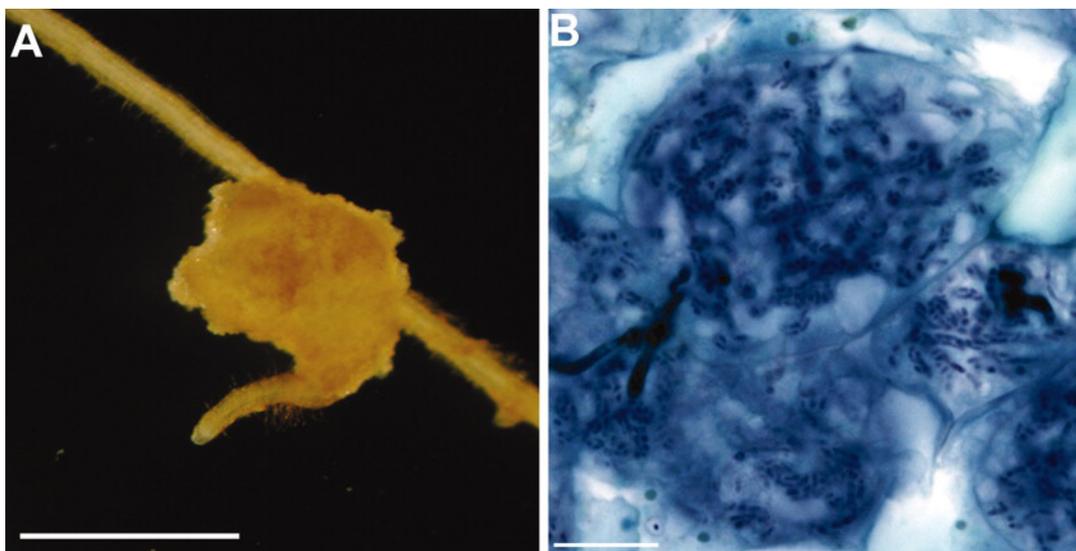


Figura 13. A. Nódulo de *Parasponia*. B. Microscopía óptica de un corte de un nódulo de *Parasponia* infectado con *Rhizobium*. Se observan los canales de infección. (Camp *et al.*, 2011).

### Ecosistema del nódulo

El suelo es un ecosistema muy complejo en el que una gran diversidad de organismos interactúan, dando lugar a asociaciones de muy diversa índole. Las plantas también habitan este ecosistema por medio de sus raíces y establecen interacciones con microorganismos en la rizosfera.

En los últimos años, el interés por descubrir más sobre estas interacciones se ha incrementado, debido a su gran potencial en la utilización de los posibles descubrimientos en agricultura y sistemas de producción.

Se denomina rizosfera al suelo que recibe influencia de la raíz y es de hecho un hábitat más favorable para muchos microorganismos que las porciones de suelo desprovistas de raíces, algunos de estos entrando en las propias raíces donde las condiciones para su crecimiento están más cercanas al óptimo.

Por su parte, las plantas también reciben influencia de los microorganismos de la rizosfera, en algunos casos beneficiosa ya sea por solubilización de elementos o protección frente a patógenos entre otros, lo que da un potencial biotecnológico importante a estos microorganismos.

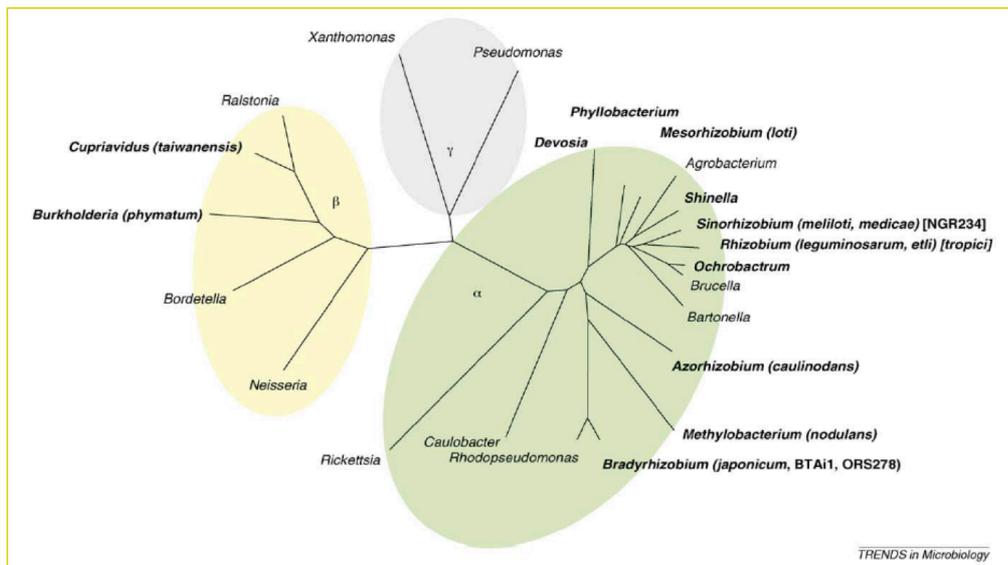


Figura 14. Árbol filogenético a partir de secuencias del gen *rrs* de alfa, beta y gamma proteobacteria. En cursiva se muestran los microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno. (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

Sin embargo, pese a la importancia de los microorganismos rizosféricos, los más importantes y cuya relación es mayor con la planta son los endofitos, es decir, microorganismos que viven en el interior de la planta sin causar enfermedad, ya sea en estructuras ya formadas por la planta como la raíz o en órganos específicos creados para la proliferación de los endofito, como nódulos.

Los nódulos son órganos generados por la planta en cooperación con bacterias de la orden *Rhizobiaceae* en los que se lleva a cabo la fijación biológica de nitrógeno. En su interior se pensaba que sólo podían coexistir bacterias de la misma especie que había infectado la planta, pero recientes estudios han concluido que su interior está poblado por una amplia y heterogénea variedad de bacterias.

### Bacterias intranodulares fijadoras de nitrógeno

El primero de estos grupos de bacterias encontradas en el interior nodular son por supuesto los Rhizobia, bacterias Gram negativas con capacidad de entrar en los pelos radicales de las leguminosas y formar en conjunción con la planta una compleja estructura; el nódulo. Fueron los que primero se descubrieron en su interior y probablemente los que en mayor número se encuentren en estas estructuras.

Dentro del grupo de los Rhizobia también encontramos algunas especies que aunque han sido aisladas del interior de nódulos, son incapaces de reinfectar por sí mismas y formar nódulos en otras plantas, algunos ejemplos son algunas biovariedades de *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium leguminosarum*.

Un hallazgo histórico (Moulin *et al.*, 2001) fue el descubrimiento de que  $\beta$ -proteobacterias podían formar nódulos y fijar nitrógeno en ellos.

Dentro de las beta-proteobacteria, *Burkholderia* es capaz de inducir la formación de nódulos, aunque en algunos casos son nódulos inefectivos. (Diouf *et al.*, 2007) y se ha encontrado *Herbaspirillum* fijadores de nitrógeno en *Phaseolus* en Portugal (Carro *et al.*, 2011).

Otras alfa-proteobacterias también han sido halladas en el interior de nódulos, el género *Phyllobacterium*, que nodula *Lupinus* y *Trifolium*, ha sido encontrado en nódulos de Túnez (Zakhia *et al.*, 2006) China (Lei *et al.*, 2008) (Li *et al.*, 2011) y por nuestro grupo en España descritas en el capítulo 6 (Flores Félix, 2011). También *Caulobacter* ha aparecido en nódulos de *Acacia* en Australia (Hoque *et al.*, 2011).

No podemos olvidar tampoco la presencia en este grupo bacteriano del género *Frankia*, capaz de nodular plantas no leguminosas en simbiosis actinorrícicas.

### Bacterias intranodulares no fijadoras de nitrógeno

Merece la pena destacar entre las alfa-proteobacterias, que el género que primero se encontró y del que más representantes se han hallado en los nódulos es *Agrobacterium*, que se ha aislado consistentemente de nódulos junto con rhizobia noduladores.

Las gamma-proteobacteria fueron las primeras bacterias encontradas en un nódulo que no habían inducido después de *Agrobacterium*, concretamente, cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Entre los Firmicutes, también encontramos géneros que se han encontrado en el interior de los nódulos. El ejemplo más extendido es *Bacillus*, seguido de cerca por *Paenibacillus*. Ambos tienen capacidades como PGPR aún en ausencia de bacterias noduladoras gracias a la producción de metabolitos tales como sideróforos y en algunos casos hormonas. Se han encontrado en una gran cantidad de plantas en diferentes regiones del mundo. Algunos ejemplos son *Bacillus subtilis* en *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris* (Lee *et al.*, 2005), (Bai *et al.*, 2002), diversas especies de *Paenibacillus* en *Glycyrrhiza* o *Lotus* (Li *et al.*, 2011) (Zakhia *et al.*, 2006) y *Brevibacillus* en *Acacia* (Hoque *et al.*, 2011).

También nuevas especies han sido descritas a partir de aislados de nódulos, como *Cohnella phaseoli* (García-Fraile *et al.*, 2008).

Las actinobacterias se han encontrado en el interior nodular desde hace relativamente poco tiempo, pero a partir de su descubrimiento en este entorno, se han descrito nuevas especies y descubierta muchas otras pobladoras de nódulos en los géneros *Curtobacterium* en *Trifolium* y *Ornithopus* (Muresu *et al.*, 2008) (Sturz *et al.*, 1997), *Microbacterium* en *Acacia*, *Glycyrrhiza*, *Medicago* y *Ornithopus* (Muresu *et al.*, 2008); (Hoque *et al.*, 2011); (Li *et al.*, 2011); (Stajković *et al.*, 2009), *Micromonospora*, sobre todo la especie *M. saelicesensis*

en nódulos de *Lupinus*, *Pisum*, *Medicago*, *Arachis*, *Phaseolus* etc. (Trujillo *et al.*, 2007); (Trujillo *et al.*, 2010); (García *et al.*, 2010); (Carro *et al.*, 2012); (Cerdeña Castillo, 2008) *Streptomyces* en *Sphaerophisa* (Deng *et al.*, 2011) y otros. Cabe destacar el caso de *Micromonospora*, que ha sido aislada de más de 20 especies vegetales distintas lo que sugiere una amplia distribución, sin contar con su potencial como PGPR, aunque este está poco estudiado.

## **Actinobacteria**

Phylum y clase (el Phylum sólo contiene una clase del mismo nombre) extremadamente heterogéneo y extenso. Prueba de esta gran variedad es el hecho de que existen seis ordenes, 14 subórdenes y 40 familias dentro de esta clase. Las características generales definitorias de las *Actinobacteria* son las siguientes: se trata de bacterias Gram positivas, de alto contenido en G+C que en su mayoría son inmóviles, pese a que algunas especies producen esporas flageladas.

El hábitat más común donde se pueden encontrar es el suelo donde contribuyen al proceso de descomposición de materia orgánica, pero se han encontrado también en muchos otros entornos, incluso alguna especie es patógena de humanos o animales. Son capaces de metabolizar una gran variedad de sustancias debido a la producción y excreción de diversas enzimas hidrolíticas, entre los compuestos que pueden hidrolizar se encuentran desde azúcares o aminoácidos hasta pectina, compuestos aromáticos y recalcitrantes. Su morfología es variada, desde cocos hasta la forma típica del subgrupo de los actinomicetos, hifas y micelio diferenciado. Es precisamente esta característica la que causó que fueran clasificados en un inicio como hongos, ya que comparten esta misma morfología, probablemente causada por evolución convergente por la necesidad de sobrevivir en hábitats similares como el suelo.

Dado que en los hábitats en los que suelen aparecer las actinobacterias existe una gran competencia, es posible que la enorme variedad en la producción de antibióticos que presenta el phylum (alrededor del 75% de estos compuestos ha sido aislados de cepas de *Streptomyces*) tenga como finalidad eliminarla. Estos antibióticos suelen proceder del metabolismo secundario y no tienen una influencia directa sobre las funciones vitales básicas del microorganismo, lo que lleva a pensar que el mantenimiento de estas rutas debe tener una función beneficiosa como la anteriormente mencionada de mejora de la competencia (Grafe *et al.*, 1988). Además de antibióticos, su desarrollado metabolismo secundario (causante de que su genoma sea varias veces mayor que el de otras bacterias) produce otra gran cantidad y variedad de metabolitos que podrían ser utilizados en la industria farmacéutica, agrícola o alimentaria; de hecho, hoy en día las actinobacterias son la principal fuente de antibióticos, con potencial para

combatir patógenos multirresistentes o mejorar la eficacia de productos contra hongos, virus etc.

La gran mayoría de estas bacterias producen esporas que son resistentes a la luz ultravioleta y también a condiciones de sequía, pero no son especialmente termorresistentes y que suelen estar asociadas al micelio aéreo. La morfología y distribución de estas es de gran importancia para la taxonomía del grupo, junto con la cantidad de azúcares y la composición de la pared celular, que se trata de una estructura de gran complejidad.

### Familia Micromonosporaceae

Posee un micelio de sustrato extensivo y sus hifas suelen tener colores intensos. Casi nunca poseen micelio aéreo y cuando está presente es muy rudimentario.

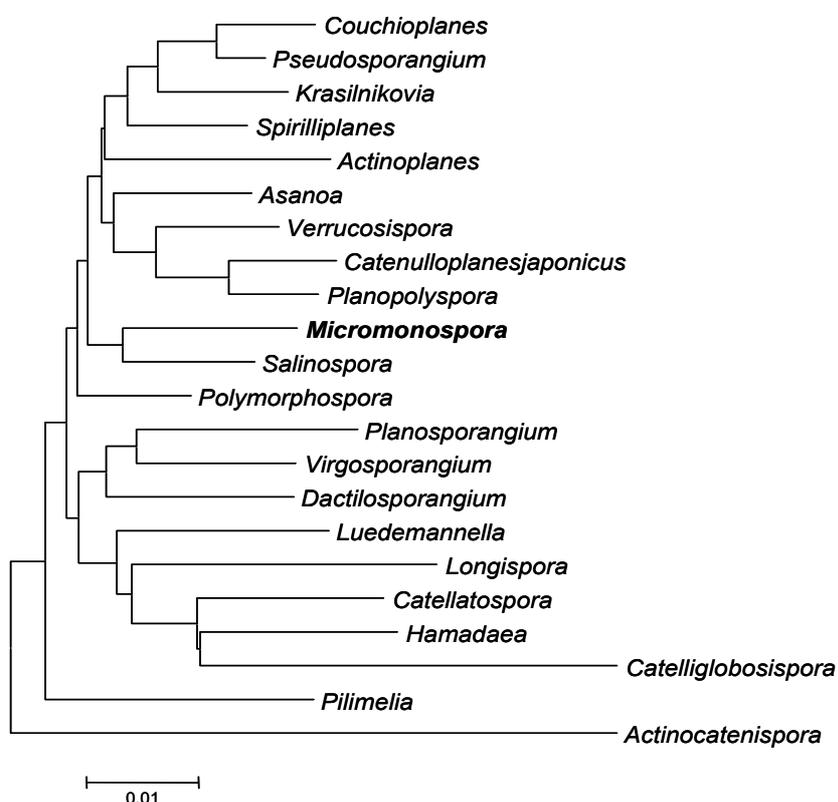


Figura 15. Árbol filogenético basado en el gen ARNr 16S de la familia *Micromonosporaceae* a la que pertenece el género *Micromonospora*. La familia *Micromonosporaceae* pertenece al suborden *Micromonosporineae* del orden *Actinomycetales*. (Trujillo et al., 2011).

Las esporas, que pueden o no ser móviles, se sitúan en hifas especiales llamadas esporangioforos, que se ramifican a partir del micelio vegetativo que crece anclándose al sustrato o en su superficie. La distribución de las esporas es muy variable, desde esporangios con unas pocas a miles de esporas.

Su hábitat es tan variable como la distribución de las esporas, ya sean naturales o modificados por acción humana, desde el suelo de un bosque hasta en ríos y también en agua salada.

### Género *Micromonospora*

El género *Micromonospora* se caracteriza por producir esporas únicas (Figura 17) que suelen encontrarse en agrupaciones de esporóforos ramificados, carecer de micelio aéreo y además de tener un contenido en G+C alrededor del 70%. Son bacterias aerobias, quimioorganotrofas y mesófilas. La temperatura más alta a la que se han conseguido cultivar in vitro ha sido 50°C. Son tolerantes a cantidades relativamente elevadas de cloruro sódico (hasta el 5%) y crecen en pH neutros o alcalinos.

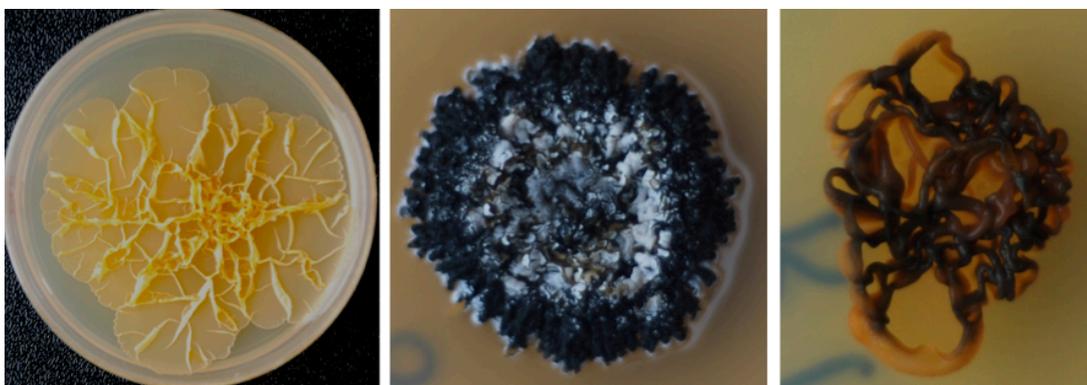


Figura 16. Colonias de *Micromonospora* aisladas en nuestro laboratorio de nódulos de alfalfa (Original).

Las colonias que forman presentan bordes irregulares, en muchas ocasiones se elevan en formas parecidas a cráteres (figura 16), o con rugosidades en su superficie. Presentan una gran variedad de colores, predominando el naranja, aunque también se pueden encontrar colonias marrones, negras, verdes o amarillas y tienden a oscurecerse al envejecer debido a la aparición de esporas. También algunas producen pigmentos difusibles, pese a que la frecuencia de esta característica es bastante baja. El género es conocido por degradar quitina y celulosa, además de producir antibióticos como la gentamicina (Trujillo *et al.*, 2011).

El género fue descrito por Ørskov y contiene 49 especies descritas hasta la fecha.

Su hábitat coincide en diversidad con la familia en la que se encuentra, pero cabe destacar su papel como endofito, que fue encontrado primero en raíces de trigo, y en estudios más recientes, se ha aislado del interior de nódulos de leguminosas, sólo en nuestro laboratorio hemos encontrado *Micromonospora* en nódulos de *Lupinus angustifolius*, *Pisum sativum*, *Arachis hipogaea*, *Ononis* y *Medicago sativa* y *truncatula* entre otros.

El número y especie de las colonias de *Micromonospora* que se encuentran en el interior de los nódulos es muy variable, en algunos nódulos podemos encontrar varias especies distintas de *Micromonospora* mientras en otros no hay ninguna. Esta situación podemos encontrarla incluso en distintos nódulos de la misma planta e incluso, pese a que parece haber una predominancia en los nódulos de cepas de determinadas especies de *Micromonospora*, también existe mucha diversidad de modo que se han descrito muchas especies nuevas a partir de aislados de nódulos y se han encontrado representantes de prácticamente todas las especies descritas, lo que demuestra que los nódulos son un hábitat recurrente de estos microorganismos (Alonso Vega, 2010).

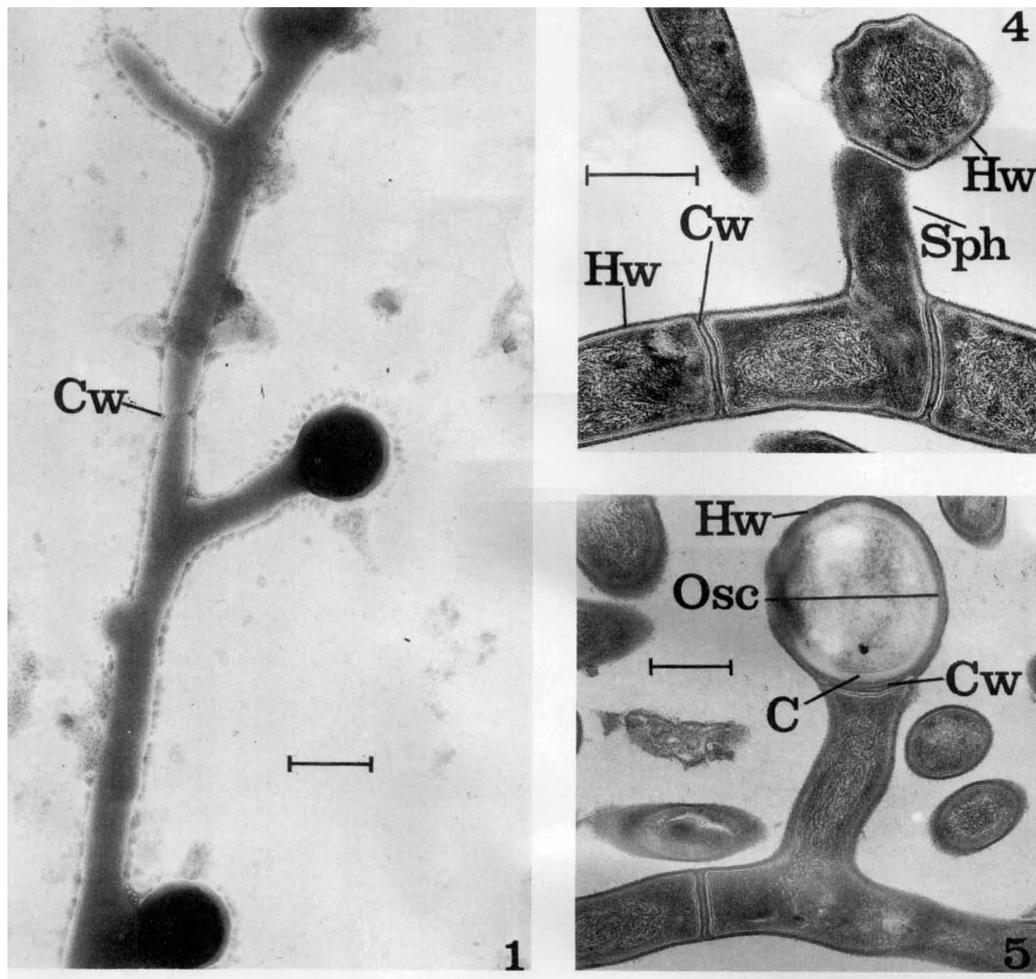


Figura 17. Microscopía electrónica de esporas de *Micromonospora* de (Luedemann & Casmer, 1973). C, cortex; Cw, pared celular o septo; Hw, pared celular de célula de hifa o vegetativa; Osc, cubierta externa de la spora; Sph, esporóforo.

## Micorrizas

Las micorrizas, son asociaciones entre ciertos hongos del suelo y raíces de plantas. Se estima que más del 97% de las plantas terrestres se encuentran formando parte de esta simbiosis (Smith & Read, 2008). Las asociaciones micorrícicas son muy variadas en estructura y función pero las más extendidas en la naturaleza son las micorrizas arbusculares, que se trata de asociaciones de hongos del phylum *Glomeromycota* con plantas superiores (Schüßler *et al.*, 2001).

En el proceso de formación de la micorriza ocurren una serie de interacciones hongo-planta que van a dar como resultado final una integración morfológica y funcional de ambos simbiosis (Tisserant *et al.*, 1996). El hongo arbuscular se encuentra en forma de espora en el suelo y en condiciones favorables ésta germina y forma micelio que se extiende a través del suelo. Una vez que la hifa alcanza la superficie de la raíz de una planta hospedadora susceptible de ser micorrizada se diferencia formando los apresorios, estructura formada tras una ramificación de la hifa y engrosamiento de su pared celular. Después la hifa penetra en la raíz de la planta y se produce un crecimiento intercelular e intracelular de la misma hasta llegar a las zonas del parénquima cortical donde se forman las estructuras más características de la simbiosis, los arbusculos. Los arbusculos son ramificaciones dicotómicas repetidas de las hifas intracelulares donde se produce el transporte de nutrientes (Smith & Read, 2008).

La micorriza es una simbiosis bidireccional con un papel fundamental en la mejora de la nutrición de plantas principalmente a través de un aumento en la captación de fósforo a cambio de recibir carbono de los fotosintetizados de las plantas hospedadoras (George *et al.*, 1995). Sin embargo también se ha descrito que las micorrizas juegan un papel destacado en aspectos no nutritivos de las plantas. Las micorrizas confieren a las plantas resistencia/tolerancia frente a múltiples estreses tanto bióticos como abióticos. La tolerancia que las micorrizas arbusculares confieren a la planta frente a estreses abióticos como sequía o salinidad se debe a la combinación de efectos físicos, nutricionales, fisiológicos y celulares (Ruiz-Lozano, 2003). Por otro lado, se sabe que las micorrizas confieren resistencia y tolerancia a las plantas frente a patógenos, ya que compiten por los sitios de colonización o infección con las poblaciones microbianas de la rizosfera (Parke *et al.*, 1983) y/o porque activan mecanismos de defensa de las plantas (Cordier *et al.*, 1996).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares influyen sobre otros microorganismos del suelo y, a su vez, están influenciados por ellos (Lehr *et al.*, 2008). En condiciones naturales, las estructuras micorrícicas están rodeadas por comunidades bacterianas y fúngicas complejas que interactúan con la simbiosis hongo-planta a niveles físicos metabólicos y funcionales (Finlay, 2008). Hay que destacar la existencia de hongos y bacterias que favorecen la micorrización de las plantas y que se pueden denominar "microorganismos

favorecedores de la micorrización” (Fitter & Garbaye, 1994). Los microorganismos favorecedores de la micorriza arbuscular parecen intervenir, principalmente en la supervivencia y crecimiento pre-simbiótico del hongo micorrízico en el suelo (Sampedro *et al.*, 2003) (Martinez *et al.*, 2004) (Frey-Klett *et al.*, 2007). Un componente importante de la microbiota rizosférica son los actinomicetos. Se ha encontrado acción antagónica de algunas razas de *Streptomyces* sobre los hongos micorrízico arbusculares (Ames, 1989), mientras que otros no tiene acción sobre el desarrollo de la simbiosis arbuscular (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). Más recientemente se ha encontrado que la co-inoculación de algunas especies de *Streptomyces* y hongos arbusculares favorece el crecimiento y nutrición de las plantas y benefician la colonización micorrízica de la raíz (Franco Correa *et al.*, 2010). Los estudios llevados a cabo sobre la interacción entre actinomicetos y hongos arbusculares es muy escasa y centrada casi exclusivamente en el género *Streptomyces*.

## Importancia de PGPRs

En la actualidad son conocidas un gran número de bacterias asociadas a las raíces de diferentes especies vegetales, provenientes de un amplio número de ambientes distintos y cuya función en la planta sea posiblemente afectar a su crecimiento de forma positiva. El nombre que se les ha dado viene del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria, más conocidas ahora por su acrónimo: “PGPR” aunque algunos autores prefieren utilizar el término “PGPB” (Plant Growth Promoting Bacteria). Este cambio de término se debe a que algunas bacterias que son conocidas por tener efectos beneficiosos sobre las plantas en las que habitan, no colonizan o no son eficientes colonizando la raíz. Su efecto en las plantas puede ser directo, facilitando la captación de nutrientes o proporcionándolos ellas mismas a la planta o inhibiendo el crecimiento de organismos fitopatógenos. No obstante, pese a que se han propuesto varios cambios de nombre e incluso diferenciar las PGPB de las PGPR, los argumentos que se esgrimen no parecen haber convencido a la mayoría de investigadores.

Para ser considerada como PGPR, una bacteria debe tener las siguientes características:

- Tener la capacidad de colonizar raíces (ser endofito), o al menos su rizosfera.
- Que esta interacción se prolongue lo suficiente para que haya un efecto sobre la planta.
- Que estimule el crecimiento vegetal.

Las actinobacterias endofíticas pueden afectar a la plantas de las siguientes formas (Hasegawa *et al.*, 2006):

- Mejoran el desarrollo de las plantas de forma directa.

- Mejoran su nutrición, proporcionándole elementos esenciales como nitrógeno, hierro o fósforo.
- Mejora o mantiene la salud de las plantas ya sea por mecanismos directos, por medio de síntesis de antibióticos o sideróforos, o induciendo respuestas defensivas de la planta.
- Mejoran la tolerancia a factores ambientales adversos.

En la figura 18 se resumen los principales mecanismos PGPR descritos en actinobacterias.

### MECANISMOS DE ACCIÓN DE ACTINOBACTERIAS ENDOFITAS COMO PGPR

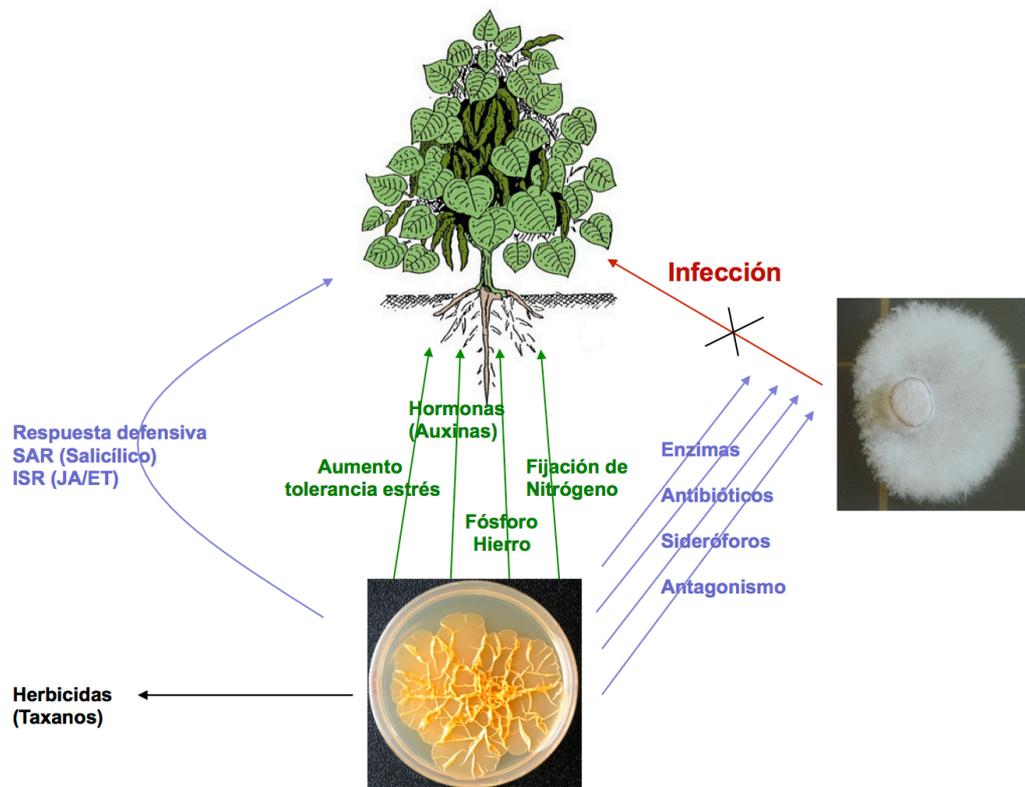


Figura 18. Mecanismos de acción PGPR de *Actinobacteria* (Original).

### Mecanismos para mejorar el desarrollo vegetal

#### Producción de fitohormonas

La mayoría de los procesos vitales de la planta están regulados por hormonas, por lo que cualquier cambio en las concentraciones de estas puede afectar al crecimiento, o al desarrollo de órganos de la planta. Es por eso que la producción de hormonas vegetales por parte de los PGPR es un proceso de suma importancia.

En muchas especies de *Streptomyces* se ha estudiado la producción de ácido indolacético *in vitro*, aunque no se conoce *in planta* (Khamna *et al.*, 2010).

También en *Streptomyces* se ha descrito la capacidad de acelerar la formación de raíces adventicias (Akane *et al.*, 2006).

Las ventajas de este efecto PGPR son claras, si la planta crece más rápido, el tiempo de juvenil, en el que es más proclive a recibir ataques, disminuye y con ello también el riesgo.

### Nutrición vegetal

Algunas PGPRs afectan a la nutrición vegetal proporcionándole, o facilitando el acceso a nutrientes esenciales como fósforo o nitrógeno.

### Nitrógeno

En 1898 se identificó una *Actinobacteria* formadora de nódulos en *Alnus*. Estos nódulos eran formados por *Frankia*, un género capaz de fijar nitrógeno en asociación con plantas no leguminosas. Hasta la fecha, *Frankia* se ha aislado de diversos géneros vegetales, lo que le confiere una gran importancia como PGPR.

Muchas actinobacterias tienen capacidad para fijar nitrógeno en vida libre y algunas de ellas se han aislado del interior de nódulos de distintas leguminosas. (Valdés *et al.*, 2005), (Hasegawa *et al.*, 2006), (Gauthier *et al.*, 1981).

### Fosfato

El segundo nutriente en importancia para las plantas, después del nitrógeno, se trata sin duda del fósforo. Este nutriente es abundante en el suelo, pero su disponibilidad suele ser baja ya que en muchas ocasiones se encuentra unido a otros metales como el hierro o el aluminio que impiden su utilización por la planta.

Las PGPR que son capaces de solubilizar fosfato hacen que este pase a estar disponible para la planta lo que se traduce en un incremento de la cosecha.

Se han descrito algunas *Actinobacteria* capaces de solubilizar fosfatos, aunque esta habilidad está poco estudiada pese a su gran importancia (Sahu *et al.*, 2007).

### Sideróforos

Otro de los elementos esenciales para el correcto crecimiento vegetal es el hierro. Este se encuentra en el suelo, muy frecuentemente con una bajísima disponibilidad, ya que se halla insolubilizado.

Las PGPR pueden producir compuestos denominados sideróforos que secuestran iones de hierro en condiciones de baja disponibilidad de este elemento. El resultado de este mecanismo es que el resto de pobladores de la rizosfera, principalmente hongos, entre ellos hongos patógenos, tengan una disponibilidad de hierro aún menor, ya que en el caso de que ellos también produzcan sideróforos, los fúngicos son menos afines al hierro que los bacterianos.

Sin embargo, pese a que esto pueda parecer desfavorable para la planta, estas son capaces de extraer el hierro del complejo que se forma con el sideróforo, por lo que la planta obtiene beneficios de estas PGPR por dos vías: Los patógenos y competidores por los nutrientes son eliminados o al menos privados de elementos esenciales, y por otra parte, obtiene del PGPR este elemento tan poco disponible, mejorando su nutrición.

### Protección vegetal

Hay una gran cantidad de actinobacterias que protegen a la planta frente a patógenos, por medio de mecanismos directos, como la producción de antibióticos, sideróforos y otros compuestos, o por medio de mecanismos indirectos, induciendo los sistemas defensivos de las plantas (Conn & Franco, 2004).

Se han descrito varias especies de *Actinobacteria* que producen metabolitos secundarios con propiedades herbicidas, inhibidores de la germinación o inhibidores del crecimiento del tubo polínico. Estas especies, por lo general, se encuentran dentro del género *Streptomyces*, *Dactylosporangium* etc. (Zhao *et al.*, 2010).

Este efecto es ventajoso para las plantas ya que eliminaría competencia y plantas parásitas, lo que le daría una ventaja competitiva enorme. Esto hace que los PGPRs que producen estos metabolitos tengan también un elevado potencial biotecnológico.

### Antibiosis

Desde hace unos años se han ido encontrando más y más especies que producían antibióticos, siendo un gran número de ellos pertenecientes a las actinobacterias.

Igarashi (Igarashi *et al.*, 2007) demostró, a partir de un estudio de un gran número de muestras, que entre el 10 y el 20% de las cepas aisladas producen algún tipo de metabolito secundario que tiene actividad contra hongos y bacterias fitopatógenas.

Algunos de estos metabolitos sintetizados por actinobacterias han sido analizados por ser moléculas no descritas y su variedad es enorme, desde antifúngicos (como la coronamicina, proveniente de *Streptomyces* (Ezra *et al.*,

2004)) a bactericidas de amplio espectro (Joseph & Priya, 2011). Además, no sólo son efectivos contra patógenos vegetales, sino que se han descubierto algunos con posible utilidad en medicina, que podría ser utilizados como nuevos medicamentos, sustituyendo a otros más largamente utilizados y con más posibilidades de haberse convertido en ineficaces por las resistencias.

### Enzimas líticas

Estas enzimas pueden ser utilizadas también para el control de patógenos, ya que se han descrito especies de *Streptomyces* con capacidad para producir enzimas quitinolíticos y de  $\beta$ -1,3-glucanasas que destruyen la pared celular de hongos (Gupta *et al.*, 1995) (Quecine *et al.*, 2008), entre los cuales hay conocidos patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, etc.

En la mayoría de los casos, estas enzimas afectan a la pared de hongos, pero nunca a las paredes vegetales, cuya composición es diferente (no poseen quitina) y por tanto sólo afectan al crecimiento de los patógenos, frenándolo.

### Resistencias sistémicas

Las plantas poseen mecanismos propios de defensa cuando se ven atacadas por patógenos. Existen dos tipos diferenciados y que se activan debido a diferentes tipos de ataques, sus nombres son resistencia sistémica inducida (ISR) y resistencia sistémica adquirida (SAR).

La ISR puede ser inducida por PGPRs, esto ha sido demostrado en algunas bacterias endofíticas, como actinobacterias, pero no causan enfermedad y la planta permanece sana pese a esta respuesta. Estas bacterias inducen de alguna forma la expresión de genes de defensa asociados a la ruta del jasmónico, que dan una respuesta mayor cuando se enfrentan a un patógeno real. Esta capacidad, en algunos casos es de "priming" en los que la respuesta sólo ocurre en caso de infección de un patógeno, pero no se activan las defensas cuando únicamente están en contacto con el PGPR, lo cual es una ventaja adicional, ya que la planta no utiliza recursos en respuestas defensivas contra un no patógeno, pero si hay un efecto sinérgico entre el PGPR y la planta cuando aparecen organismos dañinos (Zamioudis & Pieterse, 2012).

Dado que además de antibióticos, un mismo PGPR puede producir también efectos en las rutas defensivas de la planta, se podrían considerar agentes de biocontrol multifuncionales, y por tanto prometedores en cuanto a su utilización en agricultura.

### Mecanismos de mejora de la tolerancia a factores ambientales

Algunos estudios realizados con *Streptomyces* demostraban que su inoculación en plántulas causaba una modificación de la acumulación de callosa en la pared

de sus células, lo cual aumenta la dureza de estas paredes permitiendo posiblemente que las células soportaran una mayor presión osmótica (Hasegawa *et al.*, 2005).

También se observó una mayor lignificación de las células, lo que ayudaría también a soportar condiciones cambiantes de disponibilidad de agua. Así, las plantas que fuesen inoculadas con este tipo de PGPRs permitirían aumentar la resistencia a sequía de las plantas que colonizan.

Esta resistencia, junto a otras, como a altas concentraciones de sal o cualquier otra condición adversa, si son conferidas por una bacteria PGPR, pueden permitir la aclimatación de plantas en lugares donde antes no compensaba cultivarlas por tener un bajo rendimiento, o simplemente no crecían. En cultivo de tejidos, donde es necesario mantener una tasa de humedad muy alta, estas bacterias permitirían una disminución de estos niveles de humedad, lo que también causaría un descenso en la proporción de enfermedades, ya que muchos patógenos se ven favorecidos por unas condiciones altas de humedad.



# Objetivos



## OBJETIVOS

La agricultura derivada de la revolución verde, se caracteriza por la utilización masiva de fertilizantes, pesticidas y herbicidas químicos, que junto con la mejora genética del germoplasma vegetal, han conseguido un notable incremento en la productividad agrícola. La agricultura se ha vuelto totalmente dependiente de estos productos agroquímicos, para mantener el nivel de producción actual.

Desde hace décadas se han levantado voces advirtiendo de los riesgos que entraña para el medio ambiente y para la salud humana este tipo de agricultura. Sin embargo los beneficios innegables, ligados a este tipo de técnicas de producción han ido aplazando la toma de decisiones para abordar el problema.

Estos efectos adversos han ido progresivamente despertando, primero el interés y después la preocupación de los ciudadanos, de las empresas y por último de los políticos que, a través de directivas, en el caso de la Comunidad Europea y leyes nacionales de los distintos países, han abordado en direcciones distintas y con objetivos diferentes, los problemas que derivan de la agricultura actual.

Estas directrices legislativas proponen como alternativa, mejorar el aprovechamiento de los recursos del propio suelo y la utilización de sistemas naturales para la promoción del crecimiento vegetal y el control de enfermedades, evitando en lo posible el uso de agroquímicos y diseñando una agricultura más respetuosa con el medio ambiente y más segura para el consumidor.

Dentro de esta nueva cultura agrícola se propone la utilización de microorganismos que interaccionan con plantas, como biofertilizantes por su potencial para mejorar la nutrición y el crecimiento de las plantas y además como elicitores de las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos. Este tipo de microorganismos denominados PGPR (Plant Growth Promoting Rizobacteria) son una alternativa de un enorme potencial y con una adecuada selección se puede conseguir el efecto deseado.

El objetivo que nos planteamos en la actualidad, es el estudio y utilización de grupos microbianos, para la colonización de las raíces de las plantas por bacterias beneficiosas, lo que causaría un gran impacto económico y medioambiental: Disminución de la cantidad de fertilizantes y pesticidas utilizados y la protección de la planta frente a estrés, tanto biótico como abiótico, son ejemplos del potencial que tiene la correcta utilización de microorganismos seleccionados, en la práctica agrícola.

Las bacterias mejor estudiadas, en cuanto a las interacciones simbióticas con plantas, son las Gram negativas. Dentro de este grupo se encuentran casi todos los microorganismos capaces de fijar nitrógeno. Sin embargo, el impacto que

causan los Gram positivos en las plantas es más importante de lo que se creía en un principio y su estudio merece mucha más atención de la que se le ha prestado hasta ahora.

En estudios previos, se ha demostrado la presencia de *Micromonospora*, de forma constante, en nódulos de plantas sanas, de un amplio número de géneros de leguminosas. Este hecho parece indicar, que su función en estos órganos es importante. Sin embargo *Micromonospora* como endofito ha sido descubierto hace muy poco tiempo y existen muy pocos datos referentes a su función en el interior de los nódulos.

De acuerdo con lo expuesto, en este trabajo, se diseñaron una serie de estudios con el objetivo principal de estudiar la biodiversidad de *Micromonospora* en nódulos de alfalfa y de discernir si aporta beneficios a las plantas que los contienen y cuales son estos. Para cumplir este objetivo principal se abordaron los siguientes objetivos concretos:

- Explorar la biodiversidad de los microorganismos pertenecientes a este grupo en nódulos de *Medicago sativa* y profundizar en el conocimiento de sus características taxonómicas.
- Investigar la variabilidad genética y la capacidad simbiótica de las cepas de *Sinorhizobium* aisladas.
- Determinar el potencial como biofertilizante de *Micromonospora* evaluando su eficacia como PGPR.
- Analizar, mediante microscopía óptica y electrónica, el efecto de la interacción *Micromonospora-Medicago* en la formación, estructura y ultraestructura de los nódulos.
- Estudiar el potencial como agente de biocontrol de *Micromonospora* evaluando su capacidad para producir antibióticos, sideróforos y como inductores de mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos.
- Dilucidar la capacidad de *Micromonospora* para fijar nitrógeno tanto en vida libre como en asociación con la planta.

# Material y métodos



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Medios, soluciones y tampones

#### Medio Avena

Los copos de avena se mezclan con agua al 2% y se mantienen en ebullición durante 20 minutos, el caldo obtenido se filtra con una gasa doble de algodón con ayuda de un embudo. Ajustamos con agua destilada el volumen inicial y se le añade 1ml/L de solución de sales y agar al 1,8%.

Solución de sales:

FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1g/L
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,1g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1g/L

#### Medio Basal (SA1)

Glucosa	10,0 g/L
Extracto de levadura	3,0 g/L
Triptona	5,0 g/L
Almidón	2,0 g/L
Triptosa	2,0 g/L
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g/L
CoCl <sub>2</sub>	trazas
Citrato de hierro	trazas
Agar	18,0 g/L

#### Medio Bennett

Extracto de carne	10,0 g/L
Extracto de levadura	2,0 g/L
Glucosa	10,0 g /L
Almidón	0,1 g/L
Triptosa	2,0 g/L
CaCO <sub>3</sub>	0,1 g/L
CoCl <sub>2</sub>	trazas

#### M9-CAS-Agar

Este medio está modificado del original de (Schwyn & Neilands, 1987). La

modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico, HDTMA (HexaDecilTriMetilAmonio), que estabiliza el complejo Fe-CAS (Cromo Azurol S) y le da un color azul característico (Alexander & Zuberer, 1991) y también contiene un agente quelante del hierro. Este medio se obtiene a partir de cuatro soluciones diferentes, que se esterilizan por separado y son mezcladas por orden en frío (cuando alcancen aproximadamente los 50°C).

#### Solución 1

Se mezclan 10 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM (disueltos en HCl 10mM), con una solución acuosa de 50 ml de CAS ( $1.21 \text{ mg ml}^{-1}$ ), la cual adquiere un tono púrpura.

Se añaden 40 ml de una solución acuosa de HDTMA ( $1.82 \text{ mg ml}^{-1}$ ). La solución resultante tendrá un color azul marino denso.

#### Solución 2

Se prepara una solución con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , NaCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , para después añadir el PIPES (piperazina-N,N'-bis[ácido 2-ethanesulfónico]). Ajustar el pH a 6.8.

PIPES	30.24 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.3 g
NaCl	0.5 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0 g
Agar	15 g
$\text{H}_2\text{O}$	750 ml

#### Solución 3

Sacarosa	2 g
Manitol	2 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	493 mg
$\text{CaCl}_2$	11 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.17 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.4 mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.04 mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.2 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1.0 mg
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	70 ml

#### Solución 4

Se disuelven en 30 ml de agua destilada cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de caseína) en una proporción del 10%.

#### Medio Gamborg (B5) (Gamborg & Eveleigh, 1968)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.134 g/l
$\text{KNO}_3$	2.528 g/l

---

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0.246 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0.15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15 g/l
KI	0.75 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0 mg/l
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2.0 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0.25 mg/l
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l
Na <sub>2</sub> x EDTA	37.3 mg/l
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	27.8 mg/l

Solución nutritiva Hewitt (Hewitt, 1966)

KNO <sub>3</sub>	30,3 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	70,8 g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	18,4 g/l
Fe(II)-EDTA	2,5 g/l
MnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,2 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	2,4 g/l
ZnSO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,9 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	18,9 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,3 g/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	20,8 g/l
pH	7

Medio M (Chabot et al., 1992)

MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,731 g/l
KNO <sub>3</sub>	0,080 g/l
KCl	0,065 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0048 g/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,288 g/l
EDTA-NaFe	0,008 g/l
KI	0,00075 g/l
MnCl <sub>2</sub>	0,006 g/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,00265 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00150 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0.013 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,4·10 <sup>-6</sup> g/l
Glicina	0,003 g/l
Tiamina	0.0001 g/l
Piridoxina	0.0001 g/l
Ácido nicotínico	0.0005 g/l

Mio-inositol	0,05 g/l
Sacarosa	10 g/l
Gel-Gro	4 g/l

Medio libre de Nitrógeno. (Modificado del medio 441 de la DSMZ)

Este medio se obtiene a partir de tres soluciones diferentes, que se esterilizan por separado y son mezcladas por orden en las siguientes proporciones: 1:10:1.

Solución A. (10X. NO es soluble)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	9 g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.10 g/L

Ajustar pH a 7.3. Esterilizar a 115°C 20 minutos.

Solución B (1X. Soluble)

Glucosa	2g/50ml
Extracto de levadura	0,050g/50ml
DL-malato (Se hace neutralizando málico con KOH)	1g/50ml
Maltosa	2g/50ml

Ajustar pH a 7.3. Esterilizar a 115°C 20 minutos.

Yeast Carbon Base a 10x. Siguiendo instrucciones del fabricante.

Esterilizar por filtración.

Medio PDA

Se prepara utilizando agar de patata dextrosado de Scharlau Microbiology siguiendo las especificaciones del fabricante.

Medio TY

Triptona peptona	5g/L
Extracto de levadura	3g/L
$\text{CaCl}_2$	0,5g/L
Agar	15g/L

Medio YMA (Yeast Manitol Agar) (Vincent, 1970)

Manitol	10,0 g/L
Extracto de levadura	3,0 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L
Agar	20,0 g/L

Solución Rigaud & Puppo (Rigaud & Puppo, 1975)

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,068 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,044g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,174 g/l
CaSO <sub>4</sub>	0,120g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,123 g/l
Secuestreno	0,025 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,00011 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00285 g/l
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,00307 g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,00055 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,0002 g/l

Solución Rigaud & Puppo con nitrógeno

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,068 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,044g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,174 g/l
CaSO <sub>4</sub>	0,120g/l
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,123 g/l
Secuestreno	0,025 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,00011 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00285 g/l
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,00307 g/l
ZnSO <sub>4</sub>	0,00055 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,0002 g/l
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	0,04g/l

Tampón TBE

Tris	100 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	83 mM
EDTA	1 mM

### Tampón TAE

Tris-Acetato	40 mM
EDTA	1 mM

### Frente de electroforesis

Sacarosa	40,00% (p/v)
Azul de bromofenol	0,05% (p/v)

### Bromuro de etidio

Se utiliza una solución stock de 10 mg/ml, a partir de la que se añade a cada gel la cantidad necesaria para obtener una concentración final de 0,5 µg/ml.

### Estándar de McFarland (McFarland, 1907)

Tabla 1. Correspondencias del estándar de Mcfarland.

Turbidez estándar	Cloruro bórico dihidratado (1,175%)	Ácido sulfúrico (1%)	Correspondencia aproximada en nº de bacterias
1	0,1 ml	9,9 ml	$3 \times 10^8$
2	0,2 ml	9,8 ml	$6 \times 10^8$
3	0,3 ml	9,7 ml	$9 \times 10^8$
4	0,4 ml	9,6 ml	$1,2 \times 10^9$
5	0,5 ml	9,5 ml	$1,5 \times 10^9$
6	0,6 ml	9,4 ml	$1,8 \times 10^9$
7	0,7 ml	9,3 ml	$2,1 \times 10^9$
8	0,8 ml	9,2 ml	$2,4 \times 10^9$
9	0,9 ml	9,1 ml	$2,7 \times 10^9$
10	1,0 ml	9,0 ml	$3,0 \times 10^9$

### Cacosacarosa

Cacodilato (0,005mM)	1ml
Sacarosa	25mg

### Solución fijadora para microscopía

- 600 mg de paraformaldehído disueltos en 6 ml de agua MilliQ.
- Poner al baño maría 1 minuto.
- Añadir 2 gotas de NaOH y mantener al baño maría hasta disolver.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir por este orden:

---

Cacodilato	3,5ml
Glutaraldehído 25%	3ml
Cacodilato	2ml
-Ajustar pH entre 7,2 a 7,4	
Cacodilato	Enrasar a 15ml

## **Aislamiento y caracterización de *Micromonospora***

### *Aislamiento de microorganismos a partir de nódulos*

Todas las plantas que se seleccionaron para el estudio fueron plantas sanas con buen desarrollo vegetativo. De cada planta sólo se seleccionaron los nódulos que tenían un aspecto joven y rosado, esto último es indicativo de que la presencia de leghemoglobina e indirectamente de que la fijación de nitrógeno se está llevando a cabo.

Estos nódulos se escindieron con un bisturí y se esterilizaron por el método de Vincent (Vincent, 1970) sumergiéndolos en cloruro de mercurio al 2,5% durante 2 minutos para después lavarlos varias veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de cloruro de mercurio. Para sembrarlos en placas petri con YMA, primero se maceró cada nódulo con un asa de vidrio estéril y con esa misma asa se sembró estría en la placa de YMA. Estas placas se incubaron durante dos semanas a 28°C.

Una vez aparecieron colonias en las placas de aislamiento, se seleccionaron aquellas que tenían un aspecto seco, de colores vivos y bordes irregulares, es decir, morfológicamente similares a *Micromonospora*.

En algunas de las placas de aislamiento también se seleccionaron colonias blanquecinas semitransparentes y mucosas, similares a las de *Sinorhizobium*.

Todas las colonias aisladas se resembraron en medio SA1 en el caso de las colonias tipo *Micromonospora* y en YMA en caso de las tipo *Sinorhizobium*.

Después de alrededor de 10 días en el caso de *Micromonospora* y 4 en el caso de *Sinorhizobium*, la biomasa de las placas se tomó y se guardó en criotubos con glicerol al 20%, también estéril. Los criotubos para uso rutinario se almacenaron a -20°C y otras copias se depositaron en ultracongeladores a 80°C bajo cero para su almacenamiento a largo plazo.

### *Pruebas fenotípicas*

Tras comprobar que las cepas aisladas se trataban de cultivos puros, se sembraron en medio SA1 e incubaron a 28°C durante 10 días.

Para la inoculación de todas las placas utilizadas en estos estudios se preparó un inóculo a partir de placas de SA1 con cada una de las cepas a estudiar. Este

inóculo se elaboró tomando colonias de las placas crecidas y suspendiéndolas en agua estéril hasta obtener una opacidad de 5 en la escala McFarland ( $15 \times 10^8$  células) (McFarland, 1907).

De estas suspensiones se tomaron 10  $\mu$ l con una pipeta automática para inocular las distintas pruebas, se incubaron a 28°C a menos que se indique lo contrario y se tomaron medidas de crecimiento a los 7, 14 y 21 días.

### Morfología y crecimiento en diferentes medios

Los medios se inocularon según se ha descrito en el apartado anterior y tras su incubación a 28°C se determinó el crecimiento, presencia y color del micelio de sustrato, presencia y color de micelio aéreo y pigmentos difusibles. Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: Bennet, Avena, YMA y se realizaron medidas a los 7, 14 y 21 días.

### Caracterización fisiológica

#### Fuentes de carbono

Estas pruebas son utilizadas para comprobar la capacidad de cada cepa para utilizar como fuente de carbono una serie de azúcares y aminoácidos. El método utilizado fue el descrito por Williams (Williams *et al.*, 1983).

Para la preparación de este medio es necesario preparar tres soluciones distintas que son mezcladas después de esterilizarlas.

Para la fuente de carbono se empleó una solución que contenía cada una de las fuentes en cantidad suficiente para que la concentración final fuese 1% en los hidratos de carbono y 0,1% en los aminoácidos. Cada una de las soluciones fue tinalizada a 100°C durante 20 minutos una vez cada día durante 3 días consecutivos.

Para la fuente de nitrógeno, también necesaria en el crecimiento bacteriano se utilizó un medio comercial denominado Yeast Nitrogen Base 10X de Difco y se siguieron las instrucciones del fabricante para la preparación y esterilización.

Finalmente, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos una solución con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  a una concentración final de 50 mg por 100 ml. También en esta solución fue añadido el agar a una concentración final de 1,8 %.

Las tres soluciones fueron mezcladas una vez estériles en las proporciones adecuadas para conseguir las concentraciones anteriormente descritas y vertidas en placas petri para su utilización.

Estas placas petri fueron inoculadas con todas las cepas de estudio e incubadas a 28°C. Se realizaron mediciones a los 7, 14 y 21 días de la inoculación.

## pH

Para medir la tolerancia a diferentes pH de las cepas, se utilizó como base el medio SA1 que fue modificado con ácido cítrico e hidróxido potásico hasta que se alcanzó el pH deseado, medido con un pehachímetro. Los pH utilizados fueron los siguientes: 4,5; 5,5; 8 y 9.

Tanto el ácido cítrico como el hidróxido de potasio se utilizaron en solución 2 M.

## Temperatura

Para estudiar la tolerancia a diferentes temperaturas, placas de SA1 fueron inoculadas con las cepas de estudio e incubadas a 4, 12, 20, 37 y 45°C.

## Salinidad

El estudio de la capacidad de crecimiento de las cepas aisladas en concentraciones crecientes de cloruro sódico se realizaron en placas de SA1 al que se le añadieron distintas concentraciones de cloruro sódico: 1, 3, 5 y 7 %.

## Hidrólisis de almidón

Para medir la capacidad de las cepas para hidrolizar almidón (por medio de enzimas amilolíticas) se utilizó medio SA1 con un 10% de almidón en lugar del 1% habitual. A los 14 días de incubación, las placas se revelaron con lugol, que teñía el agar de morado o azul oscuro salvo en los lugares donde no había almidón. Este halo sin teñir es el que diferencia las cepas que hidrolizan el almidón de las que no.

## Hidrólisis de arbutina y esculina

La arbutina es un glucósido que puede ser hidrolizado por la enzima  $\beta$ -glucosidasa mientras que la esculina es un derivado cumarínico.

Para medir la hidrólisis de estos compuestos se utilizó el método descrito por (Williams *et al.*, 1983) en el que se utiliza citrato amónico-férrico 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L y 1 g/L de arbutina o esculina según el caso. La cantidad de agar utilizada es 7,5 g/L. Se reparte el medio en tubos con 2 ml cada uno y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En ambos casos el resultado es positivo cuando hay un oscurecimiento del medio a los 14 días.

## Degradación de caseína

Para comprobar la capacidad degradativa de nuestras cepas respecto a la

caseína, que podemos encontrar en la leche, utilizamos el medio SA1 al que se le añadió un 1% de leche en polvo que fue esterilizada por tindalización a 100°C durante 20 minutos y que se mezcló con el resto del medio una vez este fue autoclavado normalmente.

La degradación de caseína causa la formación de un halo transparente en el medio que puede verse en las cepas con capacidades degradativas.

#### Degradación de gelatina

Para esta prueba se suplementó gelatina al 0,4% al medio SA1. Para revelarlo se utilizó una solución compuesta por 12,50g/100ml de cloruro de mercurio y 16,80ml/100ml de ácido clorhídrico. La prueba se consideró positiva cuando aparecía un halo transparente alrededor del crecimiento del inóculo después del revelado.

#### Degradación de urea

La ureasa es una enzima que rompe la urea en amoníaco y dióxido de carbono. Para determinar la capacidad de degradación de urea en nuestras cepas utilizamos un caldo de urea preparado de Fluka. Este caldo se preparó y esterilizó según las condiciones del fabricante y se repartió en frascos con 2 ml cada uno. Este medio contiene rojo fenol, un indicador de pH que vira de anaranjado a rosa o púrpura en presencia del amoníaco que se desprendería de la reacción producida por la ureasa en caso de un resultado positivo. Por tanto, un color rosa en el medio sería indicativo de que la prueba es positiva. Esta prueba se mide a los 14 días.

#### Hidrólisis de Tween

Esta prueba mide la capacidad de degradación de polisorbatos por medio de lipasas. En este caso concreto se utilizaron Tween 20 (monolaurato de polioxietilen sorbitan) y Tween 80 (monooleato de polioxietilen sorbitan). El medio de cultivo utilizado fue el siguiente:

Bacto peptona: 10 g/L

Cloruro de calcio: 5 g/L

Cloruro de sodio: 0,1 g/L

Agar: 15 g/L

Tween 20 u 80 (Sigma) 10 g/L

El Tween se esteriliza por separado y se mezcla después, pero ambos a 121°C durante 20 minutos.

### Producción de catalasa

Enzima casi ubicua en organismos expuestos al oxígeno ya que es necesaria para metabolizar el peróxido de hidrógeno que se forma en el proceso de respiración celular. Para comprobar si es producida por el microorganismo se deja caer una gota de peróxido de hidrógeno comercial sobre una colonia joven del microorganismo a estudiar. Si se produce un burbujeo, la prueba es positiva.

### Producción de oxidasa

Esta prueba detecta la existencia de la citocromo C oxidasa en las células, parte integrante de la cadena de transporte de electrones en la respiración. Para evaluarla, añadimos una gota de N,N,N',N'-tetrametil-1,4-fenilendiamina diclorhidrato (Sigma) al 1%. Este compuesto virará a azul en presencia de la oxidasa, por tanto, si la colonia se colorea de azul en menos de 20 segundos, la prueba es positiva (si tarda más la prueba no es fiable, ya que es posible que se haya oxidado por causas ambientales).

### Pruebas genotípicas

#### Extracción ADN

La recogida de biomasa se llevó a cabo por medio de palillos estériles a partir de cultivos puros de placas de SA1 y se almacenó en eppendorfs a -20°C.

Para la extracción se utilizó el kit de Sigma "REExtract-N-Amp Plant PCR Kit" tanto para las colonias tipo *Micromonospora* como para las tipo *Rhizobium*.

El protocolo seguido para la extracción fue el siguiente:

- Añadir 80µl de "extraction solution" a un eppendorf que contenga la biomasa del cultivo a extraer y resuspenderla.
- Incubar a 95°C durante 10 minutos.
- Añadir 80 µl de "dilution solution" y mezclar con un vórtex.
- Añadir 100 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (en proporciones 25:24:1) y mezclar con vórtex hasta obtener una solución color lechoso.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos.
- Recoger 100µl de la fase superior (transparente) y poner en un nuevo eppendorf junto con 100 µl de cloroformo-isoamílico (en proporciones 24:1) y mezclar con vórtex de nuevo.
- Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos.
- Recoger la fase superior, que contendrá el ADN bacteriano y poner en un nuevo eppendorf, que se puede conservar a -20°C.

### Perfiles de BOX PCR

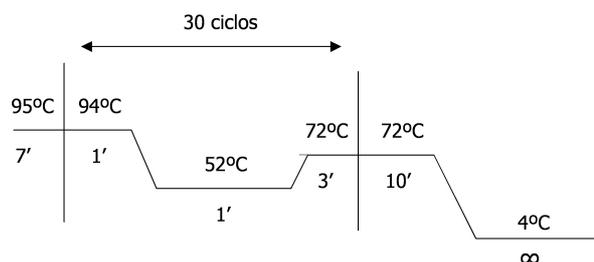
Técnica desarrollada por (Versalovic *et al.*, 1991), se basa en la amplificación del ADN entre las llamadas secuencias BOX gracias a un oligonucleótido específico para estas secuencias.

Las reacciones para amplificar estas secuencias se realizaron con el kit "REExtract-N-Amp Plant PCR Kit" de Sigma, en las siguientes cantidades para cada reacción:

- Reactivo REExtract (premix para PCR) 10  $\mu$ l
- Solución 1:1 extraction-dilution 2  $\mu$ l
- Oligonucleótido BOXA1R (20 $\mu$ M) 2,5  $\mu$ l
- Agua MilliQ estéril 2  $\mu$ l
- ADN molde 2  $\mu$ l

Secuencia del oligonucleótido BOXA1R: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes:



Con los productos de la PCR se realizó una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% en TBE con bromuro de etidio. Se cargaron 5  $\mu$ l de cada una de las reacciones en un pocillo y 1 $\mu$ l del marcador "molecular weight marker XIV (100bp ladder)" (Roche) con 5  $\mu$ l de frente. En el caso de las reacciones no fue necesario añadir frente, dado que el propio kit lo lleva incorporado. La electroforesis se mantuvo durante tres horas a un voltaje de 80V. El resultado de estas carreras se fotografió con el equipo GelDoc de BioRad.

Estas fotos se analizaron con el programa informático Bionumerics de Applied Math, Kortrijk, Belgium. En este programa se genera una matriz de similitud mediante la aplicación del coeficiente de correlación de Pearson y el método para agrupación UPGMA para dar lugar a los dendrogramas de las cepas estudiadas, en las que se visualiza la similitud entre los perfiles electroforéticos de las cepas estudiadas.

### Secuenciación del gen que codifica el gen ribosómico 16S

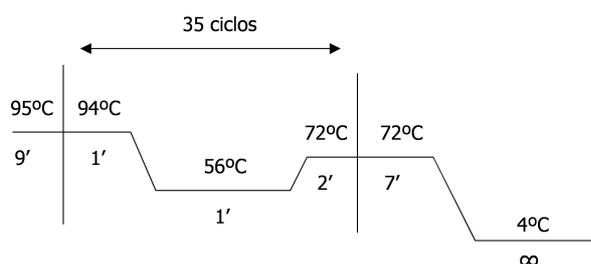
El gen del ARN ribosómico del 16S es una de las herramientas básicas de la taxonomía y su secuenciación se ha convertido en un trabajo rutinario en muchos laboratorios. Con el ADN ya extraído se realiza una PCR con ayuda del kit "REExtract-N-Amp Plant PCR Kit" de Sigma.

- Reactivo REExtract (premix para PCR) 10 µl
- Solución 1:1 extraction-dilution 2 µl
- Oligonucleótido SF1 (20µM) 0,4 µl
- Oligonucleótido 1522R (20µM) 0,4µl
- Agua MilliQ estéril 6,2 µl
- ADN molde 1 µl

Secuencia del oligonucleótido SF1: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

Secuencia del oligonucleótido 1522R: 5'-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3'

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes:



Con los productos de la amplificación por PCR se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio. Se cargaron los 20 µl de cada reacción en los pocillos y se utilizó como marcador el "DNA Molecular Weight Marker VI" (Roche), del que se puso 1µl mezclado con 5 µl de frente. La electroforesis se mantuvo durante 1 hora a 80V.

Cuando las bandas se hubieron separado, se comprueba que su tamaño es el esperado comparandolas con el marcador. Estas se cortaron con ayuda de un bisturí bajo luz ultravioleta, siempre comprobando que las bandas tenían el tamaño adecuado comparándolas con el marcador. Las bandas se almacenaron en eppendorfs que se congelaron a -20°C para su posterior purificación.

La purificación de las bandas para obtener el ADN incluido en ellas se llevó a cabo con el kit comercial "Qiaquick spin columns" de QIAGEN siguiendo el siguiente protocolo:

- Pesar todas las bandas utilizando un eppendorf vacío para tarar.
- Añadir 300µl de tampón QG por cada 100 mg de agarosa pesada.

- Calentar las muestras a 50°C hasta fundir completamente la agarosa en el tampón. Agitar los tubos con frecuencia. Este tampón tiene un indicador de pH, si cambia de color, el pH de la muestra es inadecuado y la purificación por columna es probable que no funcione.
- Transferir todo el volumen del eppendorf una vez disuelta la agarosa a una columna de purificación y centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar el líquido de la columna y añadir 500µl más de tampón QG.
- Centrifugar a 14.000 durante 1 minuto.
- Eliminar el líquido de la columna y añadir 700µl de tampón PE, al que se le debe haber añadido previamente alcohol según las especificaciones del fabricante, y esperar durante 5 minutos.
- Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto.
- Eliminar el líquido de la columna y centrifugar de nuevo con la columna vacía para eliminar restos del tampón durante 1 minuto a 14.000 rpm.
- Pasar la columna de purificación a un tubo eppendorf y añadir 40µl de tampón EB sobre la membrana de la columna.
- Esperar 5 minutos y centrifugar otros 5 a 14.000 rpm.

En el tubo eppendorf quedará recogido el ADN purificado, que puede ser almacenado a -20 °C.

La cuantificación del ADN obtenido en la reacción en cadena de la polimerasa se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El gel se hizo con agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio y en los pocillos se puso 1µl del ADN que queríamos medir mezclado con 5 µl de frente, y para comparación, 1µl del plásmido pGEM a una concentración conocida (100ng/µl) también mezclado con 5µl de frente.

La electroforesis se mantuvo 1 hora a 80V y se fotografió con el equipo GelDoc de BioRad para comparar la intensidad con que se marcaban los pocillos en comparación con el pGEM.

Para secuenciar el gen del 16S son utilizados 4 oligonucleótidos que son cebadores para distintas partes del gen que se mezclan con el ADN y agua para la secuenciación.

Oligonucleótido 1pm/µl	3µl
ADN 100ng/µl	1µl
Agua MilliQ	4µl

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados:

SR2: 5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3'                      Posición 501

SR3: 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	Posición 887
SR4: 5'-GGGTTGCGCTCGTTG-3'	Posición 1100
1522R: 5'-AAGGAGGTGWTCARCC-3'	Posición 1522

En caso de que la muestra de ADN no tuviera la concentración adecuada, se añadirían más microlitros de ADN sustituyéndolos por agua, hasta un máximo de 6.

Estas reacciones se enviaron al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Las secuencias que fueron devueltas por el servicio de secuenciación fueron limpiadas en los extremos con el programa 4Peaks ([www.mekentosj.com](http://www.mekentosj.com)) y se corrigieron los errores de lectura.

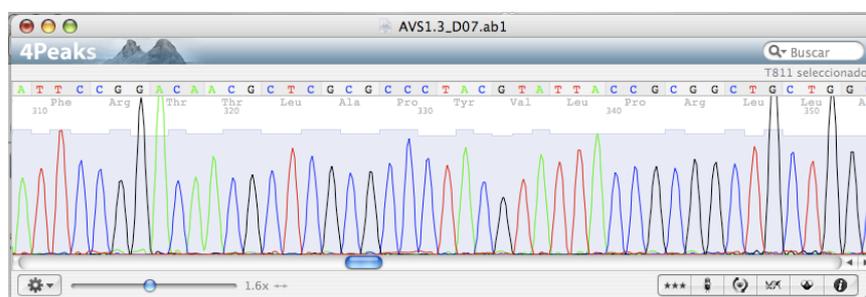


Figura 1: Ejemplo de visualización de un cromatograma con el programa 4Peaks.

Las cuatro secuencias obtenidas de cada muestra de ADN fueron ensambladas utilizando el programa Geneious gracias a las zonas de solapamiento existentes en estos fragmentos, que dieron lugar a contigs de más de 1400 pares de bases, lo que corresponde al gen prácticamente completo ya que aproximadamente tiene 1500 pares de bases.

Cuando todas las secuencias de todas las cepas habían sido ensambladas, estas se alinearon junto con las cepas tipo de las especies ya descritas (tanto en el caso de *Micromonospora* como en *Sinorhizobium*) cuyas secuencias pueden encontrarse en la base de datos NCBI (Zhang *et al.*, 2000) y EZTaxon (Kim *et al.*, 2012). Para la alineación se usó el programa ClustalX (Thompson, 1997).

Por último, para la creación de árboles filogenéticos se utilizó el programa Mega 4 y Mega 5 (Tamura *et al.*, 2007), (Tamura *et al.*, 2011).

### Secuenciación del gen que codifica la subunidad B de las girasas (gyrB)

Para la secuenciación de este gen es necesario realizar dos amplificaciones con diferentes condiciones. El protocolo para esta amplificación junto con el diseño de los oligonucleótidos ha sido desarrollado por Carro (Carro García, 2009) en nuestro laboratorio.

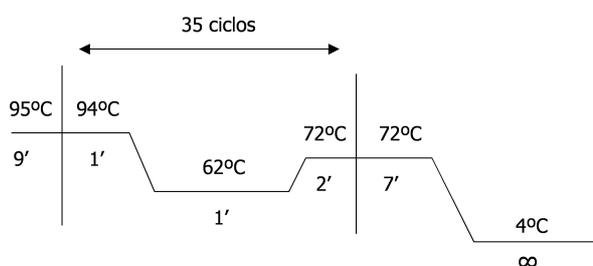
Las PCR se realizaron con ayuda del kit "REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit" de Sigma.

- Reactivo REDEExtract (premix para PCR) 10  $\mu$ l
- Solución 1:1 extraction-dilution 2  $\mu$ l
- Oligonucleótido GYF1 (20 $\mu$ M) 0,4  $\mu$ l
- Oligonucleótido GYF3 (20 $\mu$ M) 0,4 $\mu$ l
- Agua MilliQ estéril 6,2  $\mu$ l
- ADN molde 1  $\mu$ l

Secuencia del oligonucleótido GYF1: 5'-TCCGGYGGYCTGCACGGCGT-3'

Secuencia del oligonucleótido GYF3: 5'-ACSGTCGACTTCGACTTCCA-3'

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes:



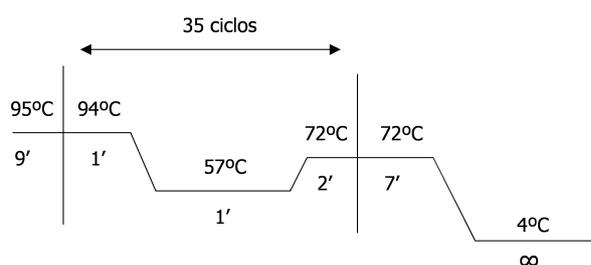
Para la segunda reacción también se utilizó el mismo kit de Sigma mencionado anteriormente.

- Reactivo REDEExtract (premix para PCR) 10  $\mu$ l
- Solución 1:1 extraction-dilution 2  $\mu$ l
- Oligonucleótido GYR1B (20 $\mu$ M) 0,4  $\mu$ l
- Oligonucleótido GYR3B (20 $\mu$ M) 0,4 $\mu$ l
- Agua MilliQ estéril 6,2  $\mu$ l
- ADN molde 1  $\mu$ l

Secuencia del oligonucleótido GYR1B: 5'-CGGAAGCCCTCYTCGTGSGT-3'

Secuencia del oligonucleótido GYR3B: 5'-CAGCACSAYCTTGTGGTA-3'

Las condiciones para la PCR fueron las siguientes:



Para la secuenciación de los fragmentos obtenidos se realizó el mismo protocolo que en el caso de la secuenciación del gen del 16S. Los oligonucleótidos para la secuenciación fueron los siguientes:

GYF1: 5'-TCCGGYGGYCTGCACGGCGT-3'	Posición 19
GYF3: 5'-ACSGTCGACTTCGACTTCCA-3'	Posición 220
GYR1B: 5'-CGGAAGCCCTCYTCGTGSGT-3'	Posición 548
GYR3B: 5'-CAGCAC SAYCTTGTGGTA-3'	Posición 1210
GYF4: 5'-ACCCACGAGGAGGGCTCCG-3'	Posición 548

### Caracterización de *Sinorhizobium*

#### Secuenciación del gen que codifica el gen ribosómico 16S

El procedimiento de extracción, amplificación y purificación del ADN se realizó con el mismo procedimiento que en el caso de *Micromonospora*, la única diferencia en el procedimiento es en el uso de los oligonucleótidos para secuenciación, que en este caso fueron los siguientes (Rivas *et al.*, 2001):

X1: 5'-GGCTCAGRAYGAACGCTG-3'	Posición 32
X3: 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCA-3'	Posición 339
Z4: 5'-CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	Posición 359
X5: 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGT-3'	Posición 512
X7: 5'-CAAAGGAATGACGGGGGC-3'	Posición 781
X11: 5'-GAGGAAGGTGGGGATGCCGT-3'	Posición 1175

#### Identificación por MALDI-TOF

Esta técnica mide las proteínas totales de las células estudiadas así que es necesario que la medida se haga siempre a partir de células de la misma edad y en el mismo medio de cultivo. Para nuestro estudio, todas las cepas fueron

cultivadas a 28°C durante 24 horas en TY.

En microorganismos que no producen mucho exopolisacárido es posible hacer el proceso colocando sobre la placa del MALDI las células sin procesar directamente, pero para *Sinorhizobium* es necesario efectuar un proceso de extracción previo.

#### Extracción para MALDI-TOF

- Tomar con una punta de micropipeta un poco de biomasa de la placa de Ty y ponerlas en un eppendorf.
- Añadir 300µl de agua MilliQ.
- Resuspender totalmente las células por medio de un vórtex.
- Añadir 900µl de etanol al 100%.
- Mezclar con vórtex.
- Centrifugar durante 2 minutos a 16.000g.
- Eliminar el sobrenadante con ayuda de una bomba de vacío.
- Dar un spin a 16.000 g.
- Eliminar el sobrenadante con ayuda de la bomba de vacío.
- Dejar el eppendorf abierto 5 minutos para que seque.
- Añadir 25µl de ácido fórmico al 70% (de Sigma).
- Resuspender el pellet en el vórtex.
- Añadir 25µl de acetonitrilo (ACN).
- Agitar en vórtex 5 segundos.
- Centrifugar 2 minutos a 16000 g.
- Inmediatamente, recoger 25µl y pasarlos a un eppendorf de 0,5 ml. Este es el extracto final que será utilizado en el MALDI.

Para llenar los pocillos de la placa del MALDI, se pone en cada círculo marcado en la placa 1,2 µl de extracto, haciendo 3 repeticiones en cada muestra.

Sobre cada muestra hay que añadir 1,2 µl de matriz.

#### *Composición de la matriz*

TcA	25 µl/ml
Acetonitrilo	500µl/ml
Agua MilliQ	475µl/ml

## Técnicas de microscopía

### Procesamiento de nódulos, inclusión en LR White

El procesamiento y la observación de las muestras por microscopía ha sido llevado a cabo en Instituto de Ciencias Agrarias y Medioambientales del CSIC de Madrid.

Los estudios de microscopía de nódulos se realizaron inmediatamente después de ser separados de la planta. Los nódulos se cortaron en piezas de 1-2mm y se recogieron en tampón cacosacarosa pH 7,4. Posteriormente se fijaron en formaldehído 4% más glutaraldehído 5% en tampón cacosacarosa pH 7,4 (Fedorova *et al.*, 2005). Las muestras se desgasifican en sesiones de 1 minuto, tantas como fueron requeridas para que las muestras quedaran en el fondo del tubo con fijador. Se mantuvieron a 4°C durante 2 horas, cambiando la solución fijadora y dejándolas 1h más a 4°C. A continuación se procede según el siguiente protocolo:

- 3 lavados con tampón cacosacarosa pH 7,4 durante 30 minutos a 4°C.
- Se inicia la postfijación cambiando el tampón cacosacarosa pH 7,4 por tetróxido de osmio al 1% en cacosacarosa y se mantiene toda la noche a 4°C.
- El osmio se elimina con 2 lavados con cacosacarosa durante 5 minutos a 4°C.
- Para llevar a cabo la deshidratación se añade etanol en serie creciente de 30 y 70%, durante 10 minutos a 4°C. Para aumentar el contraste se hace un cambio con uranilo al 1% en etanol al 70% durante toda la noche a 4°C. Esta solución se sustituye por:
  - Etanol al 90% durante 10 minutos a 4°C.
  - Etanol al 96% 30 minutos a 4°C.
  - 2 veces Etanol 100% 1 hora a 4°C.
  - Solución 1:3 de LRW:Etanol 100% durante 3 horas a 4°C en agitación.
  - Solución 1:1 de LRW:Etanol 100% durante la noche a 4°C.
  - Solución 3:1 LRW:Etanol 100% durante 3 horas a 4°C en agitación.
  - Solución de LRW pura durante 24 horas a 4°C en agitación.

La imbibición de las muestras en LRW puro se realiza en cápsulas de gelatina y posterior polimerización a 60°C durante 24 horas, según de Lorenzo *et al.* (Lorenzo *et al.*, 1998). Las muestras, que forman un bloque con la resina, se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas.

### Microscopía óptica

Las muestras, previamente incluidas en resinas LR White se cortaron con el ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica) provisto con cuchillas de diamante Diatome 45°. Las observaciones de estos cortes semifinos (1 µm), de nódulos se realizaron en un microscopio óptico Zeiss Axiophot con sistema fotográfico integrado. Las secciones o cortes se montan con unas gotas de agua bidestilada sobre portaobjetos de vidrio tratados previamente con adhesivo de Haupt (Jensen, 1963). Posteriormente las secciones fueron teñidos con azul de toluidina al 1%, conteniendo borato sódico (1:1) durante 5-10 min y con fucsina 0,1% durante 3 min.

### Microscopía electrónica de transmisión

Para los estudios de microscopía electrónica de transmisión se emplearon igualmente muestras incluidas en LR White. Se realizaron secciones ultrafinas de ~70 nm en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S (Leica), se recogieron sobre rejillas de níquel de 150-200 ventanas cubiertas con una película de pioloformo (3‰ de pioloformo en cloroformo). Las rejillas con los cortes se dejaron secar totalmente sobre papel de filtro y se tiñeron con acetato de uranilo 2% en agua bidestilada durante 10 min. Una vez secas se volvieron a teñir con citrato de plomo 0,4% durante 5 minutos en un ambiente sin gases (Reynolds, 1963) y se lavaron nuevamente con agua bidestilada. Fueron observadas en un microscopio electrónico Stem Leo910 con una cámara digital integrada Gatan Bioscan (modelo 792).

### Microscopía electrónica de barrido convencional y a baja temperatura

Para la observación convencional, los bloques de LR white tallados se pegan en un soporte de aluminio con pegamento instantaneo y se añade una capa de grafito coloidal en isopropanol. Una vez seca la superficie tallada de los bloques, se metalizaron con carbón en un evaporador con alto vacío, con objeto de aumentar la conductancia a los electrones.

El procesamiento de los nódulos para criofractura por congelación se hizo según de María et al., 2005. Los nódulos se adhirieron con pegamento Gurr (Compuesto O.C.T.; BDH) a un portaobjetos de aluminio para microscopía de barrido. Inmediatamente se introdujeron en una cámara de nitrógeno líquido Slush a -196 °C. Las muestras fueron fracturadas por un eje de acero a -196 °C. A continuación se deshidrataron al vacío a -90 °C y se sombrearon con oro para mejorar la conductancia a los electrones. Finalmente, el portamuestras se transfirió a la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido Digital Scanning Microscope DSM 960 de Zeiss utilizándose los detectores de electrones secundarios y retrodispersados (B.S.E., Back Scattered Electrons) para la observación directa de las muestras.

## **Estudio de la capacidad PGPR de las cepas de *Micromonospora* aisladas**

### *Inoculación en plantas de *Medicago sativa**

#### Ensayos en maceta

Las semillas de alfalfa utilizadas son comerciales de la variedad Aragón, marca Batlle (Barcelona). Antes de su germinación, las semillas fueron esterilizadas en superficie durante 30 segundos en etanol al 70% y después 3 minutos en cloruro de mercurio al 2,5%. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril repetidas veces para eliminar los restos de los agentes esterilizantes.

Estas semillas esterilizadas en superficie se pregerminaron en placas petri con dos papeles de filtro estériles húmedos entre los que se colocaron las semillas bien espaciadas y se guardaron en oscuridad a temperatura ambiente. Después de 48 horas fueron trasplantadas a los recipientes que se utilizarían para el experimento en el invernadero o cámara iluminada.

Cuando apareció la primera hoja verdadera se realizaron las inoculaciones pertinentes para el estudio.

Los inoculos de estos experimentos se prepararon siguiendo las pautas descritas en las pruebas fenotípicas. Las plantas se inocularon con 1 ml de esa suspensión de bacterias que fue depositado cerca de la raíz.

Para *Sinorhizobium* SM1021 se utilizó el mismo método pero en medio de cultivo YMA y permitiendo su crecimiento sólo durante 3 días.

#### Ensayos en tubo

El proceso de esterilización y pregerminación de semillas fue el mismo, así como el cultivo e inoculación de las bacterias.

La preparación de los tubos se llevó a cabo en gradillas en las cuales se alternaron tubos de 20 x 200 con huecos sin ellos, para permitir que la luz llegara en igual medida a todos los tubos.

Estos se rellenaron con 15 ml de solución de enraizamiento Rigaud-Puppo tras lo cual se puso en el interior del tubo una tira de papel de filtro de 15 cm de largo, para estar en contacto con la solución de enraizamiento y se tapó con un tapón de algodón hidrófobo recubierto de gasa, que permite el intercambio de gases pero mantiene la esterilidad.

Todo este sistema se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

En los tubos ya estériles y con ayuda de un asa de siembra se colocaron las semillas germinadas en el interior del tubo de forma que la raíz tocara el papel

de filtro impregnado con medio Rigaud-Puppo, a media altura en el tubo. Todo este proceso se lleva a cabo en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar.

Los tubos se llevaron a una cámara climatizada con fotoperiodo de 16/8 con una temperatura entre 20 y 25°C, donde permanecieron 48 horas antes de ser inoculados con las bacterias objeto de estudio para después volver a ser llevados a la cámara iluminada.

### Inoculantes en turba

En los casos en los que se decidió utilizar la turba como soporte para la inoculación de microorganismos directamente en semillas, se siguieron las siguientes pautas:

#### Preparación de turba

Se tomaron bolsas de 500g de turba estéril de la casa NodulAid que fueron inyectadas en condiciones axénicas con 50 ml de cultivo líquido del microorganismo a utilizar. En el caso de *Sinorhizobium* se permitió el crecimiento en medio líquido durante 3 días y en el caso de *Micromonospora* durante 10 días.

La turba mezclada con el cultivo bacteriano se incubó durante 10 días a 28°C y se conservó en una cámara fría a -4°C después de que transcurriera ese tiempo.

#### Inoculación

Las semillas se esterilizaron en superficie del mismo modo que en experimentos anteriores y fueron secadas con papel de filtro estéril. Para la inoculación se mezclaron con distintas cantidades de turba de cada microorganismo, dependiendo del tratamiento a usar y se utilizó sacarosa al 10% en agua para adherir la turba a la superficie de la semilla. Después de este recubrimiento, se colocaron las semillas en las macetas de tal forma que hubiese cinco plantas en cada maceta en un inicio y realizar una limpieza de las dos plantas en peor estado tras la aparición de la segunda hoja verdadera.

### **Estudios de micorrización**

#### Hongos arbusculares

Se emplearon las especies de hongos micorrízico arbusculares *Glomus mosseae* (Nicol. and Gerd.) Gerdemann and Trappe, (BEG 12) y *Glomus irregulare* (DAOM 197198).

El inóculo de *Glomus mosseae* esta formado por suelo, esporas (25-35 esporas/g), micelio y fragmentos de raíces colonizadas con el endófito (60-70% de longitud de raíz colonizada). La inoculación de las plantas se realizó añadiendo 8 g de inóculo-suelo por maceta y mezclándolo homogéneamente con el sustrato. En los ensayos en los que no se deseaba la micorrización se añadió un filtrado de suelo para restituir el componente biológico libre de propágulos formadores de micorrizas arbusculares.

Para la obtención de inóculo de *Glomus irregulare*, el hongo se cultivó en un sistema monoxénico con raíces transformadas de zanahoria en el medio de cultivo M cuya composición del medio se muestra en el apartado Medios. La inoculación de las plantas se realizó agregando un cm<sup>2</sup> del medio de cultivo monoxénico de *G. irregulare*, con una media de 50 esporas, a la raíz de cada plántula al trasplantarla a la maceta. A los controles no inoculados con el hongo se les agregó un cm<sup>2</sup> de medio de cultivo M con raíces de zanahoria transformadas, pero sin el hongo micorrízico.

### Cultivos en macetas

Se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) esterilizadas como se detalla en el apartado anterior, y germinadas a 27 °C en oscuridad. Las semillas germinadas se transfirieron a semilleros con vermiculita y se cultivaron en un invernadero bajo condiciones ambientales controladas (70-80% de humedad relativa, temperaturas día/noche de 25/15 °C, un fotoperiodo de 16 h durante aproximadamente 15 días. Tras este periodo, las plántulas de alfalfa seleccionadas en base a la homogeneidad de tamaño, se trasplantaron a macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla suelo:arena en una proporción 2:3 (v/v). El suelo utilizado como soporte para el cultivo procedió de la finca El Peinado, Granada.

El suelo, antes de ser utilizado se tamizó dos veces; en el primer tamizado se utilizó una criba de 1 cm de luz de malla para eliminar las partes más gruesas, y en el segundo una de 4 mm, obteniendo un suelo en condiciones óptimas para el cultivo de las plantas. Posteriormente, el suelo se esterilizó por autoclave a vapor fluente mediante 3 ciclos de una hora con intervalo de 24 h. Las plantas recibieron un aporte semanal de 10 ml de solución nutritiva Hewitt sin fósforo durante todo el experimento.

Después de 8 semanas de crecimiento, las plantas se cosecharon y se determinó el peso seco de la parte aérea y el porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

### Cuantificación de la micorrización de la raíz

La extensión del sistema radical que presentaba colonización por hongos arbusculares se tiñó mediante el método desarrollado por (Phillips & Hayman,

1970). Para ello, tras la digestión parcial de las paredes y cubiertas celulares de la raíz con una solución de KOH al 10% durante 30 min a 90°C, y neutralización con HCl 0,1N durante 3 min en frío, las raíces se tiñeron con una solución de azul tripán al 0,05% en ácido láctico durante 10 min a 90°C. El azul tripán es un colorante con afinidad por la quitina (componente mayoritario de la pared fúngica), por lo que tras la tinción, las estructuras del hongo micorrícico se observan claramente en el interior de la raíz. Las raíces teñidas se conservaron en ácido láctico para su posterior evaluación.

La cuantificación de la colonización micorrícica se realizó usando la técnica descrita por (Giovannetti & Mosse, 1980). Para ello, fragmentos de las raíces teñidas se extienden al azar sobre una placa dividida en cuadrículas. Mediante el examen microscópico, se determina el número de intersecciones de los trozos de raíces con las líneas de las cuadrículas contando tanto las intersecciones micorrizadas como las que no presentan micorrización. El porcentaje de intersecciones con raíces micorrizadas, con respecto al total de intersecciones contabilizadas, da una estimación del porcentaje de longitud de raíz que está colonizada.

## **Protección frente a patógenos vegetales por *Micromonospora***

### Ensayos in vitro

Para cultivar los hongos patógenos que se utilizarían en el estudio de antibiosis se utilizó medio PDA y para las cepas de *Micromonospora* medio SA1.

En placas de SA1 se inoculó una estría gruesa que dividía la placa en dos partes iguales. Una semana después a cada lado y equidistantes con la estría central, se depositaron dos discos de agar con micelio provenientes de la placa de PDA ya crecida, de dos hongos diferentes.

Las placas se incubaron a 30°C y se observaron los resultados cada 48 horas.

Para las bacterias patógenas el procedimiento de inoculación de *Micromonospora* fue idéntico, pero las bacterias se inocularon con asas de siembra en estrías perpendiculares a la de *Micromonospora*, cerca de ella, pero sin llegar a tocarla.

Las placas se incubaron a 25°C una semana más después de la inoculación de los patógenos.

### Inoculación en plantas de *Solanum lycopersicum*.

Se utilizaron semillas de tomate comerciales de las variedades Roma y semillas seleccionadas en la estación experimental del Zaidín de la variedad Money Maker.

Para su esterilización en superficie se sumergieron en lejía comercial durante 4 minutos, después de lo cual se lavaron repetidamente en agua destilada estéril para eliminar los restos de lejía.

Para su germinación, se colocaron en una almáciga con vermiculita estéril que se mantuvo en el invernadero, manteniendo su humedad, hasta que apareció la primera hoja verdadera, momento en el que se trasplantó a macetas con turba, y se inocularon del mismo modo que el explicado para *Medicago sativa* en macetas.

Para uno de los tipos de ensayo de protección, se usaron plantas enteras crecidas en invernadero durante dos semanas. También se realizaron ensayos con hojas escindidas de plantas crecidas en el invernadero durante 4 semanas.

Las hojas se mantuvieron separadas por tratamientos, en cámaras húmedas con el peciolo sumergido en agua para su tratamiento con el patógeno.

#### Inoculación de *Botrytis cinerea* por discos de agar con micelio (plugs)

Plantas de tomate cultivadas en invernadero durante 2 semanas fueron inoculadas con *Micromonospora* del mismo modo anteriormente explicado 24 horas antes de la infección con *Botrytis*.

Al día siguiente, las plantas se sacaron del invernadero y se depositó en el centro de sus folíolos un disco de agar con micelio de *Botrytis* cortado de una placa de PDA incubada con *Botrytis* durante 48 horas. Sólo se infectaron hojas que no estaban senescentes ni eran muy jóvenes.

Las plantas se introdujeron después en cajas de plástico transparente con agua que se cerraron para mantener la humedad dentro de ellas entre un 80 y un 100%, se metieron en fitotrones con un fotoperiodo 16/8 a 25°C.

A las 48 horas, se midieron los halos necróticos de los folíolos en los que se había inoculado *Botrytis* con un pie de rey.

Para las hojas escindidas se siguió un protocolo similar de inoculación al expuesto para la planta entera de tomate.

#### Inoculación de *Botrytis cinerea* por spray

- Sembrar esporas del hongo a partir de suspensiones conservadas en glicerol o por medio de una porción de agar con micelio de una placa petri ya crecida. El medio utilizado es PDA suplementado con hojas de tomate en 20g/L.

- Incubar el hongo a 23°C durante 2 a 3 semanas con fotoperiodo de 10/14 horas. La esporulación es mayor con luz.

- Recolectar las esporas de la placa lavándola con agua estéril con Tween 20 al 0,02% y arrastrando las esporas con un asa.

- Agitar en vórtex el tubo donde se encuentran las esporas, el micelio y el agua. De este modo se separa el micelio de las esporas.
- Filtrar la solución resultante con una jeringa rellena de algodón estéril. Tirar el micelio y el agar.
- Centrifugar el filtrado durante 10 minutos a 4000 rpm.
- Lavar el pellet con 20ml de agua estéril.
- Centrifugar de nuevo 10 minutos a 4000 rpm.
- Repetir el lavado y centrifugación.
- Resuspender el pellet en 1 ml de medio de Gamborg con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M y sacarosa 1M.
- Incubar las esporas durante 2 horas en oscuridad.
- Cuantificar el número de esporas con una cámara Thoma y ajustar a  $10^6/\text{ml}$ .
- Utilizar un pulverizador para inocular una capa uniforme en las hojas.
- Mantener las hojas húmedas y con luz 24 horas para el desarrollo del hongo.
- Tomar muestras a las 72 horas de la inoculación.

#### *Extracción ARN de hojas.*

- Moler muestras en mortero.
- 1 eppendorf de 2ml llenado con una cucharadita colmada del material.
- Añadir 1 ml de buffer de extracción TRI (Bioline).
- Esperar 5 minutos.
- Centrifugar 10 minutos a 13.000g a 4°C.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, descartar el anterior.
- Añadir al tubo nuevo 200µl de cloroformo y agitar suavemente.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar 15 minutos a 13.000g a 4°C.
- Pasar sobrenadante a eppendorf nuevo.
- Añadir 500µl de isopropanol.
- Agitar y dejar en hielo durante 10 minutos, agitarlo en vórtex de vez en cuando.
- Centrifugar 10 minutos 13.000g a 4°C.
- Quitar sobrenadante con pipeta y dejar el pellet.
- Añadir 1ml de etanol al 75%, invertir el tubo.

- Centrifugar 5 minutos a 7500g a 4°C.
- Descartar sobrenadante.
- Dejar abiertos 5 minutos los tubos pero sin llegar a secarlos si hay polisacárido.
- Añadir 50µl de agua milliQ calentada a 65°C.
- Incubar 10 minutos a 65°C.
- Centrifugar 10 minutos 13.000g 4°C.
- Poner sobrenadante acuoso en nuevo eppendorf.
- Utilizar el Nanodrop para ver calidad de ARN.
- Electroforesis en gel de agarosa para comprobar integridad del ARN: TBE con agarosa al 1,5 con GelRed. Se cargan 10 µl: tampón de carga naranja QG (6x) y 500 ng de ARN. Para llegar a 10µl se enrasa con agua MilliQ.
- Este ARN se puede almacenar a -80°C.

#### Limpieza del ARN

- Utilizamos la RQ1 RNase-Free Dnase de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Inmediatamente después de la eliminación del ADN existente, continuamos la limpieza con el kit RNA Clean and Concentrator 5, de Zymo Research, también siguiendo las instrucciones del fabricante sin modificaciones.

#### Obtención de cDNA

Para hacer una retrotranscripción del ARN obtenido para obtener cADN, teniendo en cuenta que los genes que necesitábamos detectar tienen un bajo nivel de expresión, se ajustó la cantidad de ARN necesaria a 5 µg. En los casos en los que era necesario concentrar el ARN se utilizó un SpeedVac. La PCR se realiza tras seguir los siguientes pasos:

- En tubos de 0,2 ml se pone el ARN necesario para obtener 5 ng, agua MilliQ hasta llegar a 11 µl y 1 µl de OligoDT 20µM (Invitrogen). Este oligonucleótido se une a la cola de poliadeninas que se puede encontrar en la mayoría de ARN mensajeros de las células eucariotas.
- Esta mezcla se calienta a 70°C durante 5 minutos.
- Se mezclan el resto de reactivos para la PCR, todos pertenecientes al kit de retrotranscripción de Bioline:

dNTPs	1µl
Buffer	4µl
Retrotranscriptasa	1µl
Agua MilliQ	2µl

- De esta mezcla de reactivos se añaden 8µl al contenido de los tubos de PCR.

Secuencia del oligonucleótido OligoDT: 5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT -3'

### Preparación de qPCR

El ADN copia obtenido en la PCR se utilizó para su cuantificación en una qPCR se realizó con la siguiente mezcla para la reacción:

- SYBR Green premix	10,5 µl
- Oligonucleótido forward (20µM)	0,45 µl
- Oligonucleótido reverse (20µM)	0,45µl
- Agua MilliQ estéril	8,6 µl
- ADN molde	1 µl

Esta mezcla se pone en los pocillos de una placa de 96, haciendo al menos dos repeticiones técnicas de cada muestra y 3 réplicas de cada tratamiento para obtener datos fiables. Los oligonucleótidos utilizados en nuestro caso fueron los siguientes (López-Ráez *et al.*, 2010):

Secuencia de los oligonucleótidos LOXA:	5'-GGTTACCTCCCAAATCGTCC-3'
	5'-TGTTTGTAAGTGCCTGTG -3'
Secuencia de los oligonucleótidos PR1:	5'-ATGTGTGTGTTGGGGTTGGT-3'
	5'-ACTTTGGCACATCCAAGACG-3'
Secuencia de los oligonucleótidos PinII:	5'-GAAAATCGTTAATTTATCCCAC-3'
	5'-ACATACAACTTTCCATCTTTA-3'

Se utilizó además un oligonucleótido correspondiente a un gen constitutivo para normalizar el resto de los datos. En este caso fue el factor de elongación de tomate.

Secuencia de los oligonucleótidos SIEF:	5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTGC-3'
	5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'

Los datos obtenidos se exportaron desde el programa iQ5 del propio termociclador a Excel, desde donde se normalizaron restando el Ct del gen constitutivo y se compararon entre sí.

## **Fijación de nitrógeno en *Micromonospora***

### Estudios in vitro

Para comprobar la capacidad de crecimiento de *Micromonospora* en medio sin nitrógeno, se utilizó el medio libre de nitrógeno anteriormente especificado en tubos de ensayo o matraces según las características del experimento y en todos los casos se inoculó con una suspensión bacteriana en agua estéril con una turbidez de 5 en la escala de McFarland.

Ensayo en picadura: Al medio libre de nitrógeno se le añadió agar noble al 1%. Se inocularon en picadura a partir de la suspensión de bacterias ya mencionada. Se observó el crecimiento microbiano a lo largo de un periodo de 4 semanas. Estos tubos se utilizaron para realizar ensayos de reducción de acetileno. Se taparon con septos de silicona, se reemplazó un 10% de la atmósfera interior por acetileno y se realizaron medidas de la presencia de etileno a los 30 y a los 60 minutos.

Ensayos en medio líquido: Se realizaron en matraces de 250ml con 50ml de medio de cultivo. Se inocularon con 1ml de la suspensión de bacterias descrita previamente y se mantuvieron en agitación a 28°C durante 3 semanas, transcurrido este tiempo se hizo un subcultivo en medio fresco sin nitrógeno utilizando como inóculo 1ml del matraz precedente y se volvió a repetir el proceso transcurridas otras 3 semanas.

### Estudios in planta

Para comprobar si la fijación de nitrógeno se realizaba únicamente en el interior de la planta, tal y como ocurre con *Sinorhizobium*, se realizó un experimento inoculando plantas de alfalfa.

Reducción de acetileno: En estos ensayos se utilizan las raíces de las plantas con los distintos tratamientos microbianos, eliminando la parte aérea. Se introducen en un frasco con cierre hermético y tapón con septo de silicona. Con una jeringa se reemplaza la décima parte de la atmósfera interna del frasco por acetileno y se mantiene cerrado hasta la finalización del experimento. Los muestreos se realizan a los 30 y 60 minutos extrayendo una alícuota con una jeringa a través del septo.

Incorporación de nitrógeno 15: La esterilización, pregerminación y transferencia a tubos de las plantas se realizó del mismo modo que en experimentos anteriores y las plantas se mantuvieron en cámara iluminada durante 15 días antes de cambiar el medio de enraizamiento de Rigaud y Puppo normal a Rigaud y Puppo sin nitrógeno. Dos días más tarde se realizó la inoculación con *Micromonospora*, *Sinorhizobium meliloti* y un mutante de *Sinorhizobium meliloti*

incapaz de fijar nitrógeno ( $nifA^-$ ) también de la misma forma explicada anteriormente. Pasados 7 días los tubos se taparon con tapones de goma y con una jeringa se sustituyó 1/10 de la atmósfera del tubo por  $^{15}N$ . Se mantiene durante 48 horas transcurridas las cuales se vuelve a sustituir el tapón de goma por uno de algodón estéril para permitir el intercambio de gases con el exterior.

Pasados siete días se administró por medio de una jeringa un pulso de nitrógeno  $^{15}N$ , que se dejó actuar dos días, tras lo cual se destaparon los tubos y se permitió aireación.

Tras 48 horas se repitió este proceso una segunda vez y por último las plantas se sacaron de los tubos y se secaron durante 48 horas a  $65^{\circ}C$ . Estas muestras se analizaron en el IACT.

### Análisis de isótopos estables

Los análisis isotópicos se han realizado siguiendo los procedimientos rutinarios del Laboratorio de Biogeoquímica de Isótopos Estables del Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra IACT (IACT-UGR). Este tipo de análisis se fundamenta en la medida de las razones isotópicas de un elemento en un determinado compuesto. Los diferentes isótopos de dicho elemento son separados en base a sus diferentes masas mediante un campo magnético en un espectrómetro de masas. Debido a que tanto las abundancias como los valores absolutos de los isótopos de un elemento no pueden ser determinados con la suficiente exactitud para los propósitos biogeoquímicos, no se utilizan los valores absolutos sino las diferencias relativas en las razones isotópicas, para esto las medidas se realizan siempre frente a una muestra patrón de composición perfectamente conocida. La unidad empleada en la medida es el  $\delta$  (‰), expresado como:

$$\delta = (R_m - R_s / R_s) * 1000$$

donde  $R_m$  y  $R_s$  son las razones isotópicas para la muestra y el patrón de referencia, respectivamente. Por tanto, los resultados isotópicos siempre se expresan referidos a un patrón de referencia internacional aceptado por la comunidad científica. Para el caso del nitrógeno se usa la razón isotópica del nitrógeno atmosférico, a la que por convenio se le dio un valor de cero por mil en unidades delta "‰". Así por ejemplo, si la muestra contiene más  $^{15}N$  que el aire atmosférico tendrá valores positivos y si el contenido es menor serán negativos vs AIR. En las tablas también se ha indicado el porcentaje de átomos de  $^{15}N$ .

Análisis de los valores  $\delta^{15}N$  en materia orgánica: las muestras de planta se congelaron con nitrógeno líquido y se han homogeneizado mediante mortero de ágata. Posteriormente aproximadamente 1 mg de muestra se introdujo en cápsulas de estaño, para posteriormente ser analizadas mediante sistemas de

flujo continuo, un cromatógrafo de gases conectado al espectrómetro de masas (Boutton *et al.*, 1983), (Fry *et al.*, 1993), (Seewald *et al.*, 1994). En este caso, la combustión de la muestra se produce a 1020°C (con aporte de oxígeno externo) obteniéndose una mezcla de óxidos de carbono y nitrógeno, ambos se reducen posteriormente a 650°C, obteniéndose una mezcla de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Posteriormente, el agua se elimina por vía química (trampa de Cromosorb), y el CO<sub>2</sub> y el N<sub>2</sub> se separan mediante una columna cromatográfica, de forma que al penetrar en el espectrómetro de masas no interfieran entre sí. El proceso completo de combustión, reducción, eliminación de agua y separación cromatográfica se realiza en un Analizador Elemental (Carlo Erba Modelo NA1500 NC serie 2). El N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> obtenidos mediante los diferentes procedimientos se introducen en un espectrómetro de masas (Delta Plus XL) para su análisis isotópico. El error de los análisis es menor de 0,1 ‰ para las determinaciones de  $\delta^{15}\text{N}$ .

## EQUIPAMIENTO

Agitador: *MaxQ6000* (Thermo Scientific)

Analizador Elemental: *NA1500 NC serie 2* (Carlo Erba)

Autoclaves: *Presoclave 75* y *Autester-G* (P-selecta)

Baño de agua: *MultiTemp III* (Pharmacia Biotech)

Centrífuga de Eppendorf: *Centrifuge 5418* (Eppendorf)

Cubetas de electroforesis: *Mini-Sub Cell GT*, *Wide Mini-Sub Cell GT* (Biorad)

Espectrofotómetro: *CO8000 Cell Density Meter* (Bioware)

Espectrómetro de masas: *Delta Plus XL*

Estufa: *Memmert 800*

Fuente eléctrica de electroforesis: *Power Pac 300* (Biorad)

Lupa Estereoscópica: *SM7800* (Nikon)

MALDI-TOF-MS: *Autoflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer* (Bruker Daltonics)

Microscopio electrónico: *Digital Scanning Microscope DSM 960* (Zeiss)

Microscopio electrónico: *Stem LEO 910* (Zeiss)

Pehachímetro: *microPH 2000* (Crison)

Termobloque: *Tembloc* (Selecta)

Termociclador: *GeneAmp PCR System 900* (Applied Biosystems)

Termociclador de real-time qPCR: *iCycler iQ5* (Bio-Rad)

SpeedVac: *Speed Vac SPD101B* (Savant)

Ultramicrotomo: *Reichert Ultracut S* (Leica)

## Cepas tipo de *Micromonospora*

Tabla 2. Cepas tipo de *Micromonospora* utilizadas

Nombre	Cepa tipo	Número de acceso	Autores
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM43813	X92604	Sveshnikova et al. 1969, species.
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM44815	AB159779	corrig. Thawai et al. 2004, sp. nov.
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM43168	X92599	Luedemann and Brodsky 1965, species.
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM43026	X92594	(Foulerton 1905) Ørskov 1923, species.
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM44151	X92628	Tomita et al. 1992, sp. nov.
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	2-19(6)	AB241454	Ara and Kudo 2007, sp. nov.
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM43903	X92617	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM43143	X92598	Jensen 1932, species.
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM44875	AJ784008	Trujillo et al. 2006, sp. nov.
<i>Micromonospora coxensis</i>	2-30-b(28)	AB241455	Ara and Kudo 2007, sp. nov.
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM44814	AB107231	Thawai et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM43904	X92618	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM43913	X92625	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM43816	X92607	Luedemann and Brodsky 1964, species.
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM44398	AJ560635	Hirsch et al. 2004, sp. nov.
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM43906	X92620	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM43171	X92601	Weinstein et al. 1968, species.
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM43819	X92610	Kawamoto et al. 1974, species.
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM46123	X92629	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM44874	AJ783996	Trujillo et al. 2007, sp. nov.
<i>Micromonospora marina</i>	JSM1-1	AB196712	Tanasupawat et al. 2010, sp. nov.
<i>Micromonospora matsmotoense</i>	IMSNU220013	AF152109	(Asano et al. 1989) Lee et al. 2000
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM44830	AJ626950	Trujillo et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	BTG4-1	AB19355	Thawai et al. 2008, sp. nov.
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM43818	X92609	(Weinstein et al. 1968) Kasai et al. 2000
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM43868	X92613	Kawamoto et al. 1983, sp. nov.
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM43817	X92608	(Luedemann and Brodsky 1964) Kasai et al. 2000
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	JCM12394	AB275607	Thawai et al. 2008, sp. nov.
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM43363	X92603	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora pisi</i>	GUI15	AM944494	Garcia et al. 2010, sp. nov.
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM43821	X92611	(Waksman and Curtis 1916) Luedemann 1971,
<i>Micromonospora rhizosphaerae</i>	DSM45431	FJ261956	Wang et al. 2011, sp. nov.
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	DSM44983	AY561829	Huang et al. 2008, sp. nov.
<i>Micromonospora rosaria</i>	ATCC29337	X92631	(ex Wagman et al. 1972) Horan and Brodsky 1986
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM44871	AJ783993	Trujillo et al. 2007, sp. nov.
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM43912	X92624	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4	AB193565	Thawai et al. 2006, sp. nov.
<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	DSM45142	X92623	Kirby and Meyers 2010, sp. nov.
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM43909	X92623	Kroppenstedt et al. 2005, sp. nov.
<i>Catellatospora citrea</i>	DSM44900	AB200231	Asano and Kawamoto 1986, sp. nov.

(Sveshnikova et al., 1923), (Thawai et al., 2004), (Luedemann & Brodsky, 1965), (Luedemann, 1971a), (Tomita et al., 1992), (Ara, 2006), (Kroppenstedt et al., 2005) (Trujillo et al., 2006), (Thawai et al., 2005b), (Hirsch et al., 2004), (Asano et al., 1989), (Trujillo et al., 2005a), (Thawai et al., 2007), (Kawamoto et al., 1983), (Luedemann & Brodsky, 1964), (Thawai et al., 2008), (Garcia et al., 2010), (Luedemann, 1971b), (Wang et al., 2011), (Huang et al., 2008), (Horan & Brodsky, 1986), (Thawai et al., 2005a), (Kirby & Meyers, 2010), (Asano & Kawamoto, 1986).

# Capítulo 1:

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
DE CEPAS DE *MICROMONOSPORA*  
DE NÓDULOS DE ALFALFA  
(*MEDICAGO SATIVA*)



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE *MICROMONOSPORA* DE NÓDULOS DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA*)

### Introducción

Representantes del género *Micromonospora* se encuentran con frecuencia, en hábitats acuáticos como lodos y aguas fluviales, sedimentos marinos y arenas costeras. Sin embargo, microorganismos pertenecientes a este género también han sido aislados de muestras terrestres (Hayakawa *et al.*, 1991), charcas cercanas a minas de uranio (Trujillo *et al.*, 2005a) y recientemente, han comenzado a describirse como endofitos de diversas especies vegetales.

Nuestro grupo de investigación ha comprobado que en el proceso de aislamiento de los *Rhizobia* característicos del interior de nódulos de leguminosas (*Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* etc.) también aparecían colonias que presentaban una morfología típica de las bacterias pertenecientes al género *Micromonospora*. Este suceso se daba con una alta frecuencia, de forma que, cuando se inició este proyecto de tesis doctoral, ya se disponía en nuestro laboratorio, de una colección de casi 800 cepas de estas características, obtenidas de nódulos fijadores de nitrógeno de distintas leguminosas y de diferentes localizaciones geográficas (Cerdeja Castillo, 2008), (Carro García, 2009), (Alonso Vega, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de diferentes leguminosas en nuestro laboratorio.

Leguminosa	Aislados	País	Año
<i>Lupinus angustifolius</i>	250	España	2003-07
<i>Lens culinaris</i>	40	España	2004
<i>Mucuna sp</i>	15	Ecuador	2004
<i>Cicer arietinum</i>	30	España	2004
<i>Glycine max</i>	35	Nicaragua	2006
<i>Arachys sp</i>	25	Nicaragua	2006
<i>Lupinus gredensis</i>	70	España	2006-07
<i>Pisum sativum</i>	250	España	2005-07
<i>Vicia sp</i>	43	España	2005-06
<i>Ornithopus sp</i>	23	España	2005-06
<b>Total</b>	<b>781</b>	<b>Todos</b>	<b>2003-07</b>

El nombre de este género, *Micromonospora* (*Mikros*, pequeño, *mono*, una, *spora*, espora) fue propuesto por Ørskov en 1923. En medios de cultivo sólidos,

las colonias son amarillas o anaranjadas inicialmente y adquieren tonalidades más oscuras con la producción de esporas de color marrón, verde oscuro o negro.

Son bacterias aerobias, quimioorganótrofas y mesófilas, con crecimiento óptimo entre 20 y 40°C. No crece en concentraciones de NaCl superiores al 5% (p/v), y su rango de pH se sitúa entre 5.0 a 9.5.

La caracterización de estas cepas se ha realizado mediante diferentes técnicas moleculares como TP-RAPD, ARDRA, BOX-PCR o la secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S (gen *rrs*). La utilización de las secuencias del gen *rrs* en la construcción de árboles filogenéticos, permitió confirmar que casi todos los aislados pertenecían al género *Micromonospora*. La topología del árbol filogenético mostró claramente una separación de varios de los nuevos aislados, con respecto a las 49 especies de *Micromonospora* actualmente descritas y algunos de ellos representaban nuevas especies que ya han sido descritas (García *et al.*, 2010; Trujillo *et al.*, 2007).

Conocemos que estos microorganismos cumplen una función importante en los ciclos biogeoquímicos (mineralización de la materia orgánica) y también su gran interés como fuente de compuestos bioactivos naturales, con aplicación en la industria farmacéutica, agrícola y alimentaria, lo que hace que su estudio cobre un interés adicional (Igarashi *et al.*, 2007).

Este alto porcentaje de aislados, procedentes de nódulos fijadores de nitrógeno de diferentes leguminosas, con morfología tipo *Micromonospora*, nos indica que son microorganismos habituales en este nicho. Se ha demostrado por nuestro grupo, que el estudio de nichos no explorados como es este caso, nos conduce al descubrimiento de nuevas especies de interés (Trujillo *et al.*, 2006; 2007). Así mismo, dilucidar el papel que desempeñan en su interacción con las leguminosas, abre un nuevo campo de estudio de importancia tanto teórica como biotecnológica.

En consecuencia, el primer objetivo de este trabajo ha sido explorar la biodiversidad de los microorganismos pertenecientes a este grupo en nódulos de *Medicago sativa* y profundizar en el conocimiento de las características taxonómicas de estos aislados para establecer sus similitudes y diferencias en función de las zonas de aislamiento.

## Aislamiento y conservación

### Muestreo

La alfalfa (*Medicago sativa*), fue la especie vegetal elegida para los aislamientos de los endofitos nodulares realizados en este estudio. Se recolectaron plantas de aspecto sano, con la raíz lo más intacta posible, en diferentes localizaciones de la provincia de Salamanca en Castilla y León y de Australia Occidental (Figura 1). El muestreo se realizó al azar en plantaciones de alfalfa o campos que habían sido cultivados con esta especie en campañas anteriores y aun existían rebrotes.

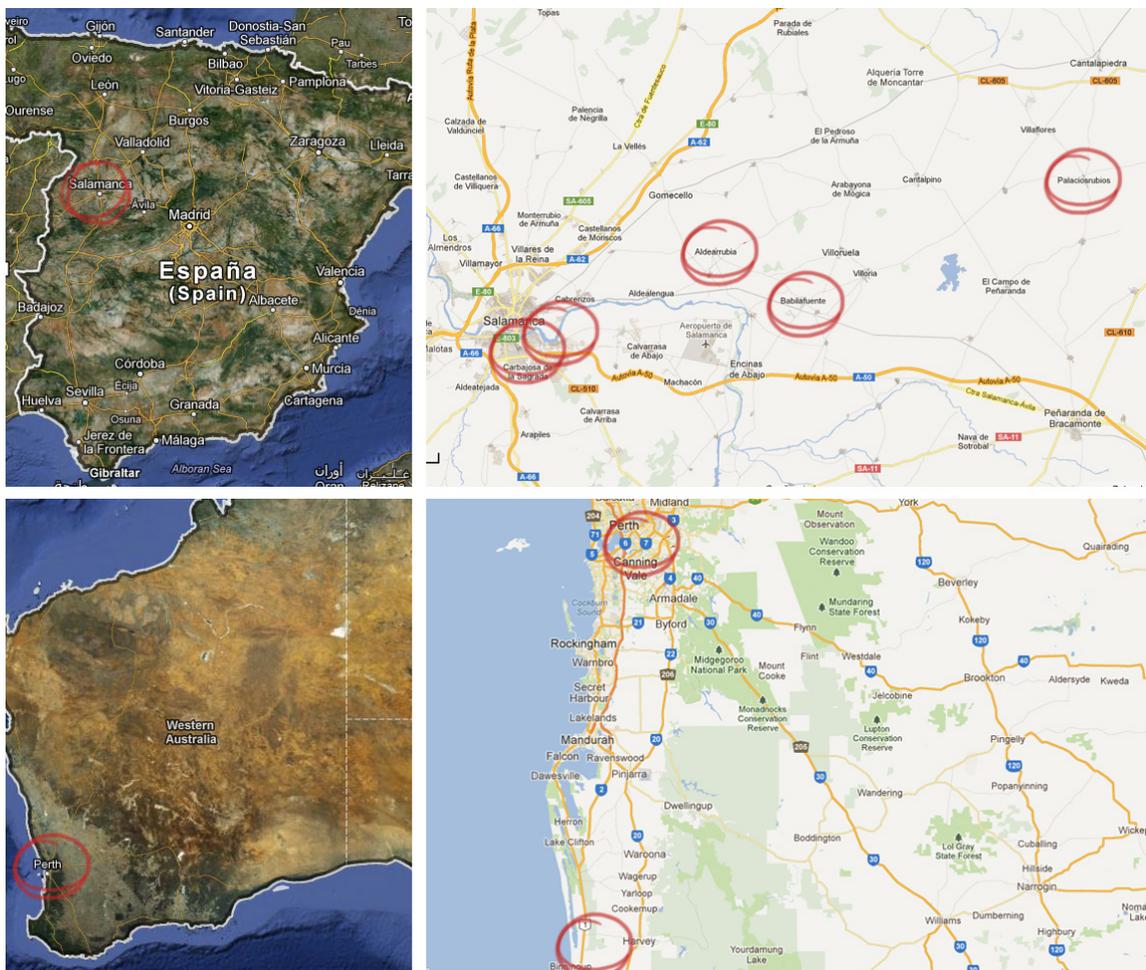


Figura 1. Mapas de España y Australia en los que se señalan las localidades en las que se realizaron los muestreos. En España: Salamanca (río Tormes), Salamanca (San José), Babilafuente, Palacios Rubios y Aldearrubia. Todas están situadas en la Provincia de Salamanca. En Western Australia (Australia): En Binningup, Shire of Harvey y en el Campus de la Murdoch University en Murdoch (región de Perth).

### Aislamiento

De las raíces de cada una de las plantas seleccionadas, se obtuvieron varios nódulos, se esterilizaron en superficie (material y métodos) y se trituraron con una varilla de vidrio estéril, para sembrar el contenido de su interior en placas Petri con medio YMA (material y métodos). La superficie de los nódulos se esterilizó, con cloruro de mercurio, durante 2 minutos. Como control de esterilidad, en estas placas Petri, se pusieron nódulos esterilizados pero enteros, sin aplastar. La ausencia de crecimiento microbiano alrededor de estos nódulos, nos permite comprobar que la esterilización ha sido completa y que los microorganismos aislados proceden del interior del nódulo y no de su superficie.

Las placas sembradas se incubaron a 28 °C (material y métodos), al cabo de cinco días aparecieron colonias translúcidas blanquecinas y mucosas, morfología característica de las colonias de los Rhizobia. Estas colonias fueron aisladas en placas con medio YMA para su posterior estudio. Tras una semana y media de incubación, en las placas aparecieron también colonias de una morfología muy diferente; secas, de colores fuertes, irregulares y altas (Figura 2). Esta morfología es característica del grupo de *Micromonospora* y géneros afines. Se seleccionaron todas las colonias de este tipo que crecieron en las placas y se reaislaron en placas con medio SA1 que permite un crecimiento más rápido para este grupo de bacterias.

### Conservación

Para su conservación, todas las cepas aisladas en este estudio, se almacenaron en ultracongeladores a 80°C bajo cero, en criotubos usando glicerol al 20% como agente crioprotector. Este método es muy eficaz para la conservación por largos periodos de tiempo de estos grupos microbianos. Además de esta técnica de conservación a largo plazo, varios de estos criotubos de cada cepa, se mantuvieron a 20°C bajo cero para uso cotidiano en el laboratorio, ya que, aunque la viabilidad de las cepas es menor, pueden sobrevivir durante más de un año en estas condiciones de almacenamiento y es el más adecuado para el manejo rutinario de estos microorganismos puesto que el subcultivo seriado no es posible con este grupo microbiano.

### Cepas microbianas aisladas

En total, se aislaron, en cultivo puro 89 cepas de *Micromonospora* (68 aisladas en España y 21 en Australia). También se aislaron 20 cepas de *Sinorhizobium* que son descritas en el capítulo 2. Las cepas aisladas en cultivo puro y su origen geográfico se detallan en la tabla 2:

Tabla 2.- Cepas aisladas para este estudio y procedencia de las mismas.

Aislados España		Cepas Origen		Cepas Origen		Aislados Australia (Western Australia)	
Cepas	Origen	ALF 1		ALF pr2		Cepas	Origen
AL 1	Aldearrubia (Salamanca)	ALF2	Río Tormes (Salamanca)	ALF pr2c	Palaciosrubios (Salamanca)	Atrum 1	Murdoch
AL 2		ALF 3		ALF pr4		Atrum 11	University
AL 3		ALF 4		ALF pr4c		Atrum 12	(campus)
AL 4		ALF 5		ALF pr6		AMSO 01	Binningup (Harvey, WA)
AL 6		ALF 6		ALF pr7		AMSO 03	
AL 7		ALF 7		ALF pr14		AMSO 05	
AL 8		ALF 8		ALF pr14c		AMSO 06	
AL 11		ALF 9		ALF pr15		AMSO 07	
AL 12		ALF 10		ALF pr18a		AMSO 08	
AL 13		ALF 11		ALF pr18b		AMSO 09	
AL 14		ALF b1		ALF pr18c		AMSO 10	
AL 16		ALF b2	ALF pr19a	AMSO 11			
AL 17		ALF b3	ALF pr20	AMSO 12			
AL 18		ALF b4	ALF pr22	AMSO 13			
AL 19		ALF b5	ALF pr23a	AMSO 14			
AL 20		ALF b6	ALF pr29c	AMSO 15			
AL 21		ALF b7	ALF pr36	AMSO 16			
AL 23		ALF b10	ALF pr36c	AMSO 17			
AL 25		ALF b11	ALF r3	AMSO 18			
AL 27		ALF b12	ALF r4	AMSO 19			
AL 28		ALF b13	ALF r5	AMSO 20			
AL 29		ALF b14	ALF r6				

## Estudios taxonómicos

Tras la obtención de cultivos puros de cada una de las cepas aisladas y su almacenamiento a -80 °C, se inició la caracterización tanto genotípica como morfológica, bioquímica y fisiológica de las mismas.

Para el estudio genotípico, se utilizó en primer lugar la técnica de BOX PCR (de Bruijn, 2011), con la cual es posible identificar clones gracias al patrón de bandas característico que presenta cada cepa. Esta técnica se utilizó con todas las cepas aisladas en Salamanca y a partir de los datos obtenidos, procesados con el programa BioNumerics se agruparon y seleccionaron cepas representantes de cada grupo para los estudios posteriores (Figura 3). Para el análisis filogenético de cepas del género *Micromonospora* hemos seleccionado el gen que codifica para el ARN ribosómico del 16S, que es el más utilizado, pero además de la secuenciación de dicho gen, se realizó otro análisis filogenético a partir de los resultados de la secuencia del gen *gyrB*, cuyos resultados se compararon con los del gen ARNr 16S. Además de estos estudios genéticos se realizó una aproximación fenotípica a la taxonomía de las cepas aisladas en la que se estudiaron las capacidades de cada una de las cepas para utilización de fuentes de carbono, degradación de compuestos y crecimiento en condiciones

ambientales de distintos pH, temperaturas y condiciones de salinidad.

### **Caracterización genotípica**

#### Caracterización por BOX-PCR

Desde un punto de vista conceptual el BOX-PCR se engloba entre las técnicas de caracterización molecular que denominamos genéricamente rep-PCR. Esta técnica permite la amplificación selectiva de determinadas secuencias del genoma del microorganismo, gracias a la utilización del oligonucleótido BOX-A1R (material y métodos). La utilización de este cebador permite la amplificación de las regiones del genoma situadas entre las secuencias BOX. La amplificación de estas secuencias y posterior electroforesis en gel de agarosa da lugar a un patrón de bandas característico (Figura 2) que permite diferenciar microorganismos a nivel de cepa. Esta técnica ha sido utilizada en numerosas ocasiones para la diferenciación de bacterias y es un método eficaz para discernir cepas clónicas y observar la diversidad de grupos de aislados. También permite agruparlos en función de su similitud.

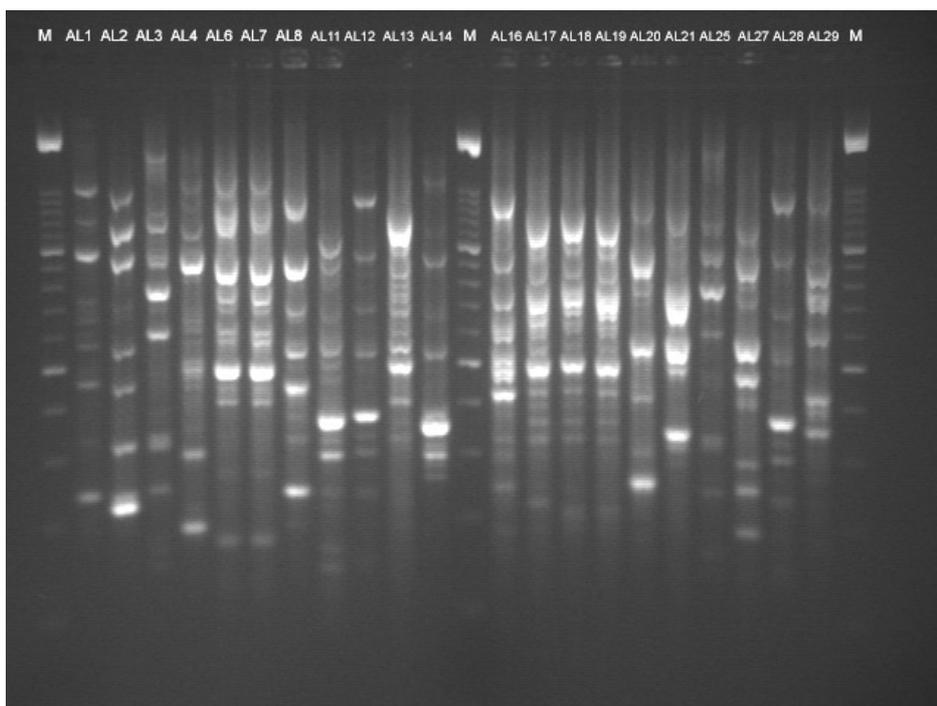


Figura 2. Ejemplo de electroforesis de BOX-PCR, las líneas 1, 13 y 24 son marcadores moleculares (marcador: molecular weight marker XIV de Roche en este caso) y el resto son cada una de las cepas de estudio. Se observa que cada carrera tiene un patrón de bandas particular.

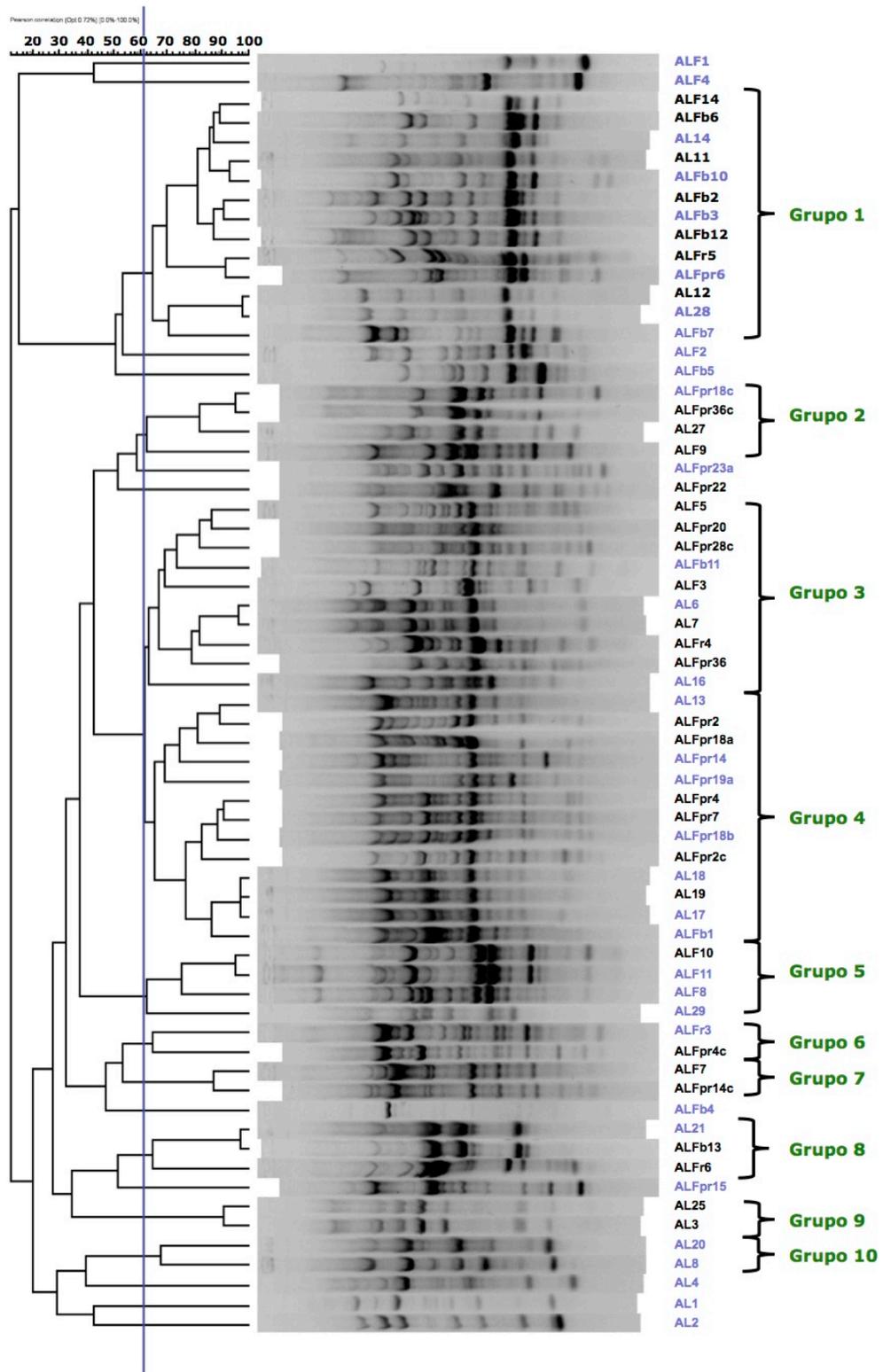


Figura 3. El dendrograma muestra todas las cepas aisladas de nódulos en España. Las cepas coloreadas en morado son aquellas que se seleccionaron para la secuenciación del gen ribosómico 16S. También se muestran llaves delimitando todos los grupos que se observan al tomar como referencia un nivel del 60% de similitud en el dendrograma.

Los patrones de bandas electroforéticas de cada cepa fueron analizados con el programa informático BioNumerics (Applied Maths), que permitió la comparación de cada una de las cepas entre sí, dando lugar al dendrograma que se muestra en la imagen (Figura 3).

Este programa analiza el número y posición de las bandas para generar una matriz de similitud, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, a partir de esa matriz, con el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) se construye un dendrograma en el que las cepas quedarán agrupadas en función de su similitud.

Únicamente utilizamos BOX-PCR y ninguna otra técnica de tipado, ya que da excelentes resultados para este grupo de microorganismos, con una enorme capacidad de discriminación y que nos ofrece una primera información muy valiosa de la diversidad del grupo (Rodríguez Martínez, 2008) y también ha dado excelentes resultados en otras actinobacterias, de hecho se ha utilizado como técnica de diferenciación para la descripción de especies nuevas del género *Streptomyces*. (Bouizgarne *et al.*, 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos con la técnica BOX-PCR (Figura 3), podemos observar en primer lugar, que no encontramos perfiles de bandas idénticos, es decir, no hay clones repetidos, lo cual indica que las colonias obtenidas de los nódulos son cepas diferentes, incluso aquellas que fueron aisladas del mismo nódulo. El número de bandas y peso molecular de las mismas, que depende del tamaño de las zonas amplificadas, es muy diverso como podemos observar en las figuras 3 y 4. Estos resultados nos indican que existe una alta diversidad genética entre los aislados obtenidos de nódulos de *Medicago sativa*.

Además esta técnica permite agrupar las cepas estudiadas por su similitud. Se ha considerado que forman parte del mismo grupo aquellas cepas que tienen una similitud mayor del 60% y utilizando este criterio se han establecido 10 grupos diferenciados, además de estos grupos, 11 cepas se mantienen independientes y no pueden ser incluidas en ninguno de los agrupamientos dado que su similitud con la más próxima está por debajo del límite establecido. La mayoría de estos agrupamientos engloban un número reducido de cepas, los grupos 6, 7, 8, 9 y 10 tienen 3 o menos de 3 cepas cada uno. Por el contrario, varios de estos grupos engloban un número mayor de cepas. Los grupos 1, 3 y 4 que contienen entre 10 y 13 cepas cada uno y los grupos 2 y 5 con 4 cepas quedan en una posición intermedia.

Basándonos en estos resultados elegimos un total de 35 cepas representativas, que incluyen tanto las cepas individuales como, en función del tamaño de cada grupo, representantes de los agrupamientos, para realizar la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S. En cuanto a las cepas aisladas en Australia, teniendo en cuenta que el número de aislados es mucho menor (21 cepas) se decidió secuenciar el gen del ARNr 16S en todos los aislados.

### Análisis de secuencias del gen del ARN ribosómico del 16S

Este gen codifica para uno de los componentes estructurales de la subunidad pequeña (30S) de los ribosomas de los organismos procariotas. Tiene un tamaño de aproximadamente 1500 pares de bases. Es el gen más utilizado para realizar estudios filogenéticos por varias razones: (i) son imprescindibles, por que participan en una función esencial para todos los seres vivos: la síntesis de proteínas, (ii) tienen una distribución universal, ya que se encuentran en todos los organismos celulares, (iii) es una molécula muy estable, fácil de aislar y secuenciar, gracias a que poseen regiones de ADN muy conservadas, en bacterias y archeas, que pueden usarse como lugar de unión de oligonucleótidos para la amplificación y secuenciación del gen, pero también contiene otras regiones variables e hipervariables que permiten diferenciar e identificar microorganismos a nivel de género y (iv) sobre todo, estas secuencias son fácilmente comparables con las de otros microorganismos por medio de las bases de datos actuales, como EZTaxon o NCBI, donde se depositan las secuencias del gen *rrs* de todos los organismos estudiados.

Para realizar este estudio en las cepas seleccionadas, de acuerdo con los resultados de BOX-PCR, el método utilizado comienza con la extracción del ADN basada en una técnica con fenol-cloroformo, el protocolo puede encontrarse en material y métodos. Para la amplificación se utilizó el kit de Sigma REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit en las proporciones indicadas por el fabricante y dos oligonucleótidos diseñados para amplificar este gen: SF1 y 1522R (material y métodos). Para la secuenciación se usaron 4 oligonucleótidos diferentes: SR2, SR3, SR4 y 1522R (material y métodos).

La comparación de las secuencias obtenidas se realizó en el servidor EzTaxon y se cotejó con una segunda comparación realizada en el servidor del NCBI, usando la opción BLAST (material y métodos). En ambas bases de datos obtuvimos resultados semejantes.

Dado que las colonias que habíamos seleccionado para su análisis habían sido escogidas por su morfología, la gran mayoría de los aislados se correspondían con el género *Micromonospora*. Sólo dos de las cepas pertenecían al género *Microbispora* (ALFr3 y Egor) y una al género *Streptomyces* (AMSO15). En el primer árbol construido con las secuencias de todos los aislados, estas cepas se encontraban en ramas muy alejadas del árbol principal y en posiciones similares a la de la secuencia utilizada como grupo externo (*Catellatospora citrea*), de tal manera que era evidente su pertenencia a géneros diferentes, por lo que se han eliminado del árbol final presentado (Figuras 4 A y B).

Cabe destacar la gran diversidad encontrada, ya que los aislados aparecen distribuidos a lo largo de todo el árbol, siendo las especies descritas más próximas las que se incluyen en la tabla 3.

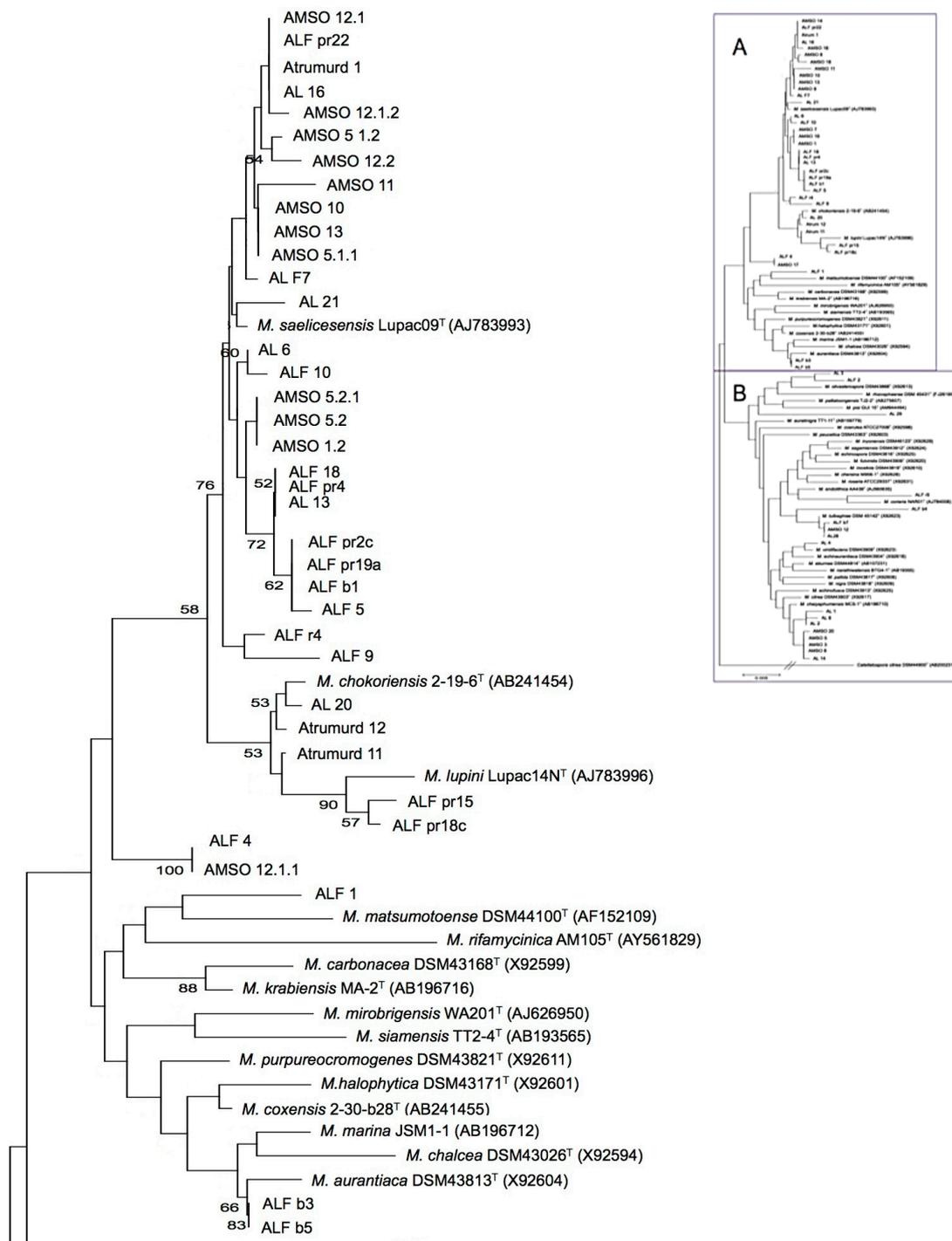


Figura 4-A. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining a partir de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S de especies tipo representativas del género *Micromonospora* y las de los aislados seleccionados de nódulos de este estudio.

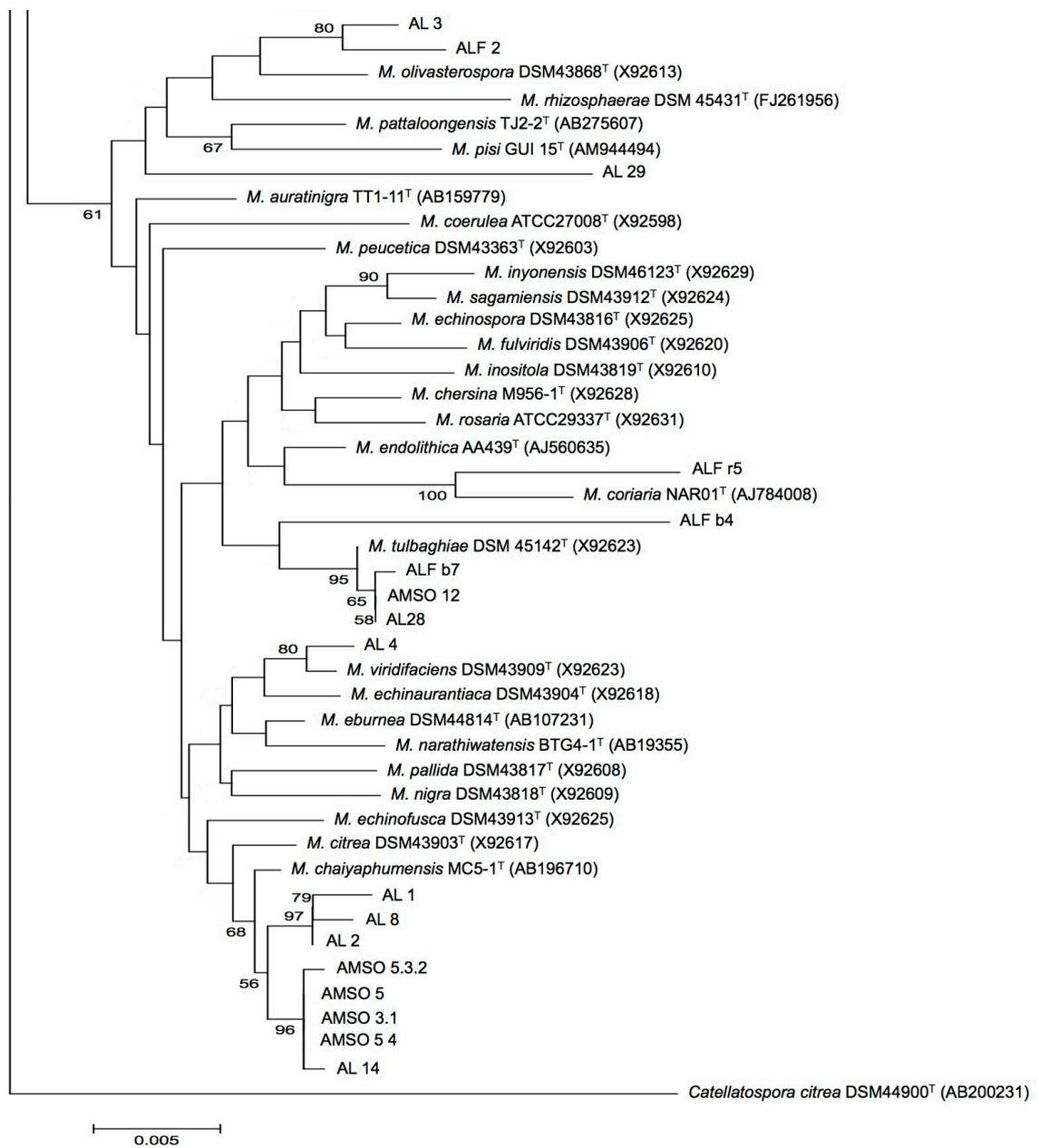


Figura 4 B. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining a partir de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S de especies tipo representativas del género *Micromonospora* y las de los aislados seleccionados de nódulos de este estudio.

Tabla 3. Similitud de las secuencias del gen *rrs* entre los aislados de este estudio y las cepas tipo más próximas.

CEPA	Especie mas próxima	Nº Acceso	Similitud (%)	Origen
ALF1	<i>M. coxensis</i> 2-30-b/28(T)	AB241455	99,17	Río Tormes
ALF2	<i>M. eburnea</i> LK2-10(T)	AB107231	98,88	Río Tormes
ALF4	<i>M. coxensis</i> 2-30-b/28(T)	AB241455	99,31	Río Tormes
ALF5	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,51	Río Tormes
ALF7	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,86	Río Tormes
ALF9	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,38	Río Tormes
ALF10	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Río Tormes
ALFr4	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,51	Aldearrubia
ALFr5	<i>M. coriariae</i> NAR01(T)	AJ784008	98,62	Aldearrubia
ALFpr2c	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,51	Palaciosrubios
ALFpr4	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Palaciosrubios
ALFpr15	<i>M. lupini</i> Lupac 14N(T)	AJ783996	99,52	Palaciosrubios
ALFpr18c	<i>M. lupini</i> Lupac 14N(T)	AJ783996	99,31	Palaciosrubios
ALFpr19a	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,51	Palaciosrubios
ALFpr22	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Palaciosrubios
ALFb1	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,58	Babilafuente
ALFb3	<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813(T)	X92604	99,45	Babilafuente
ALFb4	<i>M. echinospora</i> ATCC 15837(T)	U58532	97,78	Babilafuente
ALFb5	<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813(T)	X92604	99,52	Babilafuente
ALFb7	<i>M. tulbaghiaie</i> TVU1(T)	EU196562	99,93	Babilafuente
AL1	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,51	Babilafuente
AL2	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,72	Babilafuente
AL3	<i>M. olivasterospora</i> DSM 43868(T)	X92613	98,96	Babilafuente
AL4	<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909(T)	X92623	99,52	Babilafuente
AL6	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,72	Babilafuente
AL8	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,58	Babilafuente
AL13	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Babilafuente
AL14	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,65	Babilafuente
AL16	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Babilafuente
AL18	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,72	Babilafuente
AL20	<i>M. chokoriensis</i> 2-19/6(T)	AB241454	99,79	Babilafuente
AL21	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Babilafuente
AL28	<i>M. tulbaghiaie</i> TVU1(T)	EU196562	100	Babilafuente
AMSO 01	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,86	Binningup
AMSO 03	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,72	Binningup
AMSO 05	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,72	Binningup
AMSO 06	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,58	Binningup
AMSO 07	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,86	Binningup
AMSO 08	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,72	Binningup
AMSO 09	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,72	Binningup
AMSO 10	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,86	Binningup
AMSO 11	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,43	Binningup
AMSO 12	<i>M. tulbaghiaie</i> TVU1(T)	EU196562	100	Binningup
AMSO 13	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,72	Binningup
AMSO 14	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,65	Binningup
AMSO 16	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,51	Binningup
AMSO 17	<i>M. coxensis</i> 2-30-b/28(T)	AB241455	99,31	Binningup
AMSO 18	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,44	Binningup
AMSO 19	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,86	Binningup
AMSO 20	<i>M. chaiyaphumensis</i> MC5-1(T)	AB196710	99,65	Binningup
Atrum 1	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09(T)	AJ783993	99,71	Murdoch
Atrum 11	<i>M. chokoriensis</i> 2-19/6(T)	AB241454	99,79	Murdoch
Atrum 12	<i>M. chokoriensis</i> 2-19/6(T)	AB241454	99,72	Murdoch

Se observa también, que un alto número de aislados tienen como especie más próxima *Micromonospora saelicesensis*, especie aislada de nódulos de *Lupinus angustifolius* junto con *Micromonospora lupini* y descrita en 2007 por nuestro grupo (Trujillo *et al.*, 2007). La misma situación se observa en los agrupamientos del árbol construido con las secuencias del gen *rrs*. El número de cepas que se sitúan próximas a *M. saelicesensis* es mucho más alto que ninguna otra, como se aprecia en la figura 4. Esto no implica que se trate de cepas pertenecientes a esta especie, ya que en este género es necesario realizar más estudios, especialmente quimiotaxonómicos e hibridación del ADN total para discernir la especie a la que pertenecen.

Con otros aislados encontramos situaciones muy diferentes, cepas muy alejadas de cualquier especie descrita, lo que podría sugerir que nos encontramos ante especies nuevas, con las que se realizarán más estudios en el futuro de cara a la descripción de esas posibles nuevas especies. Los ejemplos más claros de esta situación son la cepa ALF4 y AMSO17, que además son casi con total seguridad, dos cepas de la misma especie. Otras cepas que podrían ser especies nuevas son ALFb4, AL3, ALF2, ALFr4 ó ALF9.

Cuando las cepas australianas fueron comparadas con las españolas, se observó que su distribución en el árbol filogenético era muy similar, con gran cantidad de cepas cercanas a *M. saelicesensis* y también a *M. lupini*, pero también con una amplia distribución, de muchas otras cepas a lo largo del árbol. En casi todos los casos, las cepas australianas se encuentran en las mismas ramas que las españolas y en general muy próximas entre sí. Ejemplos de estos agrupamientos en los que se mezclan cepas de las dos procedencias son: AMSO14, ALFpr22, Atrum1, AL16 y AMSO16 o el agrupamiento formado por ALFb7, AMSO12 y AL28 o la pareja ALF4 y AMSO17 (Figura 4).

Esto nos lleva a pensar que las cepas de *Micromonospora* que se aislaron en Australia han sido introducidas en ese continente, o al menos a la región de Australia Occidental desde Europa, ya sea junto con semillas de leguminosas, con plantas ya germinadas o incluso en restos de suelo que pudieron transportarse inadvertidamente en calzado, carros o cajas.

Además, de acuerdo con estos resultados, no parece haber ninguna relación entre la localización geográfica de la planta y la especie del endofito que se encuentra en sus nódulos: la proporción de cepas que se agrupan a *M. saelicesensis*, tanto entre las cepas españolas como entre las australianas es superior a cualquier otra especie y entre las cepas que se asemejan a esta especie hay aislados de todos los orígenes geográficos de España y Australia.

#### Análisis de secuencias del gen estructural de la subunidad B de la girasa

Recientemente este gen ha comenzado a utilizarse para comparación de especies del género *Micromonospora*, debido a que en algunos casos el gen 16S no tiene suficiente resolución para diferenciarlas y dos especies distintas pueden

llegar a tener un porcentaje de similitud mayor del 99% entre sus secuencias del gen ARNr 16S. Por este motivo, recientemente se ha comenzado a secuenciar otros genes que cumplan las características funcionales y de universalidad que se requieren para este tipo de análisis.

El *gyrB* es un gen estructural que codifica para la proteína de la subunidad B de la girasa, que se está utilizando recientemente para completar la información que se obtiene con el análisis de las secuencias del *rrs* (16S).

Para el estudio de este gen se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por L. Carro (Carro García, 2009) en nuestro laboratorio con los que se obtuvieron secuencias de alrededor de 1000 pb. En la extracción del ADN y posterior amplificación se utilizó el mismo método que en el gen *rrs*, pero en dos amplificaciones diferentes y con los oligonucleótidos correspondientes: Gyf1 y Gyf1B para la primera y Gyf3 y Gyf3B para la segunda. En la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos Gyf1, Gyr1B, Gyf3, Gyr3B y Gyf4 (Material y métodos). Para analizar los resultados, utilizamos la base de datos del NCBI únicamente, ya que EzTaxon no posee ningún dato de secuencias del gen *gyrB*.

Los resultados son similares a los obtenidos para el gen *rrs* en la mayoría de las cepas que se estudiaron. En este caso sólo se secuenció el gen *gyrB* de las cepas obtenidas en España, ya que una distribución semejante a la del 16S era esperable también de las cepas australianas (Figura 5).

Tras la traducción *in silico* del gen secuenciado y la utilización de estos datos, para construir un árbol con las secuencias de aminoácidos de la proteína deducida, la distribución resultante de las cepas, también era consistente con los anteriores y muy similar al árbol obtenido con las secuencias del gen ribosómico del 16S. (Figura 6 y tabla 4).

De estos resultados podemos presumir que el gen *gyrB* podría ser una buena elección a la hora de comparar cepas de *Micromonospora*, ya que el porcentaje de similitud entre ellas es menor en algunos casos que entre secuencias de 16S lo cual permite una mejor resolución e impediría considerar como pertenecientes a una única especie dos aislados pertenecientes a especies distintas aunque muy próximas, como puede ocurrir si sólo utilizamos las secuencias del gen 16S.

Sin embargo, la tabla 4 muestra que aunque en algunos casos, como ya se ha comentado, la resolución es mayor con las secuencias de *gyrB*, en otros encontramos discrepancias en la comparación con el ARNr16S y cuando incluimos en la comparativa la secuencia de la proteína deducida, los resultados y las discrepancias son similares.

Para explicar estas discordancias se debe considerar que la secuenciación del gen *gyrB* no está tan extendida como la del 16S y comparar sus secuencias no es tan accesible ni las bases de datos son tan completas como las del gen *rrs*.

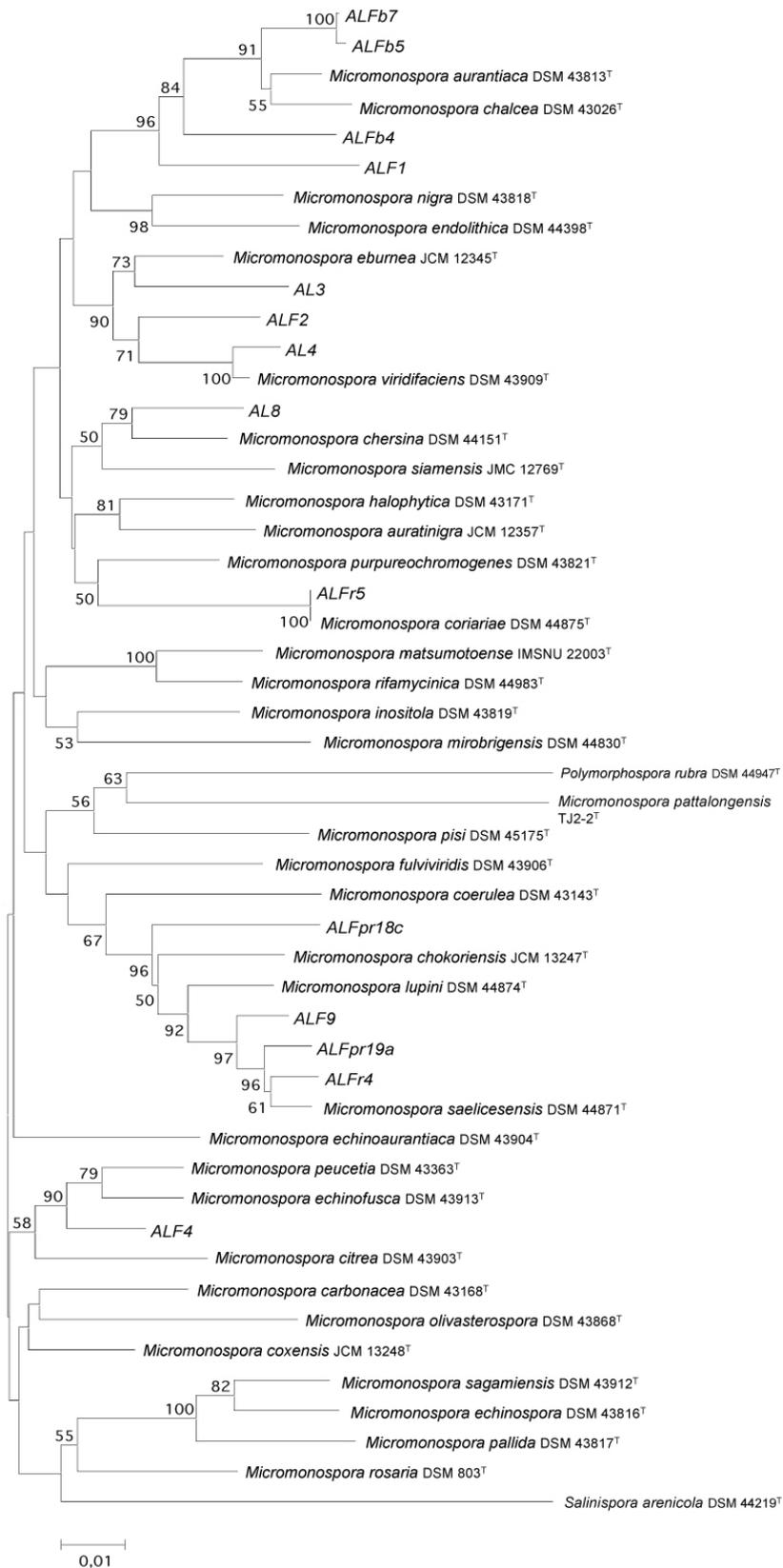


Figura 5. Árbol filogenético del gen *gyrB* (aproximadamente 1000pb) de nuestros aislados seleccionados y las especies tipo ya descritas que tenían secuenciado este gen.

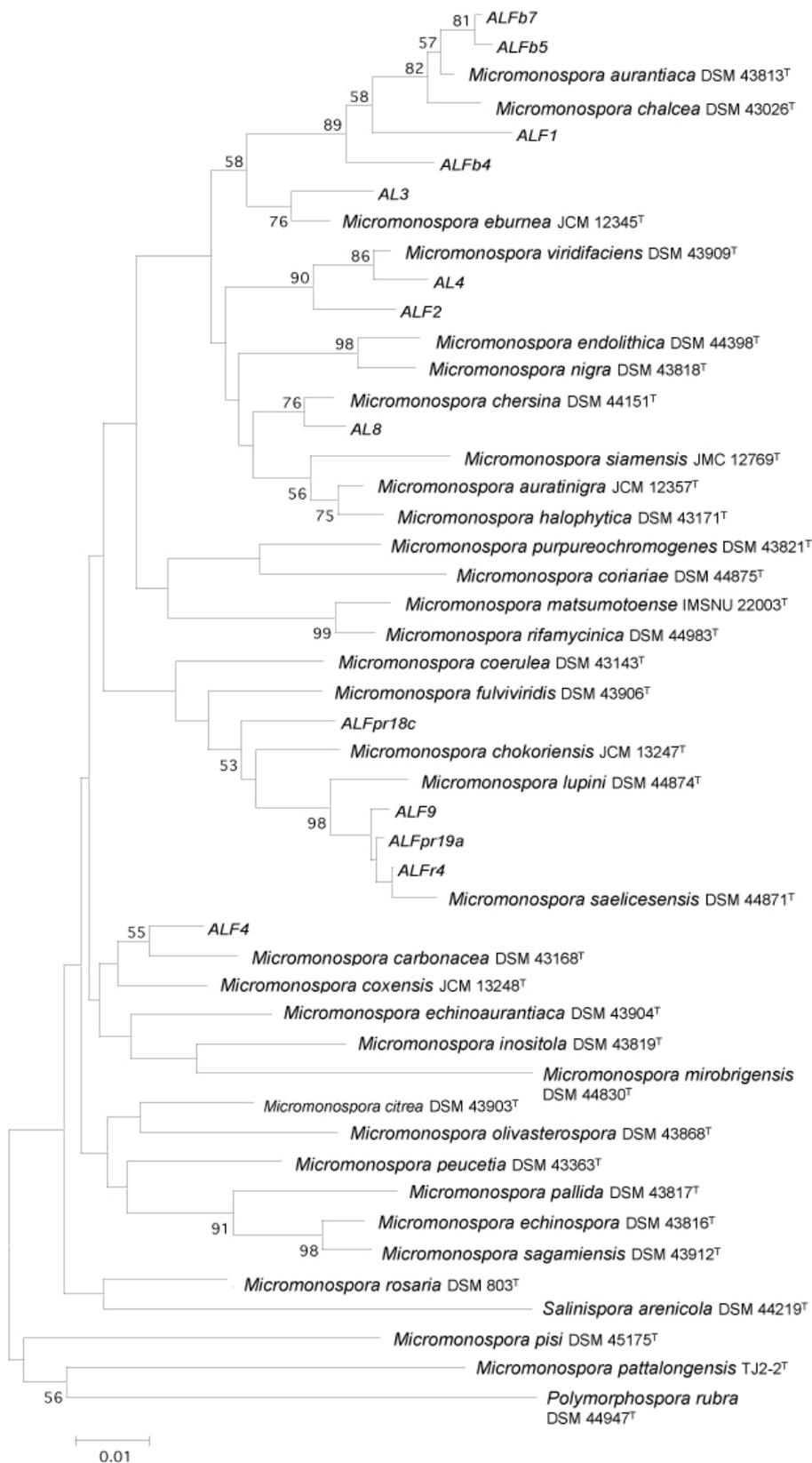


Figura 6. Árbol obtenido con las secuencias de las proteínas GyrB comparado nuestros aislados seleccionados con las especies tipo que tenían secuenciado este gen.

Tabla 4. Análisis comparativo de las secuencias de los genes *rrs* y *gyrB* entre nuestros aislados seleccionados y las especies tipo que tenían secuenciados estos genes.

CEPA	Especie tipo más próxima			
	<i>rrs</i>	Similitud	<i>gyrB</i> (especie tipo)	Similitud
ALF1	<i>M. coxensis</i> 2-30-b/28 <sup>T</sup>	99,2%	<i>M. endolithica</i> DSM 44398 <sup>T</sup>	94%
ALF2	<i>M. eburnea</i> LK2-10 <sup>T</sup>	98,9%	<i>M. eburnea</i> DSM 44814 <sup>T</sup>	96%
AL4	<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	99,5%	<i>M. viridifaciens</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	99%
AL8	<i>M. chalybaphumensis</i> MC5-1 <sup>T</sup>	99,6%	<i>M. eburnea</i> LK2-10 <sup>T</sup>	95%
ALF4	<i>M. coxensis</i> 2-30-b/28 <sup>T</sup>	99,3%	<i>M. echinofusca</i> DSM 43909 <sup>T</sup>	97%
ALF9	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,4%	<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	98%
ALFr4	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,5%	<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	98%
ALFr5	<i>M. coriariae</i> NAR01 <sup>T</sup>	98,6%	<i>M. coriariae</i> DSM 44875 <sup>T</sup>	99%
ALFb4	<i>M. echinospora</i> ATCC 15837 <sup>T</sup>	97,8%	<i>M. rifamycinica</i> CGMCC 42495 <sup>T</sup>	93%
ALFb5	<i>M. aurantiaca</i> DSM 43813 <sup>T</sup>	99,5%	<i>M. chalcea</i> NCIMB 12879 <sup>T</sup>	97%
ALFb7	<i>M. tulbaghiaie</i> TVU1 <sup>T</sup>	99,9%	<i>M. chalcea</i> NCIMB 12879 <sup>T</sup>	97%
ALFpr18c	<i>M. lupini</i> Lupac 14N <sup>T</sup>	99,3%	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	95%
ALFpr19a	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,5%	<i>M. saelicesensis</i> DSM 44871 <sup>T</sup>	98%

En este sentido, además de ser incompletas (las secuencias de todas las especies tipo no están disponibles), las secuencias depositadas, en la mayoría de los casos son secuencias parciales, que no representan el potencial taxonómico del gen completo. Puede que en un futuro sea mucho más útil su utilización, pero sería necesario solventar los problemas expuestos: disponer de secuencias completas de este gen y una base de datos completa.

## Estudios fenotípicos

El género *Micromonospora* está integrado por bacterias quimioorganotrofas, aerobias, Gram positivas y que poseen un alto contenido en G+C en su genóforo. Tienen un hábito de crecimiento filamentosos, formando hifas de alrededor de 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, y este fue el motivo de que durante mucho tiempo se considerara, erróneamente, que pertenecían al reino de los hongos. Un hecho característico de los microorganismos que integran el género *Micromonospora* es que no desarrollan micelio aéreo y las hifas están rematadas por una única espora, dos o pequeños racimos.

El crecimiento de sus colonias es lento, de alrededor de 10 días, tienen bordes irregulares, formando pliegues que se levantan del sustrato y en su centro protuberancias de formas muy diversas y a veces con aspecto de cráter. Las colonias tienen colores fuertes, como naranjas, rojos y marrones y a veces verdes o azuladas. El color de estas colonias evoluciona con el tiempo de incubación, a tonos más oscuros, casi negros o marrón muy oscuro debido al envejecimiento del cultivo y maduración de las esporas (Figura 7).



Figura 7. Ejemplos de colonias de *Micromonospora*. Todas las cepas mostradas son cepas aisladas a lo largo de este estudio.

En esta fase de crecimiento, se desarrolla el metabolismo secundario, en el que se forman metabolitos como antibióticos, pigmentos y otros compuestos de gran interés económico.

*Micromonospora* es un género con una distribución muy amplia, abundan en el suelo, pero también se han descrito en una gran cantidad de otros ecosistemas, como ambientes marinos y de agua dulce, restos vegetales y en materia en descomposición. También se han descrito en lugares menos habituales y en los últimos años se ha demostrado su presencia en el interior de plantas como el caso de *Casuarina equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005) que fue el primer registro de observación de actinobacterias endofíticas, encontradas en el interior de nódulos fijadores de nitrógeno de raíces de plantas.

### **Caracterización morfológica**

Pese a su antigüedad, el estudio de las características fenotípicas en bacterias sigue siendo de gran utilidad y relevancia, para la caracterización de las cepas y son imprescindibles para la descripción de nuevas especies. Estos estudios complementan los estudios moleculares que nos permiten determinar la posición

taxonómica de una cepa.

Estas pruebas reflejan la expresión del genoma y se pueden incluir entre ellas las características morfológicas micro y macroscópicas, las características fisiológicas y bioquímicas o la respuesta a parámetros ambientales. Los resultados obtenidos deben ser analizados de forma conjunta con la caracterización genética de cada una de las cepas, es lo que se conoce como taxonomía polifásica. Por tanto, los estudios de morfología y crecimiento en diferentes sustratos y condiciones ambientales es un apartado de especial relevancia para analizar la estructura taxonómica de las cepas aisladas de los nódulos de *Medicago* y en consecuencia se han abordado en este estudio.

Para muchas de estas pruebas se han desarrollado sistemas miniaturizados, que se han ido imponiendo en este tipo de estudios para otros géneros, pero pese a su sencillez de manejo, ahorro de tiempo, esfuerzo y rapidez, son imposibles de utilizar en actinobacterias, que no se adaptan a estos métodos de cultivo, lo que implica la utilización de pruebas clásicas en medios específicos y la utilización de placas Petri o tubos de ensayo para realizar estas pruebas (Peix *et al.*, 2011)

### Estudio microscópico

Todas las cepas estudiadas presentaron una morfología característica, las bacterias crecen formando hifas ramificadas con una sección de 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente. Tras un periodo de incubación de 2 ó 3 semanas se observó la aparición de esporas únicas, en los extremos de las hifas.

Tras realizar la tinción de Gram las células bacterianas presentan un color azul-violeta (retienen el colorante cristal violeta) son por tanto bacterias Gram positivas.

### Crecimiento y morfología de las colonias

Estos estudios se realizaron mediante el cultivo de todas las cepas en los siguientes medios de cultivo: SA1, YMA, Avena y Bennett (material y métodos). Se observaron durante tres semanas el crecimiento, la morfología de las colonias, la pigmentación de las mismas, la producción de micelio aéreo y la producción de pigmentos difusibles. (Tabla 5 y figura 8).

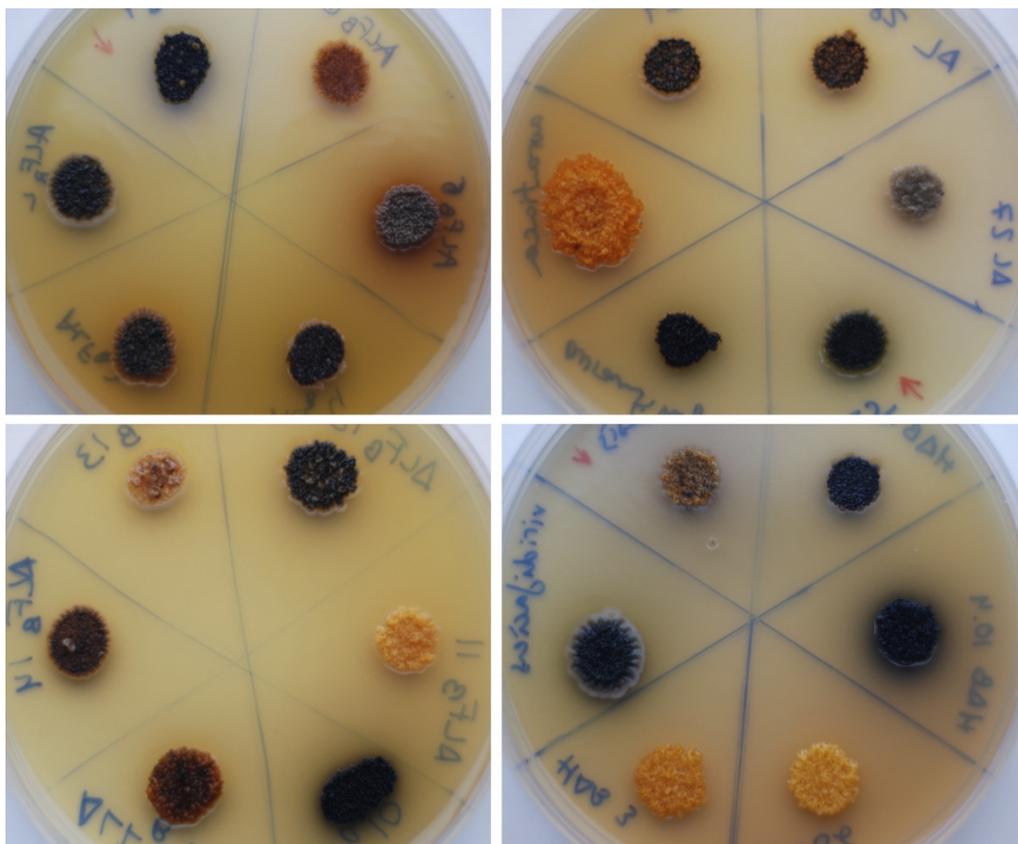


Figura 8. Ejemplos de crecimiento, morfología y pigmentación de las colonias y producción de pigmentos difusibles de cepas cultivadas en diferentes medios de cultivo. SA1 y Bennett.

Si analizamos el comportamiento de las cepas de forma global, confirmamos que todas las cepas podían crecer en medio SA1, siendo este, además, el medio en el que se obtenía un mejor crecimiento en comparación con los medios YMA, Avena y Bennett. El medio Avena, por el contrario, es en el que peor crecimiento se obtiene y además, en el que mayor número de cepas no crecieron (6 en total).

Tabla 6. Resumen de los resultados de crecimiento (medio de cultivo óptimo), color del micelio y producción de pigmentos difusibles, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora* seleccionadas para este estudio.

<b>Características morfológicas</b>	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
Crecimiento óptimo	<b>SA 1</b>	<b>Bennett</b>	<b>SA 1</b>	<b>SA 1</b>	<b>SA 1</b>	<b>Bennett</b>	<b>Bennett</b>
Micelio de sustrato / color	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
Micelio aéreo color	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
Pigmento difusible / color	<b>0%</b>	<b>16,6%</b>	<b>31,6%</b>	<b>45,5%</b>	<b>0%</b>	<b>28%</b>	<b>0%</b>

<b>Características morfológicas</b>	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
Crecimiento óptimo	<b>Medio SA 1</b>	<b>Medio SA 1 y Bennett</b>	<b>Medio Bennett</b>
Micelio de sustrato / color	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
Micelio aéreo color	<b>0%</b>	<b>0%</b>	<b>0%</b>
Pigmento difusible / color	<b>19%</b>	<b>15%</b>	<b>24%</b>

Cuando se analizan los resultados de acuerdo con la zona de aislamiento de las cepas, observamos claras diferencias en cuanto al medio de cultivo que proporciona un crecimiento óptimo. Mientras que para los aislados de Aldearubia, Palacios Rubios, Tormes y San José fue el medio SA1 el más adecuado, para los aislados de Babilafuente y Australia Occidental (Binningup y Murdoch) el medio que mejores resultados dio fue el de Bennett. Las cepas tipo que se incluyeron en el estudio crecieron de forma óptima tanto en medio SA1 como en Bennett (Tabla 6).

Las colonias de las cepas microbianas obtenidas de nódulos de alfalfa, tienen las características fenotípicas típicas del género *Micromonospora*: colonias con bordes irregulares y pliegues, con la zona central de la colonia mostrando protuberancias, tienen colores brillantes en su mayoría de tonalidades naranjas y marrones, salvo algunas excepciones con color verde o negro y ninguna desarrolló micelio aéreo (Tablas 7, 8 y 9 y figuras 7 y 8).

Un número reducido de cepas, el 19% de las cepas aisladas en España y un 24% entre las procedentes de Australia producen pigmentos difusibles al medio, generalmente de color negro, marrón o rojizo y en algunos casos verde o violeta. La producción de pigmentos es desigual en los 4 medios utilizados, en

alguno de estos medios la producción es más frecuente; en medio de Avena 10 cepas los producían, en Bennett 7 cepas y en medio SA1 sólo 4 cepas, pero ninguna los produce en YMA. Algunas cepas como la ALFpr14 produce pigmentos en tres medios de cultivo pero lo más frecuente es que sólo los produzcan en uno y con menos frecuencia en dos de forma simultánea (Tablas 6, 7, y 8).

Cuando analizamos este carácter en función de las zonas de aislamiento se observan claras diferencias entre las cepas. No existe ninguna productora de pigmentos difusibles entre los aislados de Aldearrubia, por el contrario casi la mitad de las cepas (un 45,5%) de las aisladas del Tormes las producen. En cuanto a los aislados en Babilafuente y Palacios Rubios se encuentran en una situación intermedia con un 16,6% y un 31,6% respectivamente de cepas que producen este tipo de pigmentos.

La situación de las cepas australianas en este aspecto es también particular, ya que ninguna de las obtenidas en Murdoch produce pigmentos pero un 24% de las procedentes de Binningup lo hace.

Los resultados individuales de crecimiento, morfología y producción de pigmentos en diferentes medios de cultivo (SA1, Bennett, YMA y Avena), de todas las cepas de este estudio se muestran en las tablas 7, 8 y 9.







## Caracterización fisiológica

### Utilización de diferentes sustratos como fuente de carbono

La capacidad para utilizar diferentes sustratos como fuente de carbono es una característica de gran interés en la caracterización fenotípica. En este estudio se determinó la capacidad de estas cepas para utilizar 31 fuentes de carbono, que fue medida a los 21 días de su inoculación.

La metodología de este estudio se describe en material y métodos. Se utilizó como control positivo la glucosa, por ser una fuente de carbono que todas las cepas podían utilizar.

Tabla 10 A. Resumen de los resultados de crecimiento con diferentes sustratos como fuente de carbono, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Fuentes de carbono	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
A. galacturónico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
A. glutárico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
A. quínico	0%	8%	0%	0%	0%	0%	0%
A. propiónico	0%	50%	0%	0%	0%	0%	0%
Almidón	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Arabinosa	95,5%	100%	89,5%	81,8%	100%	78%	100%
Caseína	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Celobiosa	95,5%	100%	84,2%	81,8%	100%	100%	100%
Celulosa	90,9%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Citrato sódico	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Fructosa	100%	100%	89,5%	81,8%	100%	100%	100%
Galactosa	100%	100%	94,7%	90,9%	100%	100%	100%
Gelatina	95,4%	100%	89,5%	90,9%	100%	100%	100%
Glucosa	100%	100%	89,5%	90,9%	100%	100%	100%
Gluconato sódico	95,5%	100%	89,5%	81,8%	100%	100%	100%
Maltosa	95,5%	100%	100%	90,9%	100%	100%	100%
Manitol	95,5%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Melecitosa	95,5%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Melibiosa	95,5%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Mesoeritriol	90,9%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Mio-inositol	95,5%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Propionato sódico	100%	91,5%	89,5%	36,4%	0%	100%	100%
Rafinosa	95,5%	100%	100%	90,9%	100%	100%	100%
Ramnosa	100%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Sacarosa	100%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%
Salicina	95,5%	100%	94,7%	72,7%	100%	100%	100%
Sorbosa	90,9%	100%	84,2%	90,9%	100%	100%	100%
Trehalosa	95,5%	100%	84,2%	100%	100%	0%	0%
Xilano	100%	100%	100%	90,9%	100%	94%	100%
Xilitol	100%	100%	84,2%	81,8%	100%	100%	100%
Xilosa	90,5%	100%	94,7%	81,8%	100%	100%	100%

Tabla 10 B. Resumen de los resultados de crecimiento con diferentes sustratos como fuente de carbono, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Fuentes de carbono	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
A. galacturónico	0%	0%	0%
A. glutámico	0%	0%	0%
A. quínico	2%	0%	0%
A. propiónico	8,8%	0%	0%
Almidón	100%	100%	100%
Arabinosa	92,6%	92%	80%
Caseína	100%	100%	100%
Celobiosa	91,2%	100%	100%
Celulosa	95,60%	100%	100%
Citrato sódico	0%	0%	0%
Fructosa	94,1%	92%	100%
Galactosa	97%	100%	100%
Gelatina	94,1%	100%	100%
Glucosa	95,60%	100%	100%
Gluconato sódico	92,4%	69%	100%
Maltosa	97%	69%	100%

Fuentes de carbono	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
Manitol	94,1%	100%	100%
Melecitosa	94,1%	100%	100%
Melibiosa	94,1%	100%	100%
Mesoeritriol	92,6%	77%	100%
Mio-inositol	94,1%	100%	100%
Propionato sódico	79,4%	0%	100%
Rafinosa	97,1%	100%	100%
Ramnosa	95,6%	85%	100%
Sacarosa	95,6%	85%	100%
Salicina	92,6%	77%	100%
Sorbosa	91,2%	100%	100%
Trehalosa	94,1%	77%	0%
Xilano	98,5%	100%	95%
Xilitol	92,6%	77%	100%
Xilosa	92,6%	92%	100%

Los resultados globales muestran una gran capacidad de estas cepas para usar diferentes fuentes de carbono, lo que indica una excelente versatilidad metabólica, como se puede observar en las tablas 10 A y B y figura 9.

Especial énfasis debe darse al hecho de que casi ninguno de los ácidos utilizados como fuente de carbono, permitía el crecimiento de ninguna de las cepas salvo 5 de las provenientes de Babilafuente, que crecieron en ácido propiónico. El mismo resultado se observa con el citrato de sodio.

Es interesante comprobar que casi todas las cepas podían hacer uso de la celulosa como fuente de carbono, ya que la degradación de esta, podría ser un mecanismo de entrada en el interior de la planta. Los *Rhizobia* utilizan su capacidad para degradar celulosa no cristalina en una de las etapas cruciales del proceso de infección (Robledo *et al.*, 2008) y este podría ser el caso también en *Micromonospora*.

El propionato sódico es usado por la gran mayoría de las cepas del estudio, pero ninguna de las especies tipo usadas, ni las cepas provenientes de nódulos encontrados en el centro de capacitación de San José, en Salamanca, fueron capaces de crecer en medio con propionato.

Los resultados individuales de crecimiento, en diferentes sustratos como única fuente de carbono, de todas las cepas de este estudio se encuentran recogidas en las tablas 11 (1 y 2), 12 (1 y 2) y 13 (1 y 2).

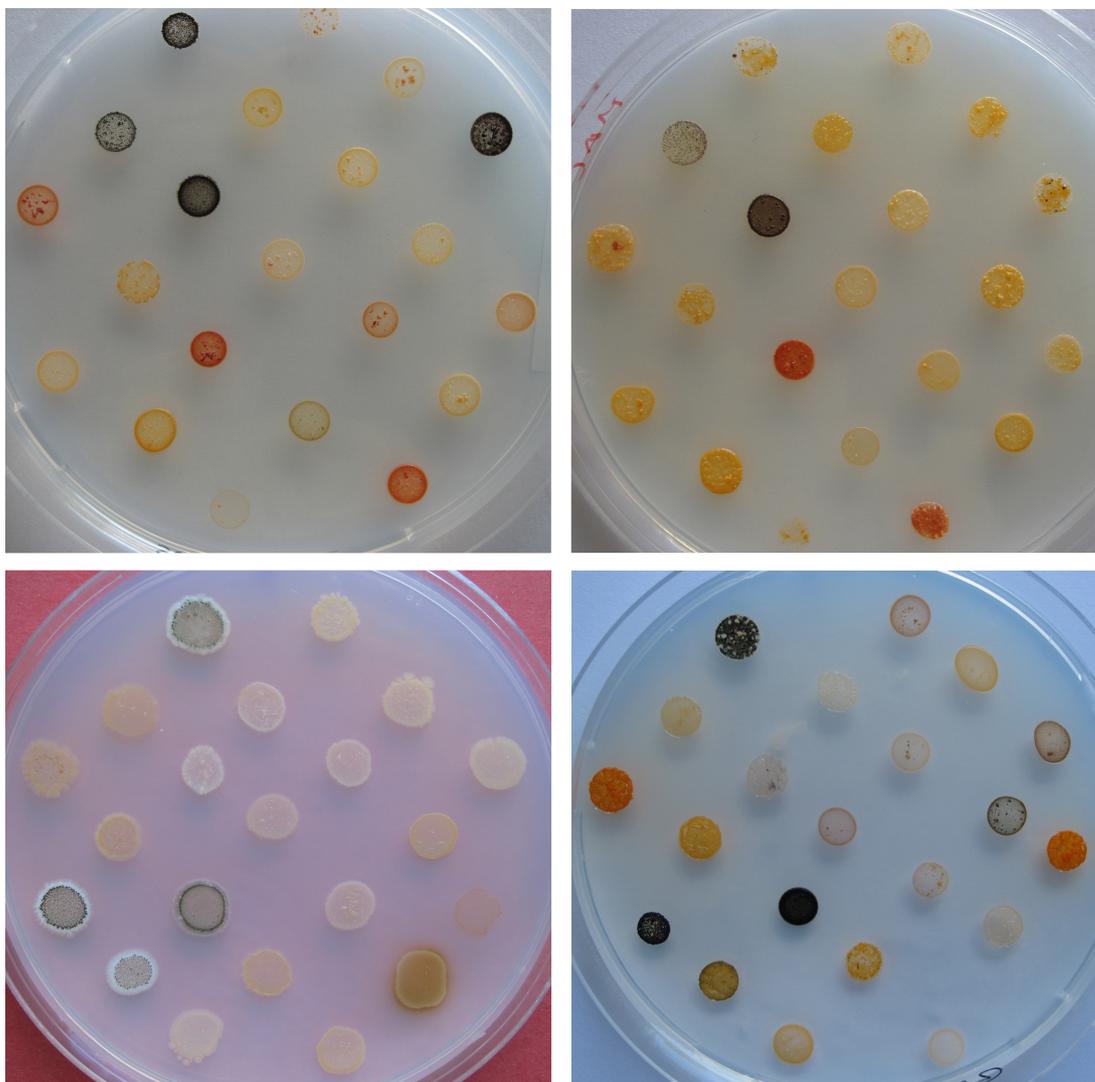


Figura 9. Ejemplos de crecimiento, morfología y pigmentación de las colonias de algunas de las cepas de este estudio cultivadas en medios de cultivo con diferentes sustratos como única fuente de carbono. De arriba abajo y de izquierda a derecha: sacarosa, maltosa, celulosa y glutamato de sodio.



Tabla 11-2. Utilización de fuentes de carbono por las cepas aisladas de Aldearrubia (AL) y Babila Fuente (ALF b)

Fuentes de carbono	AL 1	AL 2	AL 3	AL 4	AL 6	AL 7	AL 8	AL 11	AL 12	AL 13	AL 14	AL 16	AL 17	AL 18	AL 19	AL 20	AL 21	AL 23	AL 25	AL 27	AL 28	AL 29	ALF b1	ALF b2	ALF b3	ALF b4	ALF b5	ALF b6	ALF b7	ALF b10	ALF b11	ALF b12	ALF b13	ALF b14			
Manitol	2	1	1	1	2	2	2	1	2	0	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Melecltosa	2	1	2	2	3	3	2	2	2	2	0	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Melibiosa	2	1	2	1	3	3	2	2	2	2	0	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Mesoertritol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Mio-inositol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Propionato sódico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Rafinosa	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	0	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Rammosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sacarosa	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Salicina	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	0	3	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Sorbosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trehalosa	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Xilano	1	1	1	1	3	3	2	2	2	2	1	3	2	2	2	2	2	3	1	1	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2	3	3	3	3	
Xilitol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Xilosa	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	0	3	0	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Datos de crecimiento: - Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

Tabla 12-1. Utilización de fuentes de carbono por las cepas aisladas de Palacios Rubios (ALF pr), Río Tormes (ALF) y San José (ALF r)

Fuentes de carbono	ALF pr2	ALF pr2c	ALF pr4	ALF pr4c	ALF pr6	ALF pr7	ALF pr14	ALF pr14c	ALF pr15	ALF pr18a	ALF pr18b	ALF pr18c	ALF pr19a	ALF pr20	ALF pr22	ALF pr23a	ALF pr29c	ALF pr36	ALF pr36c	ALF 1	ALF2	ALF 3	ALF 4	ALF 5	ALF 6	ALF 7	ALF 8	ALF 9	ALF 10	ALF 11	ALF r3	ALF r4	ALF r5	ALF r6		
A. galacturónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A. glutárico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A. quínico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
A. propiónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Almidón	3	1	3	1	2	3	2	3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2		
Arabinosa	2	0	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Caseína	3	1	3	3	3	3	3	3	2	1	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	3	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	
Celobiosa	3	0	2	1	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	1	2	0	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Celulosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Citrato sódico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fructosa	2	0	2	1	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	
Galactosa	2	0	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Gelatina	2	0	3	1	3	2	2	3	2	0	3	1	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Glucosa	2	0	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Gluconato sódico	1	0	3	1	2	2	1	3	1	0	2	3	3	2	2	2	2	1	1	2	2	0	2	2	3	3	3	3	3	2	0	1	3	1	3	
Maltosa	2	2	2	1	1	2	2	2	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Datos de crecimiento: - Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

Tabla 12-2. Utilización de fuentes de carbono por las cepas aisladas de Palacios Rubios (ALF pr), Rio Tormes (ALF) y San José (ALF r)

Fuentes de carbono	ALF pr2	ALF pr2c	ALF pr4	ALF pr4c	ALF pr6	ALF pr7	ALF pr14	ALF pr14c	ALF pr15	ALF pr18a	ALF pr18b	ALF pr18c	ALF pr19a	ALF pr20	ALF pr22	ALF pr23a	ALF pr29c	ALF pr36	ALF pr36c	ALF 1	ALF2	ALF 3	ALF 4	ALF 5	ALF 6	ALF 7	ALF 8	ALF 9	ALF 10	ALF 11	ALF r3	ALF r4	ALF r5	ALF r6	
Manitol	1	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	2	1	0	2	1	1	1	
Meleictosa	2	0	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	0	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	1	1	2	
Melibiosa	3	0	2	1	2	3	2	2	2	1	3	1	2	2	2	1	2	1	2	3	0	1	1	2	2	2	2	2	2	0	1	2	2	2	
Mesoeritrol	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
Mio-inositol	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
Propionato sódico	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rafinosa	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	0	1	2	2	2	2
Ramnosa	2	1	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Sacarosa	2	0	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	0	2	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	3
Salicina	2	0	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	0	1	0	2	2	2	1	2	1	0	1	1	1	1	1
Sorbosa	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Trehalosa	2	0	1	2	1	1	2	1	1	0	1	3	2	1	2	1	2	0	2	2	1	2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2
Xilano	3	1	3	3	2	3	2	3	3	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	2	2	1	2	3	3	2	3	2	1	2	3	2	2
Xilitol	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Xilosa	2	0	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2

Datos de crecimiento.- Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.



Tabla 13-2. Utilización de fuentes de carbono de los aislados Binningup (AMSO), Murdoch University (Atrum) y cepas tipo de las especies seleccionadas del género *Micromonospora*

Fuentes de carbono	AMSO 01	AMSO 03	AMSO 05	AMSO 06	AMSO 07	AMSO 08	AMSO 09	AMSO 10	AMSO 11	AMSO 12	AMSO 13	AMSO 14	AMSO 15	AMSO 16	AMSO 17	AMSO 18	AMSO 19	AMSO 20	Atrum 1	Atrum 11	Atrum 12	<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. aurantinigra</i>	<i>M. chokoriensis</i>	<i>M. coriariae</i>	<i>M. coxensis</i>	<i>M. eburnea</i>	<i>M. echinospora</i>	<i>M. endolithica</i>	<i>M. lupini</i>	<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. saelicesensis</i>	<i>M. viridifaciens</i>
Manitol	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1
Meleciotosa	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1
Melibiosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1
Mesoeritrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
Mio-inositol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Propionato sódico	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rafinosa	1	1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1
Ramnosa	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1	2	0	1	2	1	0	1	1	1	1
Sacarosa	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	0	1	2	1	1	1	1
Salicina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	0	2	0	0	0	2	1	1
Sorbosa	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1
Trehalosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Xilano	2	3	3	2	1	2	2	2	1	2	2	0	3	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3	2	1	2	2	1	2	2	2	1
Xilitol	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
Xilosa	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	0	2	2	2	1	2	2	2	1

Datos de crecimiento.- Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

### Utilización de aminoácidos

*Micromonospora* puede usar aminoácidos como fuentes de carbono, por lo que se estudió la capacidad de nuestras cepas para crecer utilizando, como única fuente de carbono nueve aminoácidos (Tabla 14).

Los resultados muestran que la gran mayoría de las cepas podía crecer utilizando ocho de los aminoácidos probados como fuente de carbono.

Tabla 14. Resumen de los resultados de crecimiento en medios con diferentes aminoácidos como fuente de carbono, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Crecimiento aminoácidos	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
Alanina	95,5%	100%	84,2%	81,8%	100%	100%	100%
Arginina	90,9%	100%	94,7%	90,9%	100%	100%	100%
Asparagina	95,5%	100%	89%	81,8%	100%	100%	100%
Histidina	100%	100%	89,5%	81,8%	100%	100%	100%
Lisina	95,5%	100%	100%	81,8%	100%	100%	100%
Prolina	36,4%	100%	0%	9,9%	0%	0%	0%
Serina	95,5%	100%	89,5%	100%	100%	100%	100%
Tirosina	100%	100%	94,7%	90,9%	100%	100%	100%
Valina	95,5%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Crecimiento aminoácidos	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
Alanina	91,1%	0%	100%
Arginina	94,1%	62%	100%
Asparagina	92,6%	100%	100%
Histidina	94,1%	92%	100%
Lisina	95,6%	23%	100%
Prolina	30,9%	46%	0%
Serina	95,6%	54%	100%
Tirosina	97,1%	77%	100%
Valina	98,5%	46%	100%

La excepción la constituía la prolina, que un gran número de los aislados no podía usar y por tanto su crecimiento era nulo en los medios con este aminoácido. En general, el número de cepas que pueden crecer en presencia de prolina es bajo, sólo el 46% de las cepas tipo estudiadas la utilizan y un porcentaje inferior, el 30,9% de las cepas de España. Cuando se analizan las cepas según la zona de aislamiento, se observan también grandes diferencias entre los distintos grupos. Por ejemplo, el 100% de los aislados en Babilafuente crecen en este medio suplementado con prolina y por el contrario, ninguno de los aislados en Palacios Rubios y San José crecieron y sólo un 9% de las cepas aisladas en el Tormes y un 36% de las procedentes de Aldearubia fueron

capaces de utilizar la prolina.

El resto de los aminoácidos fue utilizado por la mayoría de las cepas, más del 90% de las cepas españolas y el 100% de las procedentes de Australia crecieron en estos medios.

Sin embargo, las cepas tipo utilizadas no crecieron en medios suplementados con alanina, hecho que contrasta con los aislados de Australia de los que crecieron el 100% o los de España, que también crecieron prácticamente en su totalidad, un 91%, en el medio con alanina.

Los resultados individuales de utilización de distintos aminoácidos como fuente de carbono, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 16, 17 y 18.

### Degradación de sustratos

Las actinobacterias se caracterizan por su gran potencial para degradar y reciclar la materia orgánica. Esto implica su capacidad para la biosíntesis de exoenzimas capaces de degradar polímeros que se encuentran en la materia orgánica. En este estudio se han probado 8 sustratos para valorar la capacidad de las cepas estudiadas en este aspecto tan importante en su medio natural.



Figura 10. Ejemplos de ensayos de degradación de almidón. A la izquierda una cepa positiva y a la derecha una negativa para la degradación de este polímero.

Tabla 15. Resumen de los resultados de degradación de diferentes sustratos, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Degradación sustratos	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
Almidon	95,5%	100%	94,7%	100%	75%	89%	100%
Arbutina	68,2%	66,7%	68,4%	63,6%	75%	67%	100%
Caseína	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Esculina	95,5%	100%	89,5%	100%	100%	100%	100%
Gelatina	90,9%	100%	89,5%	81,8%	75%	100%	100%
Urea	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Tween-20	50%	75%	52,6%	63,6%	50%	nc	nc
Tween-80	100%	100%	100%	100%	100%	94%	100%

Degradación sustratos	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
Almidon	95,6%	92%	90%
Arbutina	67,6%	92%	71%
Caseína	100%	100%	100%
Esculina	95,6%	100%	100%
Gelatina	89,7%	85%	100%
Urea	0%	31%	0%
Tween-20	57,4%	100%	nc
Tween-80	100%	92%	95%

Los resultados obtenidos nos muestran, que efectivamente, nuestros aislados tienen una gran capacidad para degradar estos sustratos: almidón, caseína, gelatina, esculina y Tween 80 fueron hidrolizados por un número de cepas superior al 85%. Porcentajes significativamente menores de cepas fueron capaces de degradar la arbutina, el Tween 20 y urea. En este caso, sólo dos de las cepas tipo fueron capaces de degradar urea y ningún aislado, tanto de España como de Australia lo hizo. La caseína, por el contrario, fue degradada por el 100% de las cepas (Tabla 15).

Todas las cepas menos 4 eran capaces de degradar almidón (Figura 10), todas menos 3 esculina y todas tenían la capacidad de degradar caseína y Tween 80. Por el contrario, sólo algo más de la mitad, 49, podían degradar Tween 20.

La arbutina es utilizada menos ampliamente aunque muchas cepas eran capaces de degradarlas. Pese a esta gran capacidad de *Micromonospora* para el uso de un amplio abanico de sustratos, sólo encontramos 2 cepas capaces de degradar la urea.

Los resultados individuales de degradación de diferentes sustratos, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 16, 17 y 18.

Tabla 16. Utilización de aminoácidos como fuentes de carbono y degradación de polímeros por las cepas aisladas de Aldarrubia (AL) y Babiafuente (ALF b)

Aminoácidos Degradación	AL 1	AL 2	AL 3	AL 4	AL 6	AL 7	AL 8	AL 11	AL 12	AL 13	AL 14	AL 16	AL 17	AL 18	AL 19	AL 20	AL 21	AL 23	AL 25	AL 27	AL 28	AL 29	ALF b1	ALF b2	ALF b3	ALF b4	ALFb5	ALF b6	ALF b7	ALF b10	ALF b11	ALF b12	ALF b13	ALF b14	
Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Arginina	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Asparagina	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Histidina	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lisina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Prolina	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Serina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tirosina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Valina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Almidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	-	w	-	+	-	+	-	+	+	nc	w	w	+	+	+	+	-	w	+	-	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Caseina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tween-20	nc	nc	nc	nc	nc	nc	2	2	2	nc	nc	1	nc	1	1	nc	1	nc	1	-	3	4	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	0
Tween-80	2	4	3	2	3	2	2	3	4	4	2	2	1	2	2	4	2	2	2	3	4	4	3	3	2	3	3	2	3	2	3	2	2	4	2

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.  
 Degradación: respuesta débil w, positivo +, halo de degradación extenso ++, halo muy extenso +++, sin crecimiento nc.

Tabla 17. Utilización de aminoácidos como fuentes de carbono y degradación de polímeros por cepas aisladas de Palacios Rubios (ALF pr), Rio Tormes (ALF) y San José (ALF r)

Aminoácidos Degradación	ALF pr2	ALF pr2c	ALF pr4	ALF pr4c	ALF pr6	ALF pr7	ALF pr14	ALF pr14c	ALF pr15	ALF pr18a	ALF pr18b	ALF pr18c	ALF pr19a	ALF pr20	ALF pr22	ALF pr23a	ALF pr29c	ALF pr36	ALF pr36c	ALF 1	ALF2	ALF 3	ALF 4	ALF 5	ALF 6	ALF 7	ALF 8	ALF 9	ALF 10	ALF 11	ALF r3	ALF r4	ALF r5	ALF r6	
Alanina	1	0	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	2	2	
Arginina	1	0	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Asparagina	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
Histidina	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1
Lisina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
Prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Serina	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Tirosina	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Valina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Almidon	+	+	+	-	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Arbutina	+	-	+	+	+	w	w	+	-	+	+	-	+	+	+	w	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Caseina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	++	++	-	w	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tween-20	0	0	0	0	1	2	3	0	0	0	2	0	1	2	2	0	2	1	1	1	1	0	1	2	0	0	2	2	1	0	0	0	2	1	
Tween-80	2	2	3	1	2	3	2	3	3	1	3	4	2	2	2	2	3	2	2	3	2	3	4	3	2	2	2	3	1	1	1	2	2	2	1

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.  
 Degradación: respuesta débil w, positivo +, halo de degradación extenso ++, halo muy extenso +++, sin crecimiento nc.

Tabla 18. Utilización de aminoácidos como fuentes de carbono y degradación de polímeros de los aislados de Binningup (AMSO), Murdoch University (Atrum) y cepas tipo de las especies seleccionadas del género *Micromonospora*

Aminoácidos Degradación	AMSO 01	AMSO 03	AMSO 05	AMSO 06	AMSO 07	AMSO 08	AMSO 09	AMSO 10	AMSO 11	AMSO 12	AMSO 13	AMSO 14	AMSO 15	AMSO 16	AMSO 17	AMSO 18	AMSO 19	AMSO 20	Atrum 1	Atrum 11	Atrum 12	<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. aurantinigra</i>	<i>M. chokoriensis</i>	<i>M. coriariae</i>	<i>M. coxensis</i>	<i>M. eburnea</i>	<i>M. echinospora</i>	<i>M. endolithica</i>	<i>M. lupini</i>	<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. saelicesensis</i>	<i>M. viridifaciens</i>				
Alanina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
Arginina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Asparagina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Histidina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Lisina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Prolina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Serina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Tirosina	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Valina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Almidon	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	-	+	-	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	w	
Arbutina	+	-	+++	+	+	-	+	w	+	-	+	-	-	+	+	+	w	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	
Caseína	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	+	+++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gelatina	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tween-20	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc	nc																			
Tween-80	2	3	3	1	1	3	2	2	1	1	2	nc	1	2	1	1	2	3	1	2	1	3	3	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.  
 Degradación: respuesta débil w, positivo +, halo de degradación extenso ++, halo muy extenso +++, sin crecimiento nc.

### Producción de catalasa y oxidasa

La aparición de especies reactivas de oxígeno es una consecuencia directa e inevitable del metabolismo aeróbico. En diversos procesos bioquímicos como la fotosíntesis o la respiración se generan estas especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas que dañan la célula y cuyo nivel es necesario controlar.

Tabla 19. Resumen de los resultados de producción de catalasa y oxidasa, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Producción enzimas	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
Catalasa	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Oxidasa	2,7%	8,3%	68,4%	63,6%	75%	50%	100%

Producción enzimas	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
Catalasa	100%	92%	100%
Oxidasa	44,1%	62%	67%

Los microorganismos aerobios han desarrollado sistemas enzimáticos capaces de destruir las especies reactivas del oxígeno en cuanto aparecen. La enzimas implicadas en estos procesos son la catalasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa.

La enzima más común dentro de este grupo es la catalasa, que destruye el peróxido de hidrógeno. Por tanto, no fue sorprendente la comprobación de que todas las cepas estudiadas producían catalasas (Tabla 19).

Por el contrario, la producción de oxidasa era más escasa, 38 cepas de las 72 estudiadas la generaban (sin incluir las 10 especies tipo que también se estudiaron).

Estos resultados están de acuerdo con los descritos en la bibliografía para el género *Micromonospora* (Carro García, 2009), (Alonso Vega, 2010).

Los resultados individuales de producción de catalasa y oxidasa, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 23, 24 y 25.

### **Factores ambientales**

Las últimas pruebas fenotípicas que se realizaron en las cepas fueron las relacionadas con su tolerancias a distintos factores ambientales, en concreto, los parámetros estudiados fueron: temperatura, pH y salinidad.

### Temperatura

La temperatura es un factor de enorme importancia para los microorganismos. Debido a su relación superficie/volumen no es posible mantener una temperatura intracelular diferente a la del medio externo, y en consecuencia, los microorganismos capaces de crecer a temperaturas extremas tienen sistemas metabólicos adaptados a esas condiciones de temperatura.

El rango de temperaturas en el que la mayoría de los aislados es capaz de crecer se sitúa entre los 12°C y los 45°C. A temperaturas de incubación de 4°C ninguna cepa presentó crecimiento alguno.

Observamos que todas las cepas estudiadas podían crecer entre 20 y 28°C. La mayoría además, presentaba un crecimiento mayor y más rápido, aunque también menos homogéneo, a 37°C. El mismo tipo de crecimiento masivo pero heterogéneo ocurría a 45°C, aunque no todas las cepas crecían a esta temperatura (Tabla 20).

Tabla 20. Resumen de los resultados de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

<b>Crecimiento Temperatura</b>	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
T 4°C	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
T 12°C	31,8%	50%	63,2%	54,5%	50%	89%	100%
T 20°C	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
T 28°C	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
T 37°C	100%	100%	100%	100%	100%	94%	100%
T 45°C	77,2%	91,7%	42,1%	9,9%	50%	78%	67%

<b>Crecimiento Temperatura</b>	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
T 4°C	0%	0%	0%
T 12°C	48,5%	62%	90%
T 20°C	100%	100%	100%
T 28°C	100%	100%	100%
T 37°C	100%	100%	95%
T 45°C	57,4%	100%	76%

Cuando se comparan los resultados de nuestros aislados con los de las cepas tipo usadas, observamos que estas son más tolerantes que nuestros aislados a altas temperaturas, el 100% de las cepas tipo utilizadas creció a 45°C mientras que sólo un 57,4% de las españolas lo hizo y un 76% de las australianas.



Figura 11. Ejemplos de crecimiento a diferentes temperaturas: Placa incubada a 24°C. A esta temperatura todas las cepas presentan un crecimiento abundante y uniforme.

Estos resultados están de acuerdo con los descritos en la bibliografía para el género *Micromonospora*, que establece un rango de temperaturas, para un crecimiento óptimo, de entre 20 y 40°C.

Los resultados individuales de crecimiento a diferentes temperaturas de incubación, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 23, 24 y 25.

### pH

Las condiciones de pH del medio externo, también son críticas para el crecimiento de los microorganismos, pero al contrario de lo que ocurre con la temperatura, el pH intracelular debe mantenerse dentro de unos límites bastante estrechos. Por tanto, el pH intracelular puede ser diferente al del medio externo, y en consecuencia los microorganismos capaces de crecer en condiciones de pH extremos, tienen que disponer de mecanismos que les permitan mantener el pH intracelular en el rango adecuado, lo que supone un alto coste energético para la célula.

En cuanto al pH, la gran mayoría de las cepas podían crecer en un rango de 6,5 a 8, pero muy pocas, salvo las cepas de Australia, crecían por debajo o por encima de estos valores (Tabla 21 y figura 12).

Tabla 21. Resumen de los resultados de crecimiento en medios con diferente pH, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Crecimiento: pH	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
pH 4,5	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
pH 5,5	4,5%	0%	0%	0%	0%	11%	0%
pH 6,5	77,2%	83,3%	15,8%	18,2%	50%	89%	33%
pH 7,0	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
pH 8,0	81,8%	100%	84,2%	81,8%	75%	100%	100%
pH 9,0	0%	0%	0%	0%	0%	100%	67%

Crecimiento: pH	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
pH 4,5	0%	0%	0%
pH 5,5	1,5%	0%	10%
pH 6,5	50%	69%	81%
pH 7,0	100%	100%	100%
pH 8,0	75%	100%	100%
pH 9,0	0%	23%	95%

Es significativo que el 100% de las cepas aisladas en Binningup crecieran a pH 9 y además un 11% crecen a pH 5,5, es decir el rango de pH en el que pueden crecer es mucho más amplio que el del resto de los aislados. En general todas las cepas de Australia son muy tolerantes a pH alcalinos, si bien los aislados de Murdoch no pueden crecer a pH 5,5 y crecen en un rango de pH muy similar al de las cepas tipo estudiadas.

Las cepas aisladas en España, por el contrario, son las menos tolerantes a condiciones de pH alcalinas, de hecho sólo un 75% de las cepas españolas crecieron a pH 8 y ninguna lo hizo a pH 9 (Tabla 21).

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en trabajos similares para aislados que pertenecen al género *Micromonospora*. El rango de pH para este género se establece entre 5,0 y 9,5, por tanto concuerda con nuestros resultados.

Los resultados individuales de crecimiento en diferentes condiciones de pH, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 23, 24 y 25.

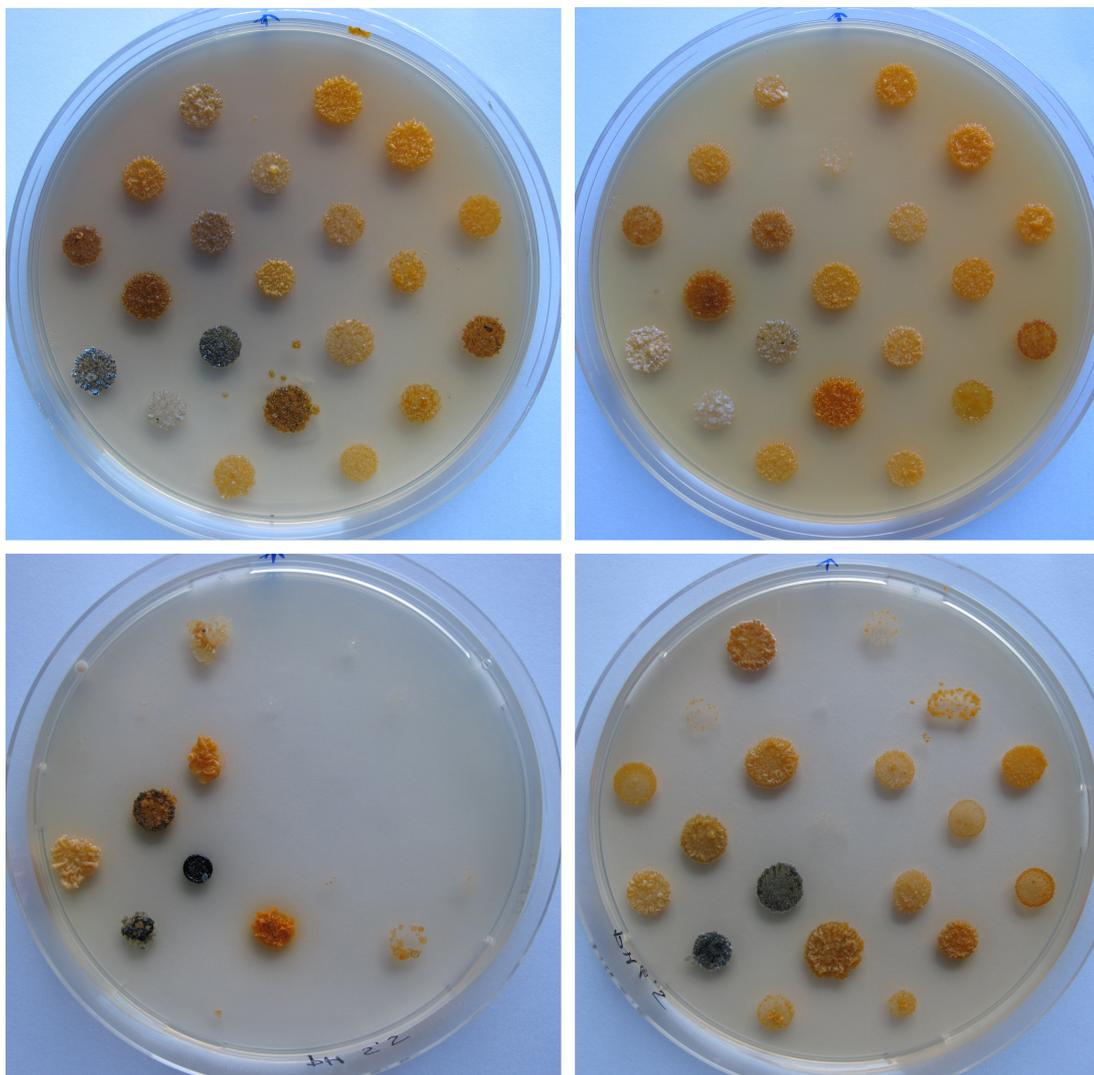


Figura 12. Ejemplos de crecimiento, morfología y pigmentación de las colonias de algunas de las cepas de este estudio cultivadas en diferentes condiciones de pH. De arriba abajo y de izquierda a derecha: pH 8, pH 9, pH 5 y pH 6.

### Salinidad

La capacidad para crecer en presencia de sal, en concentraciones relativamente elevadas, del género *Micromonospora* es notable, ya que todas las cepas estudiadas eran capaces de crecer en medio con un 1% de cloruro sódico y prácticamente todas, excepto 8, podían hacerlo en medios con el 3% de sal. Cabe reseñar que el crecimiento es más abundante cuando utilizamos medios suplementados con un 1% de NaCl, que en los medios de cultivo habituales (Tabla 22 y figura 13).

Tabla 22. Resumen de los resultados de crecimiento en medios con diferente concentración de NaCl, de los aislados agrupados según su origen y las cepas tipo de las especies del género *Micromonospora*, seleccionadas para este estudio.

Crecimiento Cloruro sódico	Cepas de Aldearubia	Cepas de Babilafuente	Cepas de Palaciosrubios	Cepas de Tormes	Cepas de San José	Binningup (Harvey, WA)	Murdoch University
NaCl 1,0 %	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
NaCl 3,0 %	95,5%	100%	78,9%	81,8%	75%	50%	33%
NaCl 5,0 %	9,9%	67%	5,3%	27,3%	0%	0%	0%
NaCl 7,0 %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
NaCl 9,0 %	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Crecimiento Cloruro sódico	Cepas España	Cepas Tipo	Cepas W. Australia
NaCl 1,0 %	100%	100%	100%
NaCl 3,0 %	88,2%	62%	38%
NaCl 5,0 %	20,6%	15%	0%
NaCl 7,0 %	0%	0%	0%
NaCl 9,0 %	0%	0%	0%

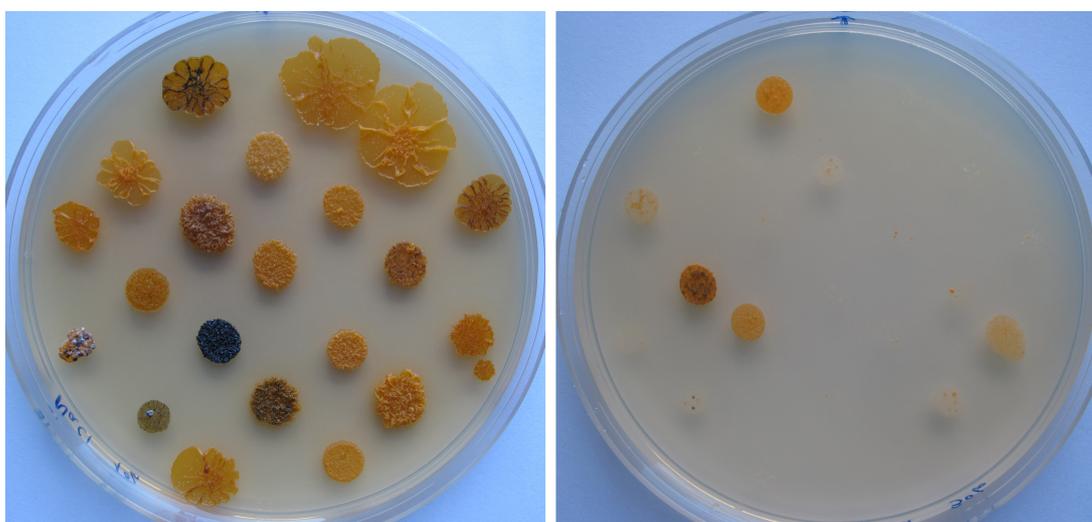


Figura 13. Ejemplos de crecimiento, morfología y pigmentación de las colonias de algunas de las cepas de este estudio cultivadas en diferentes concentraciones de NaCl. De izquierda a derecha: NaCl 1% y NaCl 3%.

Cuando analizamos el comportamiento de los aislados según su origen geográfico, observamos que las cepas españolas toleran mejor altas concentraciones de sal. Como media crecieron el 88,2% de las cepas en medios con el 3% de sal (más del 95% de los aislados en Aldearubia y el 100% de los aislados de Babilafuente) y más del 20% de las cepas en medios con el 5% de NaCl. La situación opuesta la encontramos en los aislados australianos ya que sólo el 38% de las cepas creció a concentraciones de 3% de sal y ninguna lo

hizo al 5%. El comportamiento de las cepas tipo utilizadas se sitúa en una posición intermedia en cuanto a su tolerancia a la salinidad.

En valores superiores al 5% de concentración salina, no se observó crecimiento en ninguna de las cepas estudiadas.

Estos resultados, igual que ocurre con los otros factores ambientales estudiados, son similares con los obtenidos en trabajos de investigación paralela, para aislados que pertenecen al género *Micromonospora* (Trujillo *et al.*, 2011). El rango de concentración de NaCl en el que este microorganismo puede crecer se establece entre el 0 y el 5 %, por tanto concuerda con nuestros resultados y no se han descrito cepas capaces de crecer en concentraciones más elevadas de sal.

Los resultados individuales de crecimiento en diferentes condiciones de concentración de NaCl, de todas las cepas de este estudio, se encuentran recogidas en las tablas 23, 24 y 25.

Tabla 23. Producción de catalasa y oxidasa y crecimiento en diferentes condiciones ambientales (temperatura, pH y concentración de NaCl) de las cepas aisladas de Aldearrubia (AL) y Babilafuente (ALF b)

Producción Crecimiento (T, pH, NaCl)	AL 1	AL 2	AL 3	AL 4	AL 6	AL 7	AL 8	AL 11	AL 12	AL 13	AL 14	AL 16	AL 17	AL 18	AL 19	AL 20	AL 21	AL 23	AL 25	AL 27	AL 28	AL 29	ALF b1	ALF b2	ALF b3	ALF b4	ALFb5	ALF b6	ALF b7	ALF b10	ALF b11	ALF b12	ALF b13	ALF b14		
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidasa	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
T 40C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T 120C	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	3	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
T 200C	2	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3	1	3	3	3	2	3	2	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3
T 370C	3	2	3	3	2	2	3	3	3	3	2	1	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
T 450C	2	2	2	4	1	2	3	3	1	1	1	0	0	3	0	0	0	3	2	2	1	3	0	3	3	3	3	3	4	3	3	3	1	3	2	4
pH 4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 5,5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 6,5	2	1	0	2	0	2	2	2	2	1	0	2	0	2	1	1	0	2	1	1	1	3	0	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3	0	3	3
pH 8,0	1	1	3	4	3	3	2	3	3	3	0	3	0	0	3	2	2	1	3	0	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3
pH 9,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 1,0 %	2	2	3	3	3	3	2	3	3	3	4	2	4	2	2	4	2	2	1	2	2	3	2	2	3	3	3	3	4	3	2	2	2	3	3	3
NaCl 3,0 %	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	0	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	2	2	3	3	2	2	1	2	1	3	3
NaCl 5,0 %	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	1	0	1	1
NaCl 7,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 9,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Actividad enzimática: negativo -, positivo +.

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

Tabla 24. Producción de catalasa y oxidasa y crecimiento en diferentes condiciones ambientales (temperatura, pH y concentración de NaCl) de cepas aisladas de Palacios Rubios (ALF pr.), Rio Tormes (ALF) y San José (ALF r)

Producción Crecimiento (T, pH, NaCl)	ALF pr2	ALF pr2c	ALF pr4	ALF pr4c	ALF pr6	ALF pr7	ALF pr14	ALF pr14c	ALF pr15	ALF pr18a	ALF pr18b	ALF pr18c	ALF pr19a	ALF pr20	ALF pr22	ALF pr23a	ALF pr29c	ALF pr36	ALF pr36c	ALF 1	ALF2	ALF 3	ALF 4	ALF 5	ALF 6	ALF 7	ALF 8	ALF 9	ALF 10	ALF 11	ALF r3	ALF r4	ALF r5	ALF r6		
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidasa	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
T 40C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T 120C	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T 200C	3	1	3	3	3	3	3	3	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4
T 370C	3	1	3	3	2	3	3	3	3	1	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	2	3	1	3	3	3	2	4	
T 450C	0	0	0	0	3	0	0	0	3	1	2	0	3	0	0	2	2	2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	0	3
pH 4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 5,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 6,5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	3
pH 8,0	3	0	2	2	2	3	3	3	2	0	3	2	3	3	3	3	3	3	0	2	2	0	2	2	2	2	2	3	3	2	0	0	3	3	3	3
pH 9,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 1,0 %	3	1	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	1	3	2	3	3	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3
NaCl 3,0 %	1	0	2	3	0	2	1	2	2	0	2	2	1	2	2	1	2	0	1	2	0	3	2	2	1	1	2	2	2	0	0	2	2	2	2	2
NaCl 5,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 7,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 9,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Actividad enzimática: negativo -, positivo +.

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

Tabla 25. Producción de catalasa y oxidasa y crecimiento en diferentes condiciones ambientales (temperatura, pH y concentración de NaCl) de los aislados Binnigunp (AMSO), Murdoch University (Atrum) y cepas tipo de las especies seleccionadas del género *Micromonospora*

Producción Crecimiento (T, pH, NaCl)	AMSO 01	AMSO 03	AMSO 05	AMSO 06	AMSO 07	AMSO 08	AMSO 09	AMSO 10	AMSO 11	AMSO 12	AMSO 13	AMSO 14	AMSO 15	AMSO 16	AMSO 17	AMSO 18	AMSO 19	AMSO 20	Atrum 1	Atrum 11	Atrum 12	<i>M. aurantiaca</i>	<i>M. aurantinigra</i>	<i>M. chokoriensis</i>	<i>M. coriariae</i>	<i>M. coxensis</i>	<i>M. eburnea</i>	<i>M. echinospora</i>	<i>M. endolithica</i>	<i>M. lupini</i>	<i>M. matsumotoense</i>	<i>M. olivasterospora</i>	<i>M. saelicesensis</i>	<i>M. viridifaciens</i>	
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Oxidasa	-	-	-	+	-	-	+	+	w	+	+	-	w	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
T 40°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T 120°C	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0
T 200°C	2	2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
T 370°C	3	4	3	0	1	3	3	2	1	2	2	2	3	3	2	2	1	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3
T 450°C	3	3	3	0	1	3	1	2	0	0	0	3	3	3	2	1	1	3	2	1	0	3	3	1	1	2	3	2	2	1	2	2	1	2	3
pH 4,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 5,5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH 6,5	3	3	3	2	2	3	0	2	2	3	2	2	3	2	1	0	2	3	0	3	0	3	3	0	0	2	2	2	0	2	2	2	2	0	2
pH 8,0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
pH 9,0	3	2	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	0	0	0	0	
NaCl 1,0 %	3	4	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	3	2	3	3	3	4	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
NaCl 3,0 %	3	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	1	2	2	1	0	2	1	0	0	1	2	0	3	3	
NaCl 5,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
NaCl 7,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NaCl 9,0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Actividad enzimática: negativo -, positivo +.

Datos de crecimiento: Sin crecimiento: 0, crecimiento débil: 1, crecimiento positivo: 2, crecimiento abundante: 3 y crecimiento muy abundante: 4.

## Análisis numérico

La taxonomía numérica (Sneath & Sokal, 1973) consiste en el agrupamiento de las características fenéticas mediante análisis multivariante de todas las observaciones y los caracteres analizados para cada cepa. En este apartado se ha realizado el análisis de todos los datos expuestos previamente de forma pormenorizada e individual, lo que nos permite obtener una visión globalizada y el agrupamiento por similitud de las cepas estudiadas.

Para este estudio se han agrupado todos los resultados obtenidos de todos los parámetros analizados y todas las cepas estudiadas y se han normalizado con la siguiente correspondencia:

Todos los valores que indicaban crecimiento, que aparecen en las tablas como positivo, abundante o muy abundante, se les ha designado el valor 1. En la matriz se asigna valor 0 a los datos que indican falta de crecimiento o de producción y en los casos en los que el crecimiento era débil o datos dudosos se asignó el valor 2.

Con esta tabla de datos multivariante se elaboró una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Jaccard y con estos resultados se generó un dendrograma del análisis de cluster por UPGMA.

Se observan 3 grandes agrupamientos en el dendrograma de la figura 26 que separan las cepas estudiadas por su localización geográfica. Se estudiaron un total de 81 cepas con 77 parámetros cada una.

Este resultado no concuerda con los datos obtenidos a partir del gen *rrs*, ya que las características fenotípicas pueden ser adquiridas por presión ambiental y no están ligadas al gen ribosómico.

La diferenciación en este caso es mucho más clara que en el árbol del gen del 16S ya que los tres grupos principales están muy bien delimitados, además de contener cepas muy próximas geográficamente. En el caso del Cluster A, todas las cepas que incluye se tratan de aislados en Australia y en él están todas las cepas australianas salvo una.

En el segundo Cluster, el B, encontramos principalmente cepas aisladas de Palacios Rubios, casi todos los aislados de esta localización se encuentran en el grupo B. También la mayoría de los aislados del Tormes y San José (ambas localizaciones dentro de Salamanca) se engloban en este cluster.

Por último, el Cluster C encontramos la gran mayoría de las cepas procedentes de Babilafuente y Aldearrubia.

Una de las cepas más interesantes es la ALFr3, que se encuentra bastante alejada del resto y no forma parte de ninguno de los grupos antes mencionados. Por otra parte, también encontramos una de las cepas australianas alejada del cluster que le correspondería.

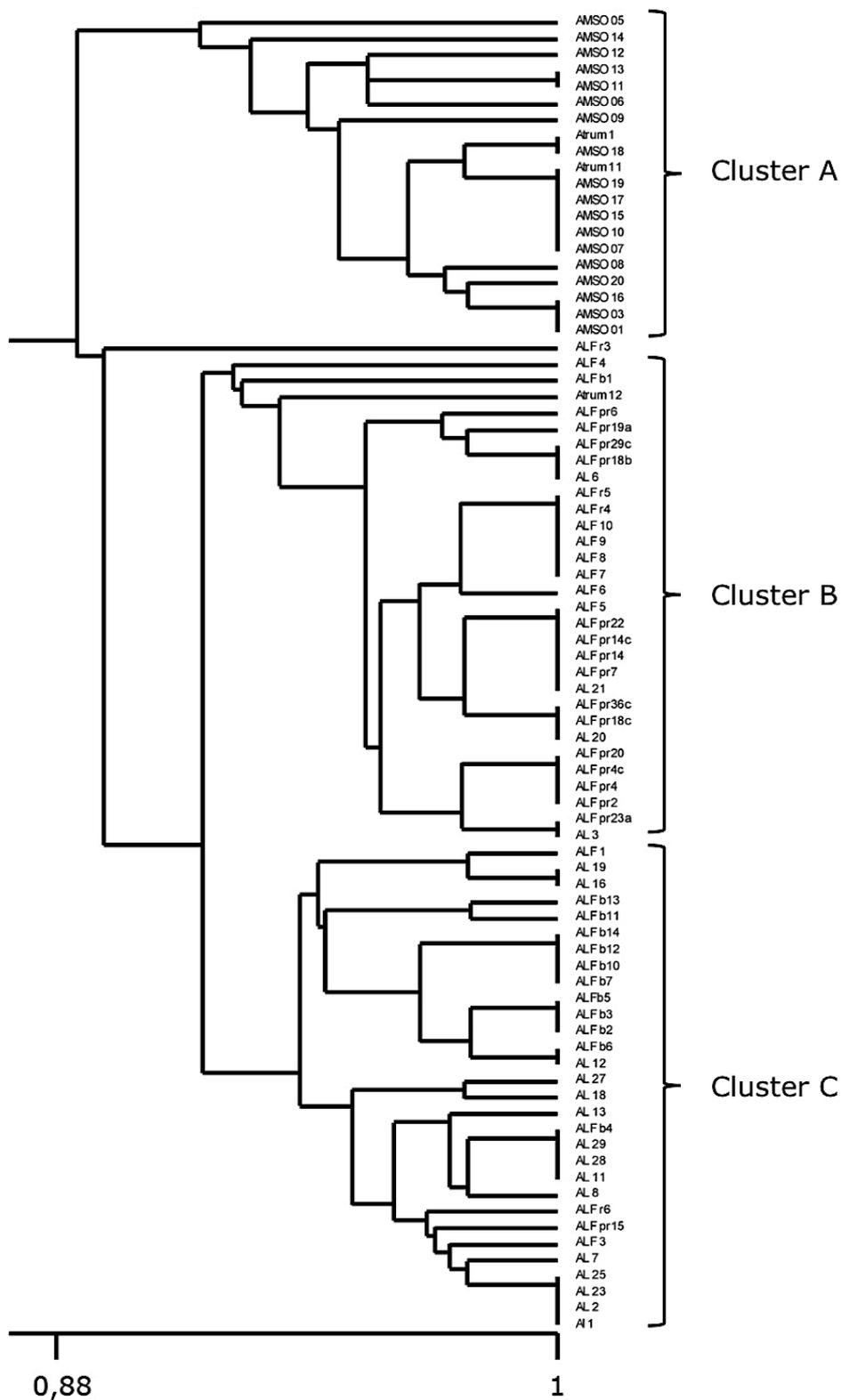


Figura 26. Fenograma de todas las observaciones de las pruebas fenotípicas. La matriz se ha generado mediante el coeficiente de Jaccard y el dendrograma con UPGMA.

Estos resultados indican la posibilidad de que estas cepas hayan adquirido nuevas cualidades fenotípicas por transferencia horizontal de genes gracias a otros microorganismos que sí sean endémicos de cada localización geográfica. Vemos que la diferenciación entre los aislados australianos y el resto es mayor y más radical que entre los otros dos grupos donde aislados de diferentes localizaciones españolas se mezclan en ambos, quizá por la cercanía de las localizaciones de aislamiento.

Este tipo de análisis numérico es interesante ya que permite estudiar de forma visual las características fenotípicas de cada cepa, más fácilmente que con los datos crudos e incluso los porcentajes mostrados anteriormente. Sin embargo, es importante recordar que este tipo de dendrogramas no expresan la distancia filogenética sino diferencias fenotípicas en cuanto a capacidades degradativas, de utilización de diferentes sustratos como fuente de carbono y resistencias o tolerancia a parámetros ambientales que no implican un mayor grado de cercanía a nivel filogenético, sino de evolución adaptativa, parte de la cual puede responder a su capacidad para intercambiar genes con otros microorganismos del entorno.

## Discusión

Los diferentes estudios taxonómicos llevados a cabo con los aislados españoles de *Micromonospora* parecen indicar que, aunque la secuenciación del gen ribosómico del 16S no es suficiente para una identificación inequívoca, aún es necesario señalar unas pautas para comparar las especies del género. La secuenciación del *gyrB* podría ser de ayuda si se generaliza y las bases de datos se supervisan correctamente, pero ni siquiera con la secuenciación de ambos genes existen garantías de que la identificación sea correcta. Es necesario describir un listado con varios genes que cumplan unas características parecidas a las del *rrs* para su secuenciación. La tendencia en otros grupos microbianos apunta también en ese sentido pero no hay acuerdo general sobre el número de genes necesarios, la identidad de dichos genes y la extensión mínima de las zonas secuenciadas en cada una de ellos.

El estudio taxonómico de los aislados en diferentes localizaciones geográficas nos llevó a la conclusión de que, pese a la enorme distancia y diferencias entre los lugares de aislamiento, todas las cepas se distribuían de igual forma en el árbol filogenético del 16S sin destacar ninguna rama que contuviera mayoritariamente aislados de una localización concreta.

En los estudios fenotípicos la situación es la opuesta. Los aislados australianos muestran tolerancia a un rango más amplio de pH que los aislados españoles, mientras que estos son más resistentes, algunos incluso crecen mejor, a altas concentraciones de sal, pudiendo llegar a crecer hasta a un 5% en algunas cepas. Existen otros ejemplos de diferencias entre las cepas australianas y las

españolas como la utilización de ciertas fuentes de carbono, como la trehalosa.

Estos hechos nos indican que no hay micromonosporas endémicas australianas, puesto que las características de los suelos de Western Australia son tan diferentes y pese a que la ausencia de *Sinorhizobium*, debería haber dado lugar a que *Micromonospora* de características muy especiales se asociaran a leguminosas. Sin embargo, la proximidad de las cepas australianas y españolas nos lleva a pensar que estas fueron importadas desde Europa inadvertidamente en restos vegetales, suelo o semillas.

Las diferencias fenotípicas entre aislados parecen indicar que existe una evolución adaptativa en la que seguramente jueguen un papel relevante los mecanismos de transferencia horizontal de genes entre *Micromonospora* y otros microorganismos endémicos de cada localización.

# Capítulo 2:

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  
DE RHIZOBIA OBTENIDOS DE  
NÓDULOS DE ALFALFA.



## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE RHIZOBIA OBTENIDOS DE NÓDULOS DE ALFALFA

### Introducción

En el proceso de aislamiento de cepas de *Micromonospora* a partir de nódulos de alfalfa en las placas de YMA (Capítulo 1), aparecían de forma sistemática colonias mucosas de crecimiento rápido típicas de los *Rhizobia*. Algunas de estas colonias procedían de nódulos de plantas de *M. sativa* que crecían, de forma espontánea, en parcelas en las que este cultivo había sido sustituido por patata. Las técnicas agronómicas para el cultivo de ese tubérculo implican una fertilización nitrogenada y una carga de pesticidas muy intensa. Bajo estas condiciones, las plantas que se recogieron seguían teniendo nódulos, y se decidió aislar, además de colonias tipo *Micromonospora*, aquellas que tenían una morfología característica de *Sinorhizobium* para comprobar si la presión selectiva ejercida por las condiciones de cultivo afecta de alguna manera a las cepas noduladoras.

Los microorganismos capaces de nodular especies del género *Medicago* pertenecen mayoritariamente al género *Sinorhizobium* (sin. *Ensifer*) (Staley *et al.*, 2005), aunque también se han encontrado bacterias del género *Rhizobium* (van Berkum *et al.*, 1998) que pertenece al orden *Rhizobiales* de la clase *alpha-Proteobacteria* y, dentro del mismo, a la familia *Rhizobiaceae*. La familia *Rhizobiaceae* engloba especies de crecimiento rápido de bacterias que pueden ser saprobias o bien establecer simbiosis con plantas y animales. Las especies que interaccionan con plantas actualmente se integran en tres géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Shinella*. Las bacterias del género *Sinorhizobium* son bacilos aerobios Gram negativos con flagelos que les confieren movilidad y suelen presentar gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. A nivel macroscópico, forman colonias circulares blancas translúcidas con un aspecto húmedo y mucoso. Dentro de este género hay dos especies que nodulan *Medicago*, *S. meliloti*, que es el endosimbionte mayoritario de alfalfa (*M. sativa*), y *S. medicae*, que nodula minoritariamente este hospedador (Zribi *et al.*, 2005), (Silva *et al.*, 2007).

La identificación de los miembros de la familia *Rhizobiaceae* está basada necesariamente en la secuenciación de genes, puesto que no hay información fenotípica que permita la diferenciación e identificación de especies de *Rhizobia*. Aunque la secuenciación de genes es actualmente un método factible, sin embargo, sigue siendo lento para ser utilizado con un amplio número de cepas, en consecuencia se han buscado otros métodos que permitan la identificación

rápida y fiable de este grupo de bacterias.

Por ello, nos planteamos el siguiente objetivo: Investigar la variabilidad genética y la capacidad simbiótica de las cepas de *Sinorhizobium* capaces de nodular alfalfa en estas condiciones de cultivo y determinar la utilidad de la técnica MALDI TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) para su identificación.

## **Aislamiento y conservación**

### Muestreo

Para el aislamiento de las cepas de *Sinorhizobium*, la zona de muestreo elegida fue la parcela cercana a Palacios Rubios por las condiciones en las que estas plantas habían crecido. Todos los aislados de este estudio fueron obtenidos, como ya se ha comentado en la introducción de este capítulo, de plantas de alfalfa que habían rebrotado en un campo actualmente sembrado con patata, con un alto impacto por el uso de agroquímicos. Estas particularidades causaron la decisión de estudiar las características de las cepas capaces de nodular en condiciones de cultivo tan desfavorables.

### Aislamiento

Durante el proceso de aislamiento de las cepas del género *Micromonospora* descrito en el capítulo anterior y de las mismas placas, se tomaron colonias mucosas típicas de los *Rhizobia* para su posterior estudio. Los nódulos tomados de *Medicago sativa* habían sido esterilizados en superficie con cloruro de mercurio y disgregados con una varilla de cristal que se utilizó para hacer una siembra en estría en placas de YMA.

Las placas se incubaron a 28 °C (material y métodos), al cabo de cuatro o cinco días aparecieron colonias translúcidas blanquecinas y mucosas, morfología característica de las colonias de los *Rhizobia*. Estas colonias fueron aisladas en placas con medio YMA para su posterior estudio. Se seleccionaron todas las colonias de este tipo que crecieron en las placas y se reaislaron en placas con el mismo medio.

### Conservación

Para conservar las cepas seleccionadas, se preparó una suspensión densa de las bacterias, con glicerol al 20% como agente crioprotector, se depositaron en criotubos y se almacenaron a 80°C bajo cero. Este método se ha demostrado eficaz para la conservación de los *Rhizobia* por largos periodos de tiempo. Simultáneamente, varios de estos criotubos de cada cepa, se mantuvieron a

20°C bajo cero para uso en el laboratorio, y para el manejo rutinario de estos microorganismos se ha usado el subcultivo seriado, que en este tipo de microorganismos es la técnica habitual.

### Cepas de *Rhizobia* aisladas

Se aislaron, en cultivo puro, 20 cepas con en aspecto macroscópico característico del microsimbionte de la alfalfa, *Sinorhizobium*, en Palacios Rubios en la provincia de Salamanca.

A las cepas aisladas se las denominó con las siguientes siglas: Spr2, Spr4, Spr6, Spr7, Spr11, Spr12, Spr14, Spr16, Spr18, Spr19, Spr28, Spr29, Spr31, Spr32, Spr35, Spr38, Spr39, Spr71, Spr81 y Spr91.

## **Estudios taxonómicos**

Para el análisis filogenético de cepas del género *Sinorhizobium* se ha utilizado el gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, que como se ha mencionado en el capítulo anterior, es el más utilizado en este tipo de estudios. Además de estos estudios se analizaron sus características simbióticas de infectividad y efectividad.

En este apartado no se realizaron estudios fenotípicos, puesto que el valor de estas pruebas en la identificación de especies de la familia *Rhizobiaceae* y concretamente en *Sinorhizobium* es muy limitado (Ferreira *et al.*, 2011).

Por el contrario, y dado el objetivo de este estudio, se ha utilizado la técnica MALDI TOF como alternativa a los estudios fisiológicos y bioquímicos en la identificación de las cepas de este grupo.

### Análisis de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S

Teniendo en cuenta que el número de cepas de *Sinorhizobium* aisladas para este estudio no es muy elevado (20 cepas) se decidió secuenciar el gen *rrs* en todas las cepas aisladas. Como ya se ha comentado, este gen es muy útil para determinar la posición filogenética de cada cepa y en el caso de *Sinorhizobium* ha sido ampliamente utilizado a lo largo de los años, pese a que recientes estudios parecen abogar por el uso adicional de otro tipo de genes, debido a que el *rrs* puede que no refleje fielmente la filogenia bacteriana, debido a posibles transferencias laterales o recombinaciones del gen (Martens *et al.*, 2007).

El protocolo para la extracción del ADN puede encontrarse en material y métodos. Para la amplificación se utilizó el kit de Sigma REExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit siguiendo las indicaciones del fabricante y dos oligonucleótidos diseñados para amplificar este gen: SF1 y 1522R (material y métodos). Para la

secuenciación se usaron 5 oligonucleótidos diferentes: X1, X3, Z4, X5, X7 y X11 (material y métodos).

La comparación de las secuencias obtenidas se realizó, igual que con las de *Micromonospora*, en el servidor EzTaxon y se cotejó con una segunda comparación realizada en el servidor del NCBI, usando la opción BLAST. En ambas bases de datos obtuvimos resultados semejantes.

Las secuencias fueron alineadas usando el programa ClustalX (Thompson, 1997), las distancias se calcularon de acuerdo con el modelo de Kimura dos-parámetros (Kimura, 1980) y para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizó el método Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) con el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011).

Como podemos observar en la figura 1, todas las cepas aisladas para este estudio pertenecen al género *Sinorhizobium* y se agrupan entorno a las cepas tipo de *S. meliloti* y *S. kummerowiae*. De acuerdo con las secuencias del gen no hemos observado gran diversidad entre los aislados tipo *Rhizobia*, al contrario de lo que ocurre con los aislados pertenecientes a *Micromonospora* que tienen una diversidad genotípica mucho mayor.

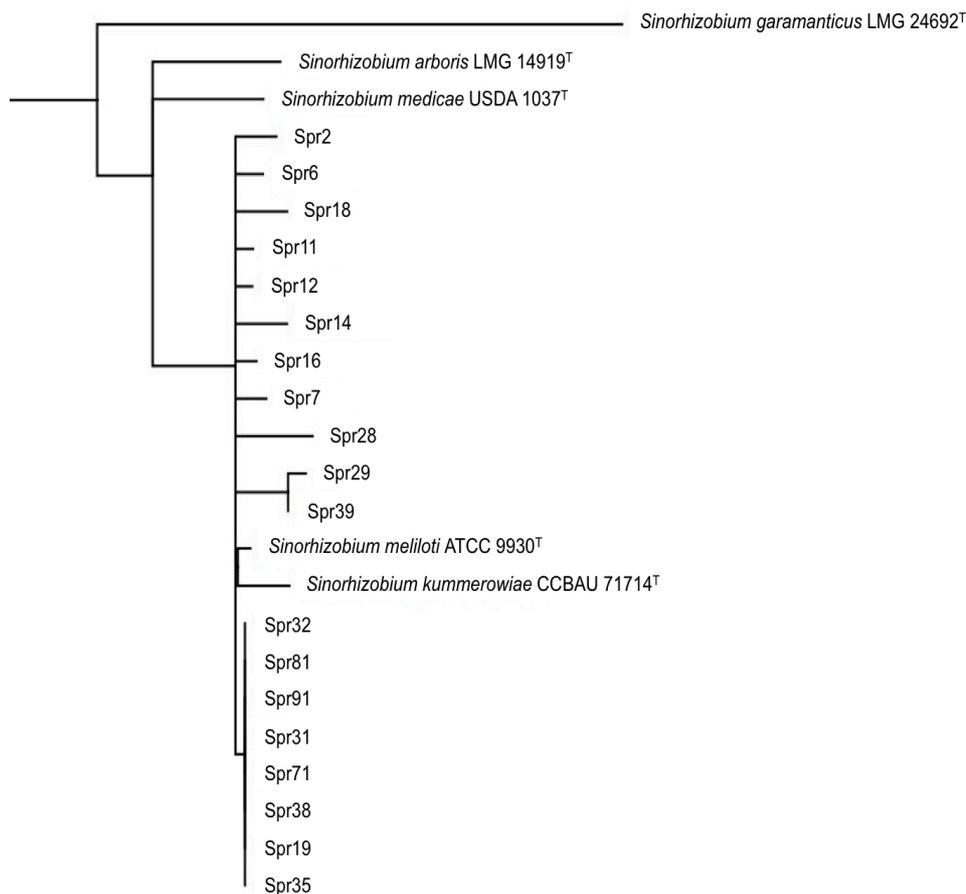


Figura 1. Árbol filogenético construido con el método Neighbour-Joining a partir de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S. Detalle de la ramificación en la que se agrupan todas las cepas de este estudio.

Tabla 1. Porcentajes de similitud entre las cepas de *Sinorhizobium* de este estudio y las cepas tipo de las especies más próximas.

CEPA	Especie mas próxima	Similitud
Spr2	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr6	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr7	<i>Sinirhizobium meliloti</i>	100%
Spr11	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr12	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr14	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,93%
Spr16	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,93%
Spr18	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	99,93%
Spr19	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr28	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr29	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr31	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr32	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr35	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr38	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr39	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr71	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr81	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%
Spr91	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	100%

Estos resultados son concordantes con los de la tabla 1, en la que se muestran las comparaciones realizadas por medio de EZ Taxon, entre todos los aislados de este estudio y las especies tipo más próximas. En esta tabla se puede comprobar el porcentaje de similitud entre las secuencias del gen ARNr16S de ambas cepas. La mayoría tienen como especie más cercana a la especie tipo de *S. meliloti* y los porcentajes de similitud son en todos los casos muy altos y oscilan entre la identidad total (100% de similitud) y el 99,93% como porcentaje más bajo.

### MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) es una técnica relativamente novedosa, en la que un co-precipitado de una matriz que absorbe luz ultravioleta y una biomolécula (en este caso un extracto de una colonia cultivada en Ty durante 24 horas) es irradiada con un pulso laser un nanosegundo. La mayor parte de la energía del láser es absorbida por la matriz, lo que evita fragmentaciones no deseadas de la biomolécula. Las biomoléculas ionizadas son aceleradas en un campo eléctrico y entran en el tubo de vuelo. Durante el vuelo en este tubo, diferentes moléculas son separadas dependiendo de su relación masa/carga y alcanzan el detector a

distintos tiempos. De esta forma cada molécula tiene una señal específica distintiva (<http://www.microbiology.science.ru.nl/tech/malдитof/>).

Esta técnica permite la identificación de microorganismos basándose en la composición proteica de los mismos, la cual permite analizar los espectros obtenidos por el MALDI-TOF que detecta las proteínas mayoritarias que se encuentran en la célula. Estos espectros son característicos de cada microorganismo y permite diferenciarlos de los demás.

Cuándo se comparan estos espectros con una base de datos podemos identificar bacterias a nivel de especie, o a veces, incluso de subespecie. Pese a que esta técnica nació como un sistema de diagnóstico clínico, construyendo bases de datos, lo más completas posibles para cada grupo microbiano, se pueden identificar bacterias aisladas de muestras ambientales, con excelentes resultados (Peix *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio se construyó una base de datos con todas las especies tipo de la familia *Rhizobiaceae* para MALDI-TOF una vez se comprobó el potencial y fiabilidad de esta técnica y se utilizó para identificar los nuevos aislados con excelentes resultados (Ferreira *et al.*, 2011).

Debido a que *Sinorhizobium* produce suficiente exopolisacárido como para que interfiera en la lectura del MALDI-TOF si se utiliza la colonia sin procesar en la placa, se realizó una extracción previa. Es un método sencillo en el que se trata la muestra con ácido fórmico y acetonitrilo (materiales y métodos). Una vez extraído se ponen 1,2  $\mu$ l en uno de los pocillos de la placa de lectura del MALDI y se cubre con una matriz compuesta por ácido  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnámico. Para cada una de las muestras se hicieron tres repeticiones en tres pocillos consecutivos de la placa.

Los Resultados obtenidos con MALDI-TOF MS, son muy similares a los que se obtuvieron con la secuenciación del gen *rrs*. En el árbol filogenético construido tras el análisis de las secuencia, todas nuestras cepas se sitúan flanqueando, muy próximas, a las especies tipo de *S. meliloti* y *S. kummerowiae*. Estas dos especies de *Sinorhizobium*, están extremadamente próximas a nivel de las secuencias de este gen y como consecuencia se sitúan juntas en el árbol generado.

Esta situación se reproduce cuando observamos los resultados de la tabla 2.

Tabla 2. Identificación de las cepas aisladas mediante la técnica MALDI-TOF MS.

Analite name	Analite ID	Organism (best match)	Score value	Organism (2 <sup>nd</sup> best match)	Score value
A1	Ecoli	<i>E. coli</i>	2,094	<i>E. coli</i>	2,068
G16-18	Spr2	<i>S. kummerowiae</i>	2,191-2,403	<i>S. meliloti</i>	2,045-2,156
G19-21	Spr4	<i>S. kummerowiae</i>	2,263-2,194	<i>S. meliloti</i>	2,216-2,067
G22-24	Spr6	<i>S. kummerowiae</i>	2,3-2,208	<i>S. meliloti</i>	2,134-2,119
H1-3	Spr7	<i>S. kummerowiae</i>	2,253-2,139	<i>S. meliloti</i>	2,15-2,038
H10-12	Spr14	<i>S. kummerowiae</i>	2,279-2,185	<i>S. meliloti</i>	2,066-1,985
H13-15	Spr16	<i>S. kummerowiae</i>	2,231-2,206	<i>S. meliloti</i>	2,059-2,033
H16-18	Spr18	<i>S. kummerowiae</i>	2,351-2,19	<i>S. meliloti</i>	2,111-2,026
H19-21	Spr19	<i>S. kummerowiae</i>	2,117-2,111	<i>S. meliloti</i>	2,125-1,961
H22-24	Spr28	<i>S. kummerowiae</i>	2,32-2,107	<i>S. meliloti</i>	2,207-1,89
H4-6	Spr11	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,283-2,041	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,014-1,895
H7-9	Spr12	<i>S. meliloti</i>	*-2,005	<i>S. kummerowiae</i>	*-1,944
I1-3	Spr29	<i>S. kummerowiae</i>	2,352-2,202	<i>S. meliloti</i>	2,047-1,852
I10-12	Spr32	<i>S. kummerowiae</i>	2,03-1,753	<i>S. meliloti</i>	1,963-1,744
I13-15	Spr35	<i>S. kummerowiae</i>	2,305-2,164	<i>S. meliloti</i>	2,077-1,992
I16-18	Spr39	<i>S. kummerowiae</i>	2,337-2,22	<i>S. meliloti</i>	2,141-1,879
I19-21	Spr38	<i>S. kummerowiae</i>	2,385-2,175	<i>S. meliloti</i>	2,174-1,895
I22-24	Spr71	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,153-2,084	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,083-1,852
I4-6	Spr81	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,326-2,212	<i>S. kummerowiae, meliloti</i>	2,231-2,105
I7-9	Spr91	<i>S. kummerowiae</i>	2,385-2,213	<i>S. meliloti</i>	2,159-1,983

■ Identificación fiable a nivel de especie      ■ Identificación fiable a nivel de género  
■ Identificación no fiable

Conocemos que con esta técnica la identificación, las cepas tipo de *S. kummerowiae* y *S. meliloti* tienen una gran similitud lo que hace que sean casi indistinguibles.

Por ese motivo, muchas de las cepas de este estudio aparecen identificadas como *S. kummerowiae* como mejor opción, *S. meliloti* en segundo lugar y en algunos casos, Spr11, Spr71 y Spr81, no hace distinción entre las dos especies.

De acuerdo con los resultados obtenidos, tanto tras el análisis de las secuencias del gen *rrs* y la construcción del árbol filogenético (Figura 1 y tabla 2) como con los resultados de MALDI-TOF MS, se infiere una gran similitud entre las cepas aisladas de Palacios Rubios, todas son muy semejantes entre sí, se identifican y se agrupan en torno a la pareja *S. meliloti* - *S. kummerowiae*. Pero, según la tabla 1, en la que se comparan las secuencias del gen de ARNr 16S, la especie más cercana es siempre *S. meliloti*.

## Eficiencia simbiótica

De acuerdo con los objetivos que nos habíamos planteado, se llevó a cabo un experimento en invernadero para determinar la eficacia simbiótica de las cepas aisladas. Para este estudio se eligieron 14 cepas y se utilizó como control *S. meliloti* 1021.

Para realizar este ensayo se germinaron las semillas de alfalfa, esterilizadas en superficie (material y métodos), en un semillero con vermiculita también estéril. Las plántulas fueron trasplantadas a conos de 350 ml, con suelo tinalizado (pH 7,2).

La inoculación se realizó 5 días tras el trasplante. Se utilizó 1 ml de una suspensión de cada cepa de 5 en la escala de McFarland, obtenida a partir cultivos en medio sólido tras 5 días de incubación a 28 °C. Las plantas se recolectaron 4 semanas después de la inoculación. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 2, 3 y 4. La significación respecto a todos los datos se obtuvo a partir de un ANOVA con test post-hoc LSD.

### Efecto sobre la nodulación

El número de nódulos fue relativamente homogéneo, la mayoría de las cepas incluida la *S. meliloti* 1021 produjeron un número de nódulos cercano a la media global del experimento que fue de 11,9 nódulos por planta (Figura 2).

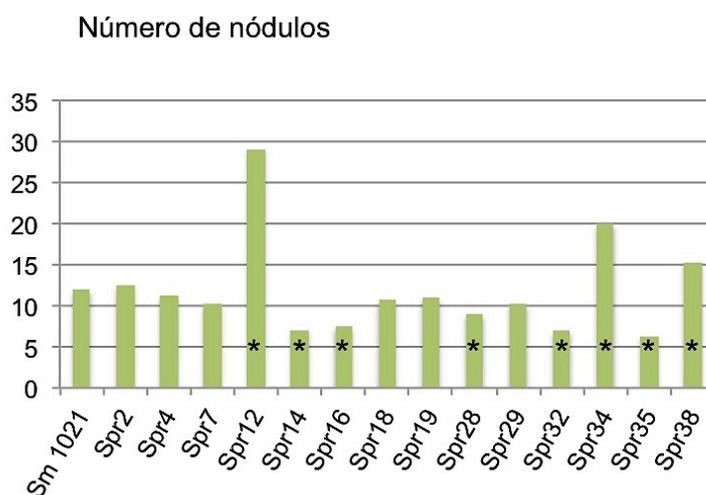


Figura 2. Número de nódulos de las raíces de alfalfa inoculadas con las distintas cepas de este estudio. Como control se ha usado la cepa 1021 de *S. meliloti*. \* Tratamientos estadísticamente significativos frente al control ( $p \leq 0,05$ ).

Sólo tres de las cepas estudiadas tenían un número de nódulos significativamente mayor que la 1021, las cepas 12, 34 y 38. Cinco cepas

produjeron un número de nódulos significativamente inferior al control. Las seis cepas restantes tenían un número de nódulos cercano a la media del control y no se hallaron diferencias significativas entre ellas.

Tras la recolección se analizaron los siguientes parámetros para medir la eficiencia simbiótica de las cepas de *Sinorhizobium* utilizadas en este estudio: Longitud y peso seco de la raíz (Figura 3) y longitud y peso seco del tallo (Figura 4). La longitud está expresada en centímetros y el peso seco en miligramos.

Estos parámetros nos dan una información parcial pero muy valiosa sobre su capacidad para promocionar el crecimiento de las plantas, que en este tipo de interacción se debe, fundamentalmente, a la fijación biológica de nitrógeno.

### Efecto sobre la raíz

De acuerdo con nuestros resultados las cepas de este estudio no parecen ejercer un efecto positivo sobre la longitud de la raíz de alfalfa. Encontramos diferencias significativas entre 8 de nuestras cepas y el control, pero son raíces de menor longitud. Sólo una cepa, la Spr38 incrementa de forma significativa la longitud de la raíz de la planta.

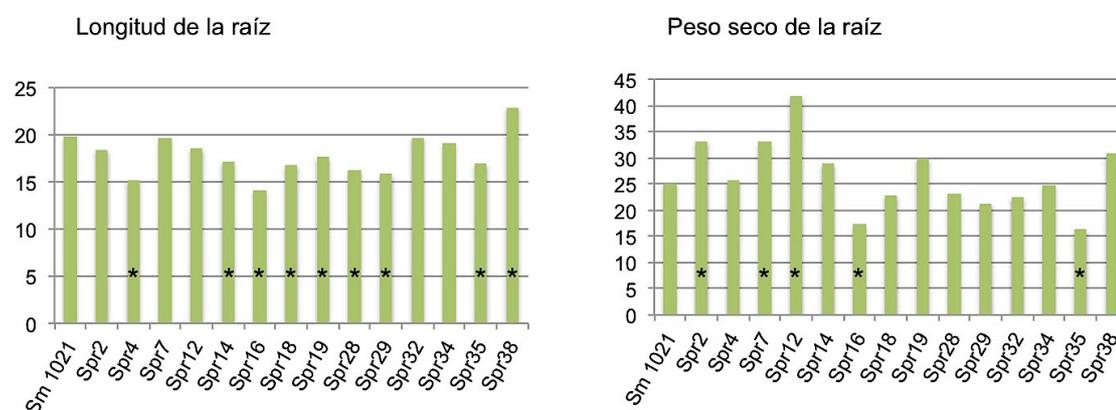


Figura 3. Longitud (cm) y peso seco (mg) de las raíces de alfalfa inoculadas con las distintas cepas de este estudio. Como control se ha usado la cepa 1021 de *S. meliloti*. \*Tratamientos estadísticamente significativos frente al control ( $p \leq 0,05$ ).

En el peso seco de la raíz tampoco existen diferencias marcadas, cuando se realiza un análisis global de los resultados. Sólo en tres experimentos las raíces tenían un peso significativamente mayor que el control, los inoculados con las cepas Srp2, Srp7, y Srp12. En dos ensayos ocurre lo contrario, las raíces son significativamente de menor peso y en el resto de los experimentos no se encontraron diferencias significativas.

### Efecto sobre el tallo

Los parámetros del tallo, longitud y peso seco, reflejan un efecto claramente positivo de la inoculación de las cepas aisladas en Palacios Rubios, cuando se comparan con el control. La mayoría de las cepas utilizadas presentan diferencias estadísticamente significativas tanto para la longitud como para el peso seco del tallo cuando las comparamos con la cepa 1021 de *S. meliloti*. En algunos casos casi duplica la media global de estos ensayos. Estos resultados nos indican que algunas de estas cepas pueden ser unos excelentes candidatos como inoculantes, especialmente si tenemos en cuenta su capacidad para nodular en las condiciones de campo ya descritas.

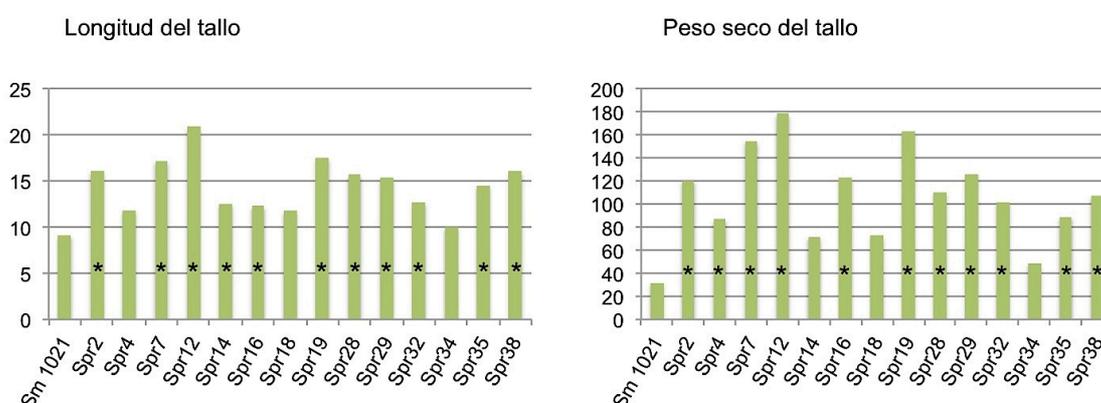


Figura 4. Longitud (cm) y peso seco (mg) de la parte aérea de alfalfa inoculadas con las distintas cepas de este estudio. Como control se ha usado la cepa 1021 de *S. meliloti*. \*Tratamientos estadísticamente significativos frente al control ( $p \leq 0,05$ ).

De entre todas las cepas estudiadas, los candidatos más prometedores, para ser usados en ensayos posteriores serían Spr7, Spr12 y Spr19.

La cepa Spr12 es especialmente interesante puesto que en los parámetros de mayor interés, encontramos diferencias positivas, estadísticamente significativas con el control y además los resultados de eficiencia simbiótica y capacidad de nodulación en términos absolutos también son los mejores.

De hecho en el estudio estadístico realizado, esta cepa presenta diferencias significativas con todas la demás cepas estudiadas en el número de nódulos, en el peso de la raíz y en el peso del tallo, con la única excepción, en este caso, de la cepa Spr7.

## Discusión

El estudio de las cepas de *Sinorhizobium* aisladas de una parcela agrícola de Palacios Rubios nos ha permitido profundizar en el conocimiento de la diversidad y la eficiencia simbiótica de estas cepas aisladas de alfalfa crecidas en unas

condiciones, en cuanto a la práctica agrícola, poco usuales.

Los datos obtenidos muestran, que pese a que las plantas de las que se aislaron estas bacterias, hubieran crecido en contacto con plaguicidas y en parcelas adecuadamente abonadas para el cultivo de la patata, no ha habido sorpresas y el resultado ha sido el esperable en plantas de *Medicago sativa*: son noduladas por *Sinorhizobium meliloti*. Además, la diversidad encontrada es muy baja de acuerdo con los resultados de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S.

Los resultados del árbol filogenético obtenido con los resultados de las secuencias del gen *rrs* y los obtenidos por la técnica MALDI-TOF MS son muy similares lo que avala la utilidad de esta técnica para la identificación de cepas ambientales como ya ha sido demostrado por (Ferreira *et al.*, 2011).

Hay que destacar que la utilidad de esta técnica depende de la calidad de la base de datos que utilizemos, y ésta depende del número de cepas perfectamente caracterizadas e identificadas por otras vías, que debe de incluir inexcusablemente, todas las cepas tipo de las especies del grupo con el que se pretenda trabajar. La compilación de la base de datos de bacterias patógenas para el hombre ha sido realizada por una casa comercial, pero para los grupos de interés en otros campos como el de las bacterias que nodulan leguminosas, no existen bases de datos comerciales y han de ser elaboradas para cada caso concreto.

Por ello recientemente se ha elaborado una base de datos de todas las especies de la familia *Rhizobiaceae* (Ferreira *et al.*, 2011) que nos ha permitido comprobar que todas ellas se pueden diferenciar de acuerdo con sus perfiles de proteínas mediante MALDI-TOF MS. Las cepas tipo de *S. meliloti* y *S. medicae*, los dos endosimbiontes mayoritarios de la alfalfa, muy próximas filogenéticamente de acuerdo a sus genes ribosómicos 16S, se pueden diferenciar claramente utilizando esta metodología. Por lo tanto, la técnica MALDI-TOF MS permite la identificación segura de las cepas aisladas a partir de alfalfa que utilizando métodos genéticos implicaría la secuenciación y análisis de varios genes (Martens *et al.*, 2007). Puesto que la secuenciación todavía sigue siendo costosa en medios materiales, tiempo y esfuerzo y no es una técnica adecuada para la identificación de un gran número de aislados, especialmente si provienen de muestras ambientales, resulta evidente que la técnica MALDI-TOF MS, por sus características, es una excelente alternativa para la identificación de los *Rhizobia* aislados a partir de alfalfa, como se ha demostrado en este estudio.

Obviamente esto no ocurre en otros grupos bacterianos, como es el caso de *Micromonospora*, debido a que no existen bases de datos adecuadas que contengan todas las especies descritas de este género y hasta que no se compilen dichas bases de datos, el MALDI-TOF MS no es una alternativa para la identificación de estas bacterias.

Si comparamos los resultados de biodiversidad de *Sinorhizobium* con los descritos para *Micromonospora* en el capítulo 1, las diferencias son muy marcadas, en este caso la diversidad biológica encontrada es muy baja mientras

que en el caso de *Micromonospora* podemos encontrar una gran variedad de especies distintas dentro de una misma planta. La presión ambiental, en el caso de *Sinorhizobium*, ha seleccionado las cepas capaces de establecer simbiosis en esas condiciones, que de acuerdo con nuestros resultados, son todas de características genotípicas muy similares. Esto está de acuerdo con los resultados de otros estudios en alfalfa, ya que la variación entre cepas de *S. meliloti* aisladas en diferentes localizaciones geográficas en el gen ribosómico 16S es inferior al 0.05% (Talebi *et al.*, 2008).

Las cepas de *S. meliloti* pueden tener características simbióticas muy diferentes (Brunel *et al.*, 2006), como se ha podido apreciar en este estudio en donde tres de las cepas analizadas presentaron diferencias significativas en la efectividad en alfalfa con respecto a una cepa de referencia, la 1021, cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (Galibert *et al.*, 2001). Estos resultados nos han permitido seleccionar tres buenos candidatos como inoculantes para la alfalfa, aunque serán necesarios estudios posteriores para determinar si esta utilidad potencial se confirma en condiciones de práctica agronómica real y en consecuencia pudieran ser utilizadas para la formulación de biofertilizantes.

# Capítulo 3:

ESTUDIOS DE LA ACCIÓN PGPR DE  
*MICROMONOSPORA.*



## ESTUDIOS DE LA ACCIÓN PGPR DE *MICROMONOSPORA*

### Introducción

Las plantas, en su ambiente natural, tienden a mantener estrechas interacciones con diferentes microorganismos endofíticos. Con bastante frecuencia, este tipo de microorganismos tienen características que mejoran la productividad vegetal de una forma directa: (i) promoviendo el crecimiento de las plantas, (ii) fijando nitrógeno atmosférico o (iii) aportando nutrientes o de forma indirecta: (i) inhibiendo el crecimiento de patógenos, (ii) mediante la inducción de mecanismos de defensa en las plantas, (iii) eliminando contaminantes o (iv) produciendo metabolitos de beneficiosos para la planta. El repertorio de sus efectos y funciones en la planta aún no se entiende totalmente, por lo que el objetivo que se plantea en la actualidad es el estudio y utilización de comunidades microbianas, para favorecer la colonización de las plantas por bacterias beneficiosas, lo que causaría un gran impacto económico y medioambiental: Disminución de la cantidad de fertilizantes y pesticidas utilizados y la protección de la planta frente a estrés ambiental son ejemplos del potencial que tiene la correcta utilización de microorganismos seleccionados, en la práctica agrícola.

Las bacterias mejor estudiadas, en cuanto a las interacciones simbióticas con plantas, son las Gram negativas, ya que son fácilmente aislables de tejidos vegetales, su manejo es muy sencillo, su hábito de crecimiento suele ser rápido e incluyen a casi todos los microorganismos capaces de fijar nitrógeno. Sin embargo, el impacto que causan los Gram positivos en las plantas es más importante de lo que se creía en un principio y su estudio merece mucha más atención de la que se le ha prestado hasta ahora (Francis & Holsters, 2010).

En estudios previos se ha demostrado la eficacia de *Micromonospora* como productor de compuestos de interés farmacéutico (Qin *et al.*, 2010) (Igarashi *et al.*, 2007), y su presencia de forma constante en nódulos de plantas sanas de un amplio número de géneros de leguminosas (como *Pisum*, *Medicago*, *Ononis*, *Arachis*, *Lupinus*, etc. Capítulo 1), parece indicar que su función en estos órganos sea más importante que la de un simple comensal. También se puede descartar un papel como patógeno, ya que siempre se tomaron plantas sanas para el estudio de sus nódulos. *Micromonospora* como endofito ha sido descubierto hace muy poco tiempo y existen muy pocos datos referentes a su función en el interior de los nódulos.

De acuerdo con estos antecedentes se diseñaron una serie de experimentos con el objetivo de discernir si *Micromonospora* aporta beneficios a las plantas que

los contienen y cuales son estos. Los objetivos concretos que se querían abordar son: (i) Evaluar la capacidad formadora de nódulos y fijadora de nitrógeno como endofito de *Micromonospora*. (ii) Obtener datos sobre la capacidad como PGPR de *Micromonospora* tanto las cepas aisladas de España como de Australia. (iii) Estudiar el efecto de la inoculación con cepas de *Micromonospora* seleccionadas, sobre la producción en alfalfa. (iv) Determinar la proporción óptima de *Micromonospora* en los inoculantes para mejorar su eficacia como PGPR.

Para alcanzar estos objetivos se diseñaron diversos experimentos en cámara climatizada, en invernadero y en campo.

### Ensayos en cámara climatizada

Los estudios se realizaron en cámara de cultivo con control de temperatura fotoperiodo y humedad. El fotoperiodo fue de 16h de luz y 8 de oscuridad, la temperatura, 25°C de día, 16°C de noche y la humedad del 60%.

Para asegurarnos de que las plantas estaban en condiciones axénicas y controladas durante todo el experimento, se utilizaron plántulas de alfalfa germinadas en placas Petri, en condiciones axénicas y transplantadas a tubos de vidrio de dimensiones 20x200 con medio Rigaud-Puppo sin nitrógeno esterilizados en autoclave (Figura 1). Para mantener las raíces en oscuridad, los dos tercios inferiores de cada tubo, se rodean con un material opaco.

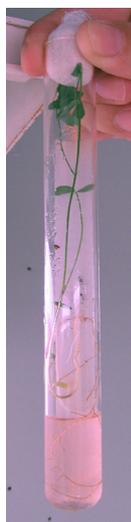


Figura 1. Fotografía de una de las plantas, cultivadas en tubos, en condiciones axénicas utilizados para este experimento.

Las cepas de *Micromonospora* utilizadas en este estudio, fueron escogidas de entre los aislados de Aldearrubia por su buen crecimiento en placa y su proximidad a especies de *Micromonospora* bien representadas en la zona de estudio.

Las cepas utilizadas su origen y características se detallan a continuación:

- *Micromonospora* AL2: 99,31% de similitud con *M. auratinigra*.
- *Micromonospora* AL16: 99,61% de similitud con *M. saelicesensis*.
- *Sinorhizobium meliloti* Sm1021: Cepa silvestre de *S. meliloti*.
- *S. meliloti* Rm8386 (Bac-): Cepa mutante que no forma bacteroides. Da lugar a nódulos no fijadores de nitrógeno atmosférico.

Los análisis de similitud de las cepas de *Micromonospora* AL2 y AL16 se realizaron a partir de las secuencias completas del gen del ARN ribosómico 16S.

Las plantas se inocularon aplicando a la raíz una suspensión del microorganismo, con una turbidez de 5 en la escala de McFarland. Los tratamientos que se realizaron fueron los siguientes:

- 1.- Control negativo (sin inocular).
- 2.- Inoculación con *S. meliloti* Sm1021.
- 3.- Inoculación con *S. meliloti* Rm8386.
- 4.- Inoculación con *Micromonospora* AL2.
- 5.- Inoculación con *Micromonospora* AL16.
- 6.- Coinoculación con *S. meliloti* Sm1021 y *M. AL2*.
- 7.- Coinoculación con *S. meliloti* Sm1021 y *M. AL16*.
- 8.- Coinoculación con *S. meliloti* Rm 8386 y *M. AL2*. Y
- 9.- Coinoculación con *S. meliloti* Rm 8386 y *M. AL16*).

Los resultados de este primer estudio nos permiten extraer una serie de conclusiones de interés sobre la interacción entre *Micromonospora* y alfalfa.

1º- *Micromonospora*, en estas condiciones experimentales, no induce la formación de nódulos pero coloniza los nódulos producidos por *S. meliloti*.

Utilizando cultivos axénicos de *M. sativa* (Figura 1) inoculados con las cepas antes mencionadas se observó que aunque *Micromonospora* no era capaz de producir nódulos por sí misma, sí que colonizaba los formados por *Sinorhizobium*. Se comprobó reaislando la cepa de *Micromonospora* que habíamos inoculado, del interior de los nódulos de estas plantas, con la misma metodología descrita para su aislamiento de nódulos de plantas silvestres (Capítulo 1), es decir, a partir de nódulos esterilizados en superficie. La identidad del microorganismo aislado se verificó mediante secuenciación del gen *rrs*.

2º- *Micromonospora* afecta la nodulación incrementando el número total de nódulos por planta, se puede introducir el término de *Rhizobia Helper Bacteria* (RHB) para definir esta característica.

Esta técnica de cultivo hidropónico, permite medir la evolución de la nodulación día a día sobre cada una de las plantas. Las raíces y los nódulos se puede

observar a través del tubo de vidrio lo que permite el recuento de nódulos periódico, sin alterar la planta, a lo largo de todo el experimento.

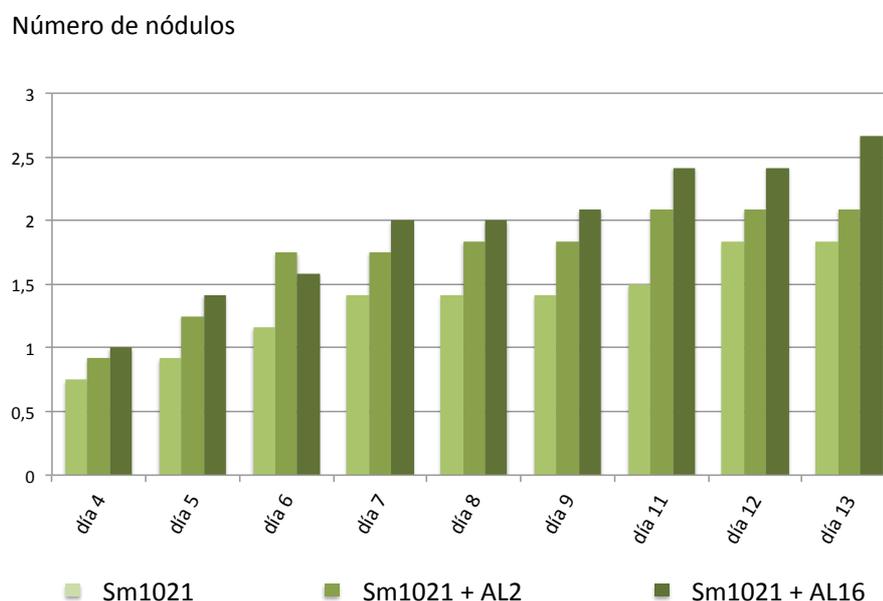


Figura 2. Gráfica que representa las medias del número de nódulos que aparecieron en los distintos tratamientos a lo largo del tiempo.

En la figura 2 se representan las medias (10 plantas por tratamiento) del número de nódulos de las raíces de alfalfa de cada tratamiento. Las medidas se tomaron cada día a partir de la aparición del primer nódulo hasta que el número de nódulos permaneció estable, aproximadamente tres semanas tras la inoculación.

Existe un efecto sinérgico entre *S. meliloti* y *Micromonospora*, ya que el número de nódulos es mayor cuando se coinocularon ambos microorganismos que cuando inoculamos sólo *S. meliloti* tal y como se observa en la figura 2. Por paralelismo con efectos similares, descritos en la simbiosis entre raíces y hongos formadores de micorrizas, podemos hablar de *Rhizobia Helper Bacteria*, en casos como este, en los que se demuestra que *Micromonospora* incrementa, de forma clara, la nodulación.

3º- *Micromonospora*, en estas condiciones de cultivo, promueve el crecimiento vegetal.

Además del incremento en el número de nódulos se observó, aunque sin realizar análisis estadísticos en este experimento, que las plantas que estaban coinoculadas presentaban un mayor porte, con la parte aérea más frondosa que las plantas que sólo estaban inoculadas con *S. meliloti*.

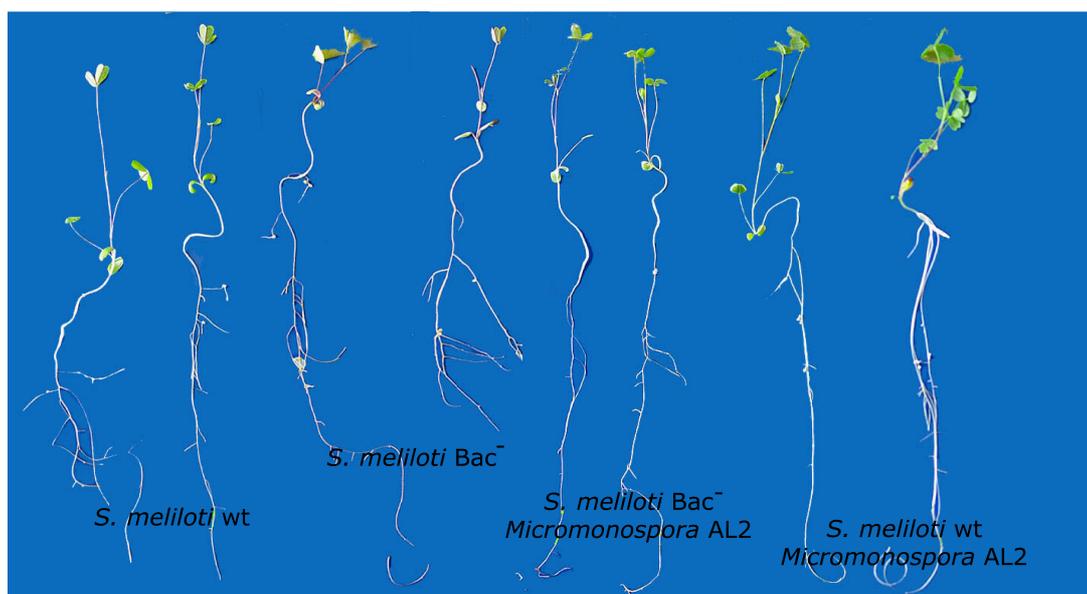


Figura 3. Ejemplos de las plantas recogidas de los tubos de ensayo separadas por tratamientos.

En la figura 3 se aprecian las diferencias de tamaño, observables a simple vista, entre los tratamientos, se escogieron dos plantas representativas de cada tratamiento para la foto. Estos resultados fueron muy claros en todos los ensayos de coinoculación. Este hecho nos indica que *Micromonospora* promueve el crecimiento de la alfalfa en estas condiciones y por tanto actuaría como PGPR. Teniendo en cuenta el interés e importancia de estos resultados para los objetivos planteados, se programaron experimentos más completos para su evaluación en condiciones de microcosmos en invernadero, en los que se analizarían todos los parámetros necesarios para discernir si *Micromonospora* mejora inequívocamente el crecimiento de la planta.

### Ensayos de microcosmos en invernadero

A la vista de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en cámara climatizada, se decidió llevar a cabo un experimento a mayor escala y con mayor número de cepas de *Micromonospora*. En este caso fueron seleccionadas 16 cepas por pertenecer a agrupaciones de cepas distintas en los estudios con el gen *rrs* y a nivel de invernadero para que las condiciones ambientales fueran más similares a las naturales.



Figura 4.- Vista parcial del experimento llevado a cabo en invernadero.

Las cepas de *Micromonospora* utilizadas en este estudio fueron: ALFb4, ALFpr18, ALFr5, ALFb7, ALFb1, AL2, ALF4, ALF1, ALF2, AL4, ALF b5, AL20, ALFpr19, ALFr4, AL16, y ALF 7.

Para realizar este ensayo se germinaron las semillas de alfalfa, previamente esterilizadas en superficie, en un semillero con vermiculita también estéril. Cuando las plántulas tenían aproximadamente un centímetro de longitud, fueron trasplantadas a una maceta de un kilo con suelo agrícola, de pH 7,2, de la vega de Salamanca. El suelo fue tindalizado para realizar este estudio (Figura 4).

Las macetas (10 macetas por tratamiento) se inocularon 5 días tras el trasplante con cultivos de las cepas de *Micromonospora* seleccionadas, y se dejaron crecer hasta que un 30% de las plantas hubieran florecido, ya que este es el momento en el que se suele realizar la cosecha en condiciones de campo.

Los 34 tratamientos que se realizaron fueron los siguientes:

1. Control negativo (sin inocular).
2. Inoculación con *S. meliloti* 1021.
- 3-18. Inoculación con las 16 cepas de *Micromonospora*.
- 19-34. Coinoculación con *S. meliloti* 1021 y 16 cepas de *Micromonospora*.

Al finalizar el experimento se analizaron los parámetros que se consideraron más importantes para evaluar el crecimiento y estado nutricional de la alfalfa:

Longitud y peso seco de la parte aérea y raíz, número de entrenudos, relación ancho/largo de los folíolos, número de nódulos, clorofila, diámetro de la corona

y además, se analizaron datos de ionómica por medio de un analizador LECO para el nitrógeno y el carbono y por ICP-OES los elementos azufre, boro, zinc, calcio, sodio, cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, nitrógeno total y relación carbono nitrógeno.

Los pesos se muestran en gramos, las longitudes en centímetros y el análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS con un ANOVA y test LSD.

Además de este tratamiento estadístico clásico, se decidió utilizar un sistema estadístico que permitiera el análisis y la representación gráfica de todas las variables y las observaciones de todos los tratamientos de forma conjunta.

### **Método de análisis Biplot**

La forma más sencilla de representación gráfica es un diagrama de dispersión, los ejes representan las variables y los puntos las observaciones y su interpretación es sencilla. Si tenemos tres variables la representación gráfica es posible aunque su interpretación se complica, pero con más de tres variables, distribuciones de muestras multivariantes, son muy difíciles de representar e interpretar.

Los métodos Biplot permiten la representación gráfica de una matriz de datos de una muestra multivariante, en un espacio de dos dimensiones y superpone, en la misma gráfica, observaciones y variables. Las observaciones se representan como puntos y las variables como vectores, cuya dirección muestra el cambio de cada variable.

Tradicionalmente se distinguen dos tipos de representaciones Biplot con propiedades diferentes denominados JK y GH biplot (Gabriel, 1971). Con el GH, se consigue una gran calidad de representación para las variables, pero no para las observaciones y por el contrario el JK permite buena calidad de representación para las observaciones y mala para las variables (Galindo Villardon, 2011) introduce una modificación de los métodos Biplot de Gabriel que se denomina representación HJ-Biplot y que consigue una buena calidad de representación tanto para las observaciones como para las variables.

En la nueva técnica propuesta por Galindo, no sólo se demuestra que se consigue la misma calidad de representación para las observaciones y para las variables, sino que la calidad es más alta que en los biplot clásicos.

Este tipo de representación gráfica es muy útil porque su interpretación se basa en conceptos sencillos, de forma que en una representación biplot se cumple que:

- La similitud está relacionada con la proximidad entre dos observaciones, puesto que la similitud es una función inversa de la distancia entre dos puntos.
- Las longitudes y los ángulos de los vectores que representan a las variables,

nos indican la variabilidad y covariabilidad respectivamente. Por tanto, si el ángulo que forman es pequeño, las variables presentan una correlación alta, si el ángulo es cercano a 180 grados, la correlación alta pero negativa y si es recto las variables son independientes.

- Las proyecciones de las observaciones sobre los vectores que representan a las variables nos permiten conocer, de forma aproximada, los valores de la matriz de datos.

Aunque la interpretación de los gráficos resultantes de un HJ-Biplot es sencilla, hay que tener en cuenta que las posiciones de los puntos sobre los planos principales pueden ser sólo aparentes y para evitar los posibles errores, debemos tener en cuenta las recomendaciones propuestas por (Villardón & Cuadras, 1986) para la interpretación de este tipo de gráficos.

## Resultados y discusión

En la figura 5 se representan todas las observaciones para los 24 parámetros analizados en los 34 tratamientos.

En esta presentación gráfica, HJ Biplot (Figura 5), podemos observar que se separan claramente dos grupos de observaciones, uno corresponde a las plantas coinoculadas con ambos microorganismos (azul) y el otro a las inoculadas sólo con *Micromonospora* (rojo). Los parámetros que tienen mayor influencia en estos agrupamientos son: para las plantas coinoculadas todos los parámetros que miden crecimiento, nodulación y contenido en nitrógeno y para las que sólo fueron inoculadas con *Micromonospora* algunos elementos minerales y la relación C/N. Parámetros como la longitud del tallo, número de entrenudos, peso de la raíz y el contenido en fósforo no tienen incidencia en esta distribución, lo que quiere decir, que en términos globales no están influidos por los diferentes tratamientos estudiados.



Cobre (Cu), Zinc (Zn), Boro (B), Magnesio (Mg), Azufre (S), Calcio (Ca) y Manganeseo (Mn). Estos elementos son esenciales y de acuerdo con estos resultados su concentración es más alta en los tratamientos en los que no está presente *Sinorhizobium* y lo mismo ocurre con la relación Carbono : Nitrógeno (C/N), en este caso la explicación es clara puesto que la concentración de carbono en las plantas se mantiene bastante constante y la de nitrógeno es mucho más alta en las plantas coinoculadas. Un efecto de dilución similar, puede ser la explicación para el comportamiento del resto de los elementos mencionados.

Con los resultados de los diferentes tratamientos también se realizó un análisis estadístico, utilizando el programa SPSS, con un ANOVA y test LSD. Estos análisis estadísticos se realizaron con los resultados de cada uno de los parámetros estudiados y se muestran a continuación.

Teniendo en cuenta los resultados globales descritos (Figura 5) y con el fin de comprender mejor la importancia de los distintos tratamientos en los parámetros estudiados, se ha dividido este apartado en dos grandes bloques. En uno se analizarán los parámetros directamente relacionados con el crecimiento, incluyendo la nodulación y la nutrición nitrogenada (no podemos obviar que, en estas condiciones, el nitrógeno es el factor limitante del crecimiento vegetal de mayor importancia) y por otra parte todos los elementos minerales analizados ya que estos tienen una gran incidencia en el agrupamiento de las observaciones relativas a los tratamientos en los que sólo se ha inoculado *Micromonospora*.

### Crecimiento y nutrición nitrogenada

#### Longitud de la parte aérea

Este parámetro se determinó en el momento en el que finalizó el experimento, para todas las plantas, la longitud se midió desde la corona hasta la última hoja del tallo principal.

En ninguna de las plantas monoinoculadas se observan grandes diferencias con el control sin inocular (Figura 6), pero hay tres tratamientos (cepas ALFb4, ALF1, AL4 y ALFpr19a) cuya longitud es significativamente menor que la del control. Sin embargo, en las plantas coinoculadas se puede ver que las diferencias entre tratamientos son prácticamente nulas y no hay significación entre ninguna de ellas. Pese a esto, el parámetro de la longitud por sí sólo no indica que las características de productividad de la planta sean mejores, y muchas veces, ni siquiera la biomasa, ya que plantas con menos porte pueden tener más ramificaciones lo que se traduciría en un mayor peso seco. De hecho las medias globales de este parámetro son muy parecidas entre plantas coinoculadas y las inoculadas con *Micromonospora* 49,6 frente 45,2. a pesar de que la productividad de un grupo de plantas y el otro es muy diferente. Por este

motivo en la representación HJ Biplot el vector que representa este parámetro se sitúa entre las dos nubes de puntos, es decir, no tiene influencia en la distribución de las observaciones.

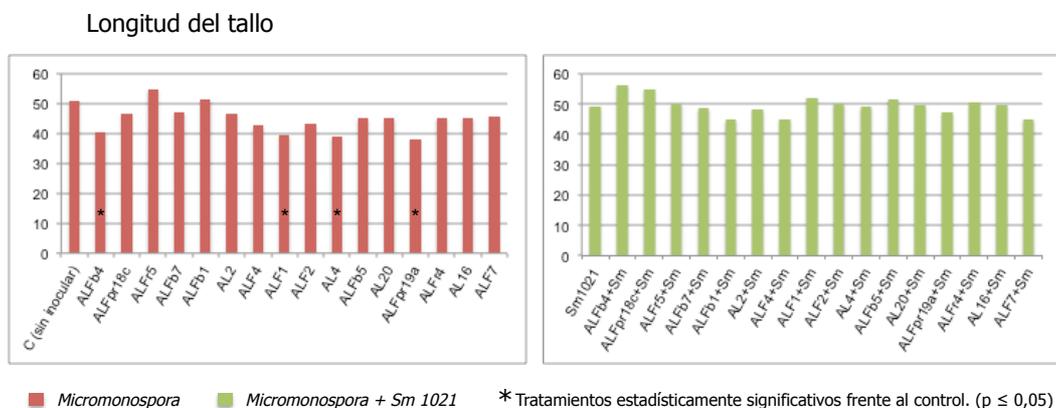


Figura 6. Medias de la longitud del tallo de los distintos tratamientos llevados a cabo.

### Peso seco de la parte aérea

Cada una de las plantas fue cortada por la corona y la parte aérea y la raíz de cada planta, se pusieron sobres de papel independientes, los cuales se depositaron en una estufa de secado a 60°C durante 48 horas. Tras este periodo se determinó su peso seco.

Este parámetro refleja, de forma clara, las diferencias entre los dos grandes bloques experimentales. Las plantas coinoculadas tienen un peso seco que prácticamente dobla el de las monoinoculadas; 1623 mg frente a 997mg (Figura 7). La representación HJ Biplot (Figura 5) refleja con claridad la importancia de este parámetro, cuyo vector representativo pone de manifiesto, que ejerce una clara influencia en la distribución y agrupamiento de las observaciones.

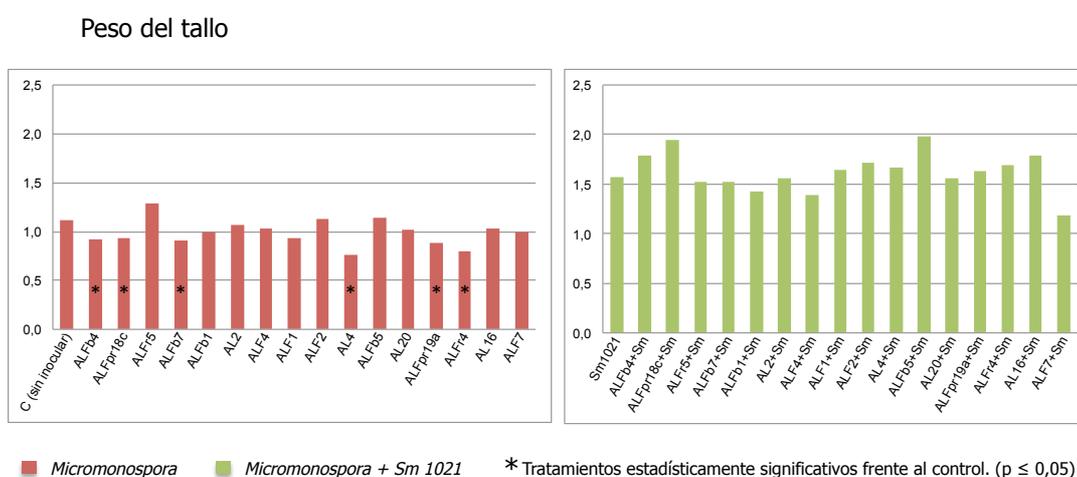


Figura 7. Medias del peso del tallo de los distintos tratamientos llevados a cabo.

Las plantas coinoculadas no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ni tampoco con el control, a pesar de que, tenemos experimentos con cepas de *Micromonospora*, que tienen un peso seco que llega a ser hasta un 30% superior al control (Figura 7). Entre las plantas monoinoculadas, sin *Sinorhizobium* y sólo con *Micromonospora*, se observan resultados dispares, en algunos casos se observa una tendencia a un aumento del peso en algunos tratamientos, pero los resultados estadísticamente significativos van en dirección contraria, presentan un peso seco inferior al del control sin inocular.

El aumento en el porte y peso de las plantas, tanto coinoculadas como el caso de las inoculadas sólo con *Micromonospora* podría deberse a la producción de hormonas vegetales, como en el caso descrito por (Compant *et al.*, 2005b) (El-Tarabily, 2003). No hemos estudiado esta producción pero constituiría una información interesante que completaría este estudio, comparándolo con los efectos de *Sinorhizobium*, ya que es en las plantas coinoculadas donde más cepas muestran un peso superior al del control, pese a no ser resultados significativos en los test LSD.

### Longitud raíz

La longitud de la raíz se midió desde la corona hasta el extremo de la raíz principal, tras limpiar y lavar la raíz, cuidando no perder en el proceso de lavado partes significativas de la misma.

La media global de la longitud de la raíz, es superior en las plantas monoinoculadas (21,6 cm) que en las coinoculadas (19,3 cm) y tiene incidencia en la distribución de las observaciones en la representación HJ Biplot de la figura 5.

Los datos de las plantas coinoculadas reflejan que no hay diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos. Sólo hay dos cepas de *Micromonospora* que ejercen un efecto positivo sobre la longitud de la raíz (ALFb5 y AL20) y la cepa AL 16 en sentido negativo (Figura 8).

Por otro lado, en las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* se observa una drástica reducción en la longitud de la raíz, frente al control sin inocular. Los resultados de todos los tratamientos son significativos, lo que puede responder a que *Micromonospora* coopera con la raíz de la planta en la obtención de nutrientes y en consecuencia la raíz no necesita crecer para explorar más terreno y elimina el coste energético que ello conlleva.

### Longitud de la raíz

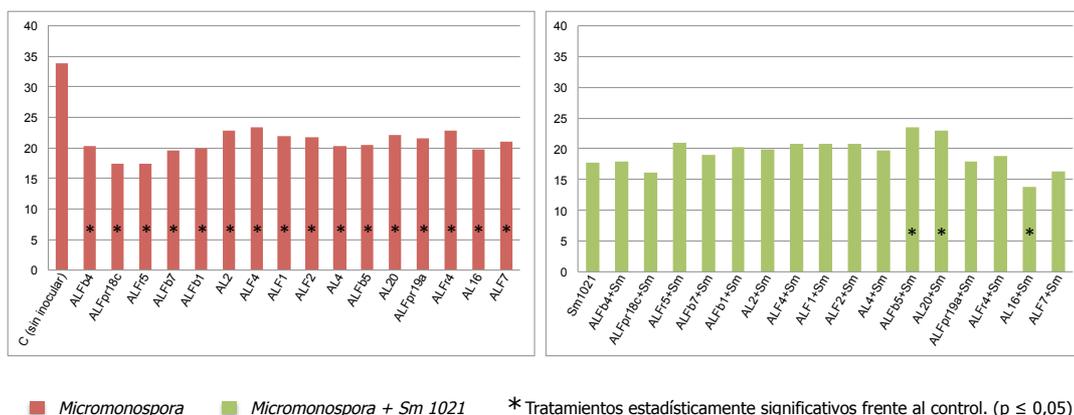


Figura 8. Medias de la longitud de la raíz de los distintos tratamientos llevados a cabo.

### Peso seco de la raíz

Se utilizó el mismo procedimiento de secado también para la raíz. En este caso se retiraron algunos nódulos para su estudio posterior.

La media global de este parámetro para las plantas monoinoculadas (906 mg) y para las coinoculadas (1039 mg), es muy parecida y tienen poca incidencia en la distribución de las observaciones en el análisis multivariante (Figura 5).

### Peso de la raíz

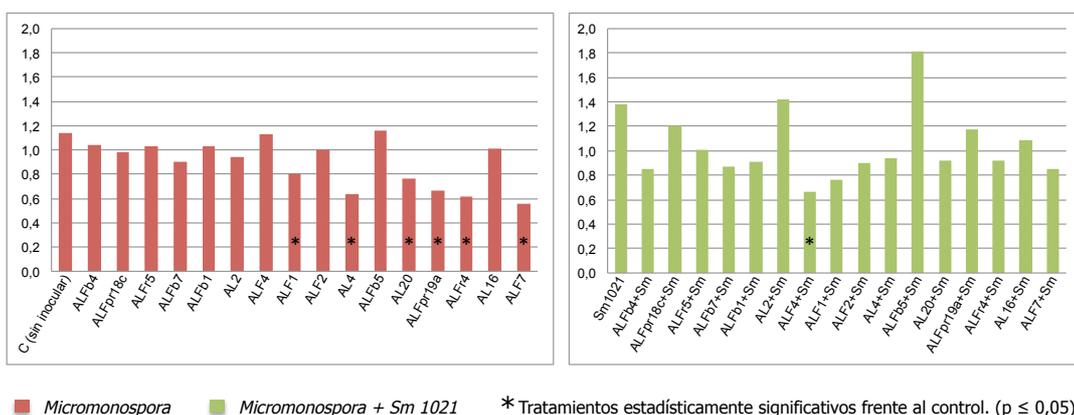


Figura 9. Medias del peso de la raíz de los distintos tratamientos llevados a cabo.

En el caso de los tratamientos monoinoculados parece coherente que el peso sea menor que el control ya que el tamaño del tallo también era menor, sin embargo el número de resultados estadísticamente significativos se reduce a la mitad (Figura 9). En las medias entre tratamientos en las plantas coinoculadas, hay una gran variabilidad, y a pesar de las marcadas diferencias entre los tratamientos, sólo hay resultados estadísticamente significativos frente al

control, lo que hace pensar que también hay una gran variabilidad interna y que la incidencia de este parámetro en la selección de los posibles candidatos hay que valorarla con cuidado.

### Número de nódulos

Se contaron los nódulos de todas las plantas, poniendo especial énfasis en observar, si las plantas control y las inoculadas con *Micromonospora* tenían nódulos típicos, lo que indicaría que habían sido contaminadas por rhizobios procedentes del exterior y que no se habían mantenido las condiciones adecuadas de limpieza microbiológica a lo largo del experimento.

Los controles negativos, que no fueron inoculados, no presentaban nódulos y por tanto asumimos que no había contaminaciones de bacterias formadoras de nódulos. Sin embargo, en las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* aparecieron estructuras similares a los nódulos pero de un color blanco o céreo y con una morfología macroscópica muy diferente a los de los nódulos típicos inducidos por *Sinorhizobium*.

Además en las plantas coinoculadas aparecieron, junto a los nódulos característicos de la raíz de la alfalfa inducidos por *S. meliloti*, nódulos coraloides, de un tamaño anormalmente grande y que no aparecieron en las planta inoculadas sólo con *S. meliloti*.

Es la primera vez que estos dos hechos se describen en leguminosas y asociados a la inoculación con una *Actinobacteria*. Sólo se ha descrito la inducción de nódulos por este tipo de bacterias en el grupo de plantas que son noduladas por *Frankia*. Otro hecho que nos llamó la atención, es que el tipo de nódulos inducidos en presencia de *Micromonospora* es similar, por su aspecto externo, a los inducidos por *Frankia*. Estos resultados por su novedad e importancia nos llevaron a realizar un amplio estudio de microscopia de los nódulos, que se describe en el capítulo 4.

En cuanto al recuento de nódulos, sólo se reflejan los nódulos típicos y no se han incluido los nódulos que aparecieron en las plantas monoinoculadas por que sus características morfológicas no nos permiten considerarlos, en sentido estricto, como verdaderos nódulos.

Podemos observar que existe una sinergia evidente entre *Micromonospora* y *Sinorhizobium*, dado que en todos los tratamientos, el número de nódulos es significativamente mayor que en el control inoculado sólo con *Sinorhizobium*, resultados que confirman los obtenidos en los ensayos en cámara climatizada (Figura 10).

Los resultados son espectaculares, puesto que el número de nódulos en todos los ensayos de coinoculación, son significativamente mayores que en el control. Si, además, tenemos en cuenta la capacidad de inducción de nódulos atípicos por *Micromonospora* sola y la aparición de nódulos coraloides en las plantas

coinoculadas, parece claro que este microorganismo tiene un potencial, en este aspecto, que debe valorarse muy positivamente y este efecto, por sí sólo, explicaría su función y su presencia en los nódulos en ambientes naturales.

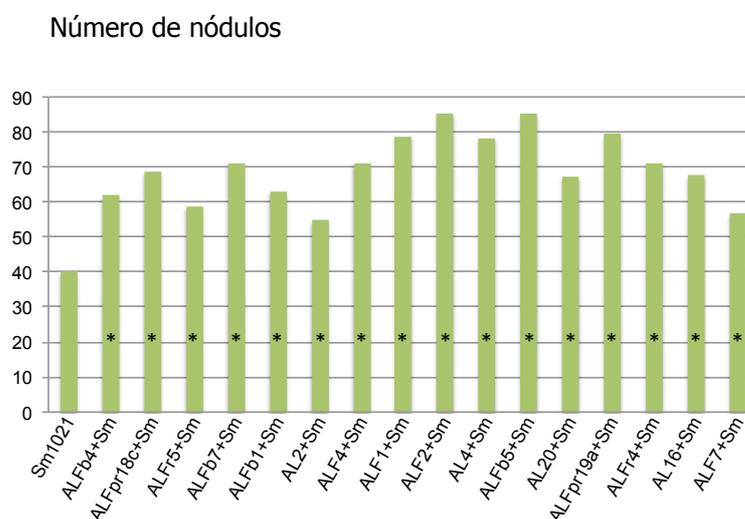


Figura 10. Medias del número de nódulos de los distintos tratamientos llevados a cabo. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

El aumento del número de nódulos de las plantas, podría deberse a la producción de celulasas por parte de *Micromonospora*, ya que observamos en la microscopía de los nódulos que los canales de infección parecen de mayor tamaño que los normales. Estas características son descritas por (Robledo *et al.*, 2008) en unos mutantes de *Rhizobium* superproductores de celulasas. La producción de celulasas por las cepas de *Micromonospora* utilizadas en el estudio está comprobada en nuestro laboratorio.

Este aumento de nódulos, concuerda además con un aumento en el nitrógeno medido en la mayoría de las plantas coinoculadas, pese a que sólo 7 cepas de *Micromonospora* tenían un aumento significativo de la cantidad en porcentaje del nitrógeno en la raíz.

### Clorofila

Estas medidas se realizaron en las plantas antes de la cosecha. Se ha utilizado un colorímetro SPAD (Konica Minolta), que permite medir la cantidad de clorofila en una hoja. Las medidas se toman *in situ* proyectando haz de luz a través del foliolo y se mide la absorbancia a 650 nm (zona de absorción de la clorofila) y a 940nm zona en la que no absorbe, se establece una relación entre ambas que nos da una estimación de la concentración de clorofila muy fiable y exacta. Se realizaron tres determinaciones distintas por cada planta, de las que se obtuvo la media y se seleccionaron los mismos foliolos en todas las plantas para que las medidas fueran comparables.

Las medias globales de las plantas monoinoculadas y coinoculadas reflejan una clara diferencia entre ambos grupos de tratamientos. La media para las primeras es de 35,5 y para las segundas de 53,4. Esta diferencia se refleja en la figura 5, en la que este parámetro tiene un peso importante en los agrupamientos de las observaciones. Es de destacar la fuerte correlación que se observa con el número de nódulos, lo que es coherente si tenemos en cuenta que los procesos de fotosíntesis y fijación biológica de nitrógeno son responsables, muy destacados, del estado nutricional de la planta y que la fijación de nitrógeno depende del aporte de fotosintato.

En las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* observamos en todos los tratamientos un contenido en clorofila mayor que el control y en la mayoría de ellos esta diferencia es estadísticamente significativa (Figura 11). La cantidad de clorofila es un factor importante para determinar el estado nutricional de una planta y en efecto las plantas que contenían *Micromonospora* no sólo estaban más verdes sino que tenían un aspecto más saludable que los controles sin inocular.

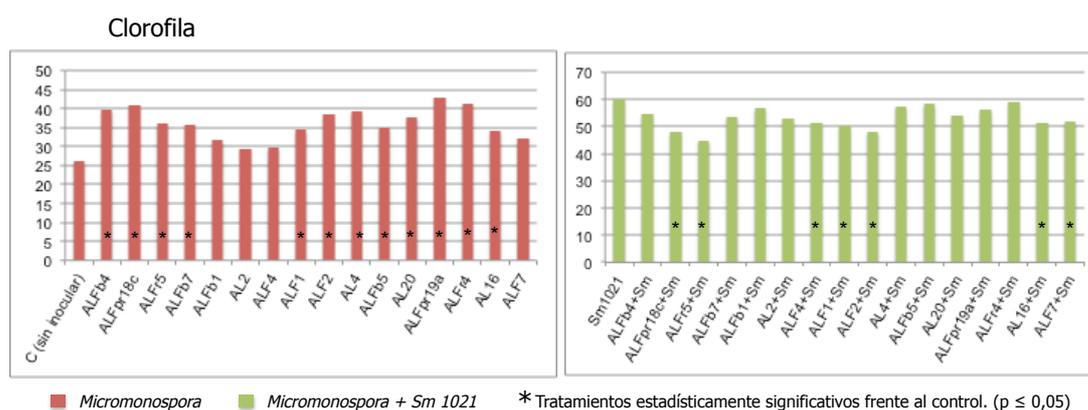


Figura 11. Medias de la clorofila de los distintos tratamientos llevados a cabo.

Sin embargo, en plantas coinoculadas no se observan, en la mayoría de los casos, muchas diferencias con el control y los tratamientos que dieron diferencias significativas tienen una cantidad de clorofila menor.

## Nitrógeno

Es un elemento esencial, necesario para la síntesis de macromoléculas tan importantes como los ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidos y muchos metabolitos tanto primarios como secundarios. Las plantas en general pueden tomar y utilizar nitrato o amonio como fuente de nitrógeno, sin embargo, las leguminosas como la alfalfa utilizan el nitrógeno que fijan los *Rhizobia* que se encuentran en sus nódulos radicales, los cuales utilizan el nitrógeno atmosférico.

Observamos que los tratamientos de plantas coinoculadas siempre muestran

una cantidad superior de nitrógeno que las inoculadas sólo con *Micromonospora*, debido a la fijación de nitrógeno que se lleva a cabo en sus nódulos. Este hecho se ve reflejado en la figura 5, en la que el contenido de nitrógeno del tallo es uno de los factores más relevantes que determinan los agrupamientos de las observaciones realizadas.

Al analizar la parte aérea de las plantas monoinoculadas (Figura 12), podemos ver que todos los tratamientos presentan una concentración mayor de nitrógeno que el control y en 8 casos estas diferencias son significativas. Es de gran interés agronómico poder confirmar que *Micromonospora* aumenta la accesibilidad de la planta al nitrógeno del suelo, ya que, de acuerdo con estos resultados, incluso en ausencia de microorganismos fijadores de nitrógeno la planta está mejor nutrida.

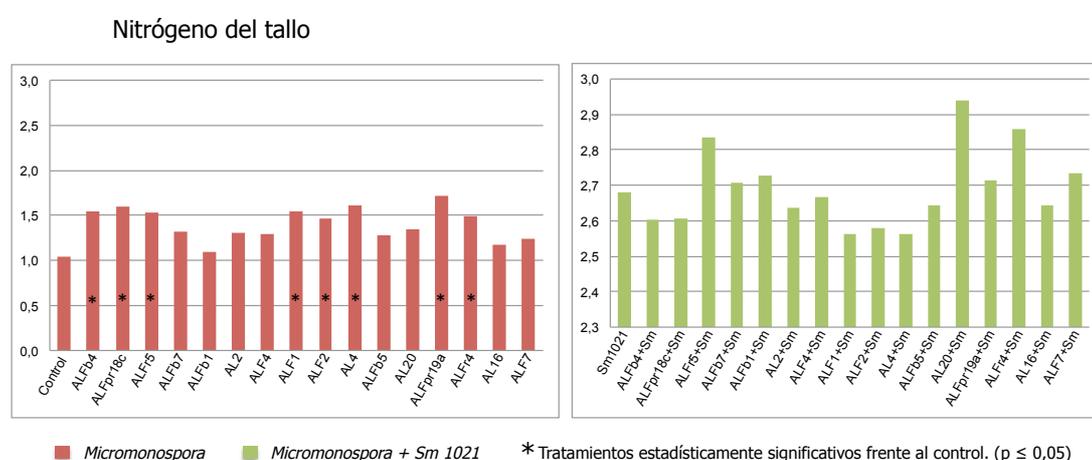


Figura 12. Medias del porcentaje de nitrógeno del tallo en los tratamientos llevados a cabo.

Las plantas coinoculadas presentan una situación más diversa en cuanto a su contribución a la nutrición nitrogenada de la planta. En la figura 14 podemos observar que aproximadamente la mitad de los experimentos con plantas coinoculadas tienen una concentración media de nitrógeno en el tallo superior al del control, pero las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.

Las plantas inoculadas únicamente con *Micromonospora* son las que mostraban un aumento de nitrógeno respecto al control sin inocular, 8 de ellos siendo significativos en el test LSD. Dado que nuestros últimos resultados muestran que *Micromonospora* no parece fijar nitrógeno ni en vida libre ni en el interior de los nódulos, este aumento puede estar relacionado con la mejora en la absorción de nutrientes por parte de la planta cuando está asociada a PGPRs, como ocurre con *Azospirillum*, que aumenta la biomasa y la toma de nutrientes por medio de la producción de moléculas señal, mejora del transporte de protones y de la absorción y acumulación de nitratos (Hillel *et al.*, 2004).

En cuanto al contenido en nitrógeno de la raíz, su importancia en la

productividad es muy grande, puesto que el rebrote tras cada corte, depende de las reservas de la raíz ya que la defoliación impide la fotosíntesis y sin fotosíntesis no se puede realizar la fijación de nitrógeno que como sabemos es un fuerte sumidero de fotosintato.

Los resultados se muestran en la figura 13 y podemos comprobar que tanto en las plantas coinoculadas como en las monoinoculadas, *Micromonospora* ejerce un efecto positivo en cuanto al porcentaje de nitrógeno en la raíz. En ambos casos prácticamente todas las cepas inoculadas incrementan el porcentaje de nitrógeno y en algunos este incremento es estadísticamente significativo. Tres cepas en el caso de las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* y siete en el caso de las coinoculadas. Este resultado puede tener una gran importancia en el incremento de la productividad de la alfalfa.

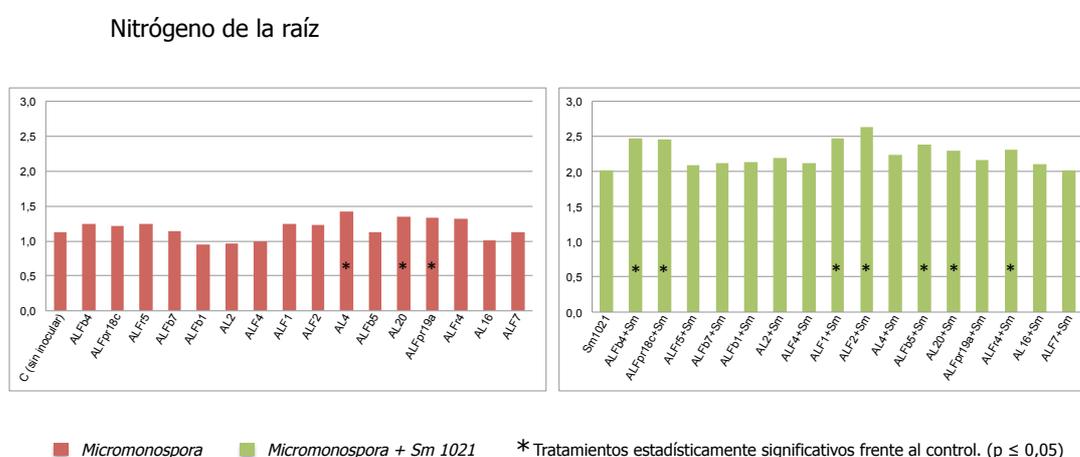


Figura 13. Medias del porcentaje de nitrógeno de la raíz en los tratamientos llevados a cabo.

### Nitrógeno total

Esta medida se obtiene multiplicando el peso de la planta por su porcentaje en nitrógeno, lo que da un valor absoluto de este parámetro en miligramos. Es un parámetro muy significativo, por su importancia agronómica, para valorar el efecto de los diferentes tratamientos.

Las diferencias en los valores de este parámetro entre las cepas monoinoculadas y las coinoculadas es muy amplia dado que se acumulan las ya descritas para el contenido en nitrógeno del tallo y el peso del mismo. Esta diferencia (13,4 mg frente a casi 43 mg) se pone de manifiesto en el vector que representa esta variable en la representación HJ Biplot. (Figura 5)

Los resultados no son sorprendentes, ya que las plantas coinoculadas fijan nitrógeno, lo que hace que este elemento no sea un factor limitante y todos los tratamientos tengan un contenido en nitrógeno mucho mayor que los inoculados sólo con *Micromonospora* (Figura 14). Cabe destacar que en los tratamientos con alfalfa monoinoculada, hay varias cepas que incrementan en la planta el

contenido en nitrógeno de forma significativa, frente al control (ALFr5, ALF2, ALFpr19a), y en el caso de las coinoculadas aunque en algunos casos el aumento es de aproximadamente el 30% (ALFpr18c y ALFb5) estas diferencias no son estadísticamente significativas.

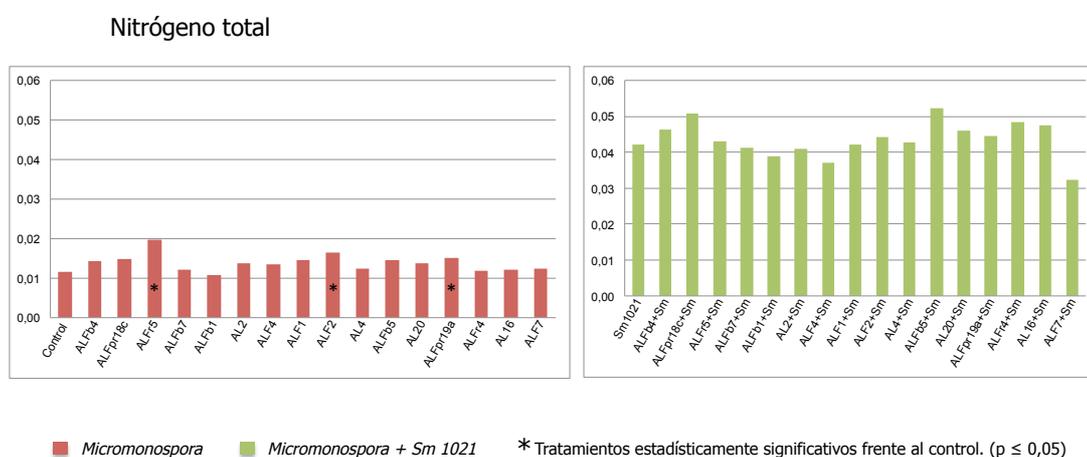


Figura 14. Medias del nitrógeno total del tallo en los tratamientos llevados a cabo.

## Carbono

Es el componente principal de la materia viva y suele mantenerse en niveles estables en el interior de las plantas, las cuales son capaces de fijarlo a través de la fotosíntesis, desde CO<sub>2</sub> a formas orgánicas. Por este motivo apenas hay diferencias entre los distintos experimentos realizados. La media para los ensayos sin inocular con *S. meliloti* es de 38,9% y para las inoculadas con este microorganismo sólo o junto a *Micromonospora* es del 40,99%

Sin embargo y debido a la gran estabilidad en el contenido en carbono de las plantas, cualquier pequeña variación causaba diferencias significativas en el estudio estadístico (Figuras 15 y 16). En la mayoría de los casos (ALFpr18c es la única excepción) la concentración de este elemento es mayor en los controles que en el resto de los experimentos, cuando analizamos el porcentaje de carbono en la parte aérea.

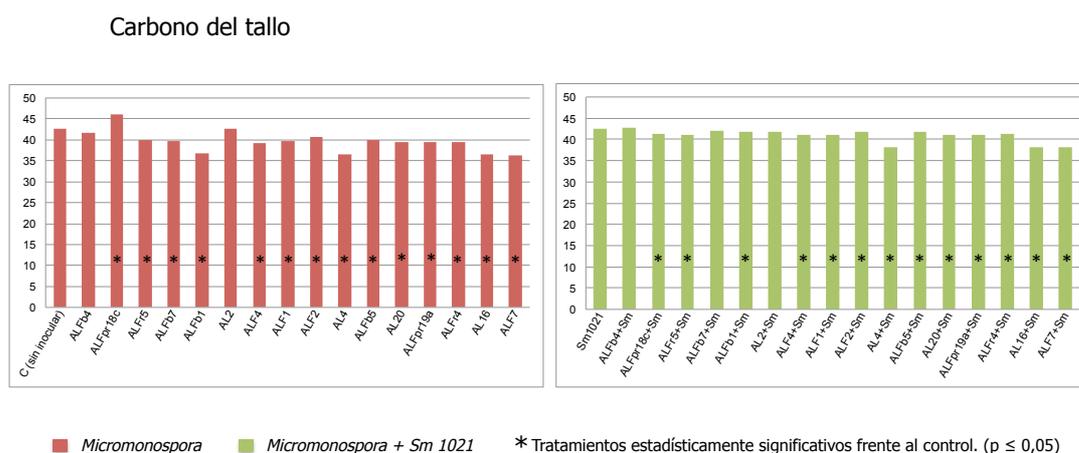


Figura 15. Medias del porcentaje de carbono del tallo en los tratamientos llevados a cabo.

En cuanto a la concentración de carbono en la raíz, la situación es muy similar en las plantas monoinoculadas pero cambia en las coinoculadas. En este caso encontramos algunos tratamientos (ALFb4, ALFpr18c y AL2) cuyas raíces contienen un porcentaje más alto de carbono que el control y esta diferencia es estadísticamente significativa (Figura 16)

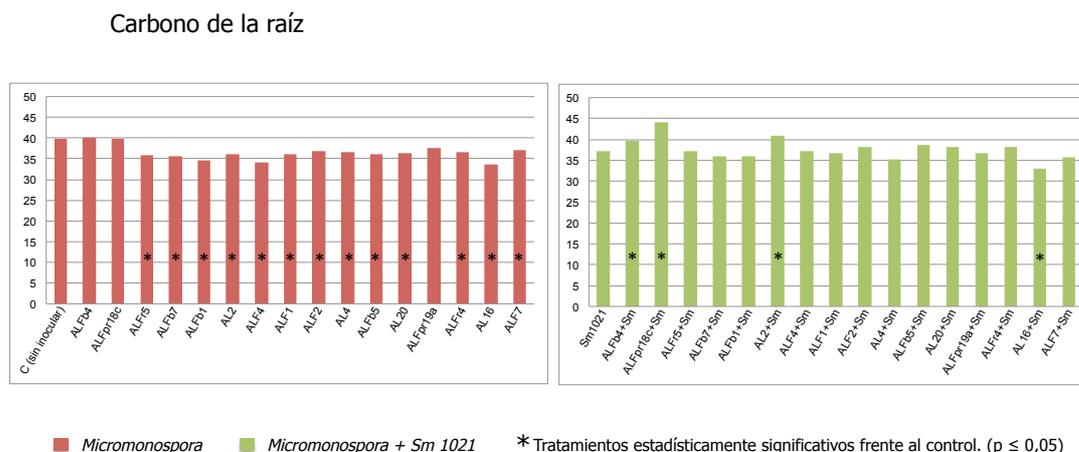


Figura 16. Medias del porcentaje de carbono de la raíz en los tratamientos llevados a cabo.

### Relación carbono nitrógeno

Parámetro obtenido por la división entre el porcentaje de carbono de la planta y el porcentaje en nitrógeno. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 17.

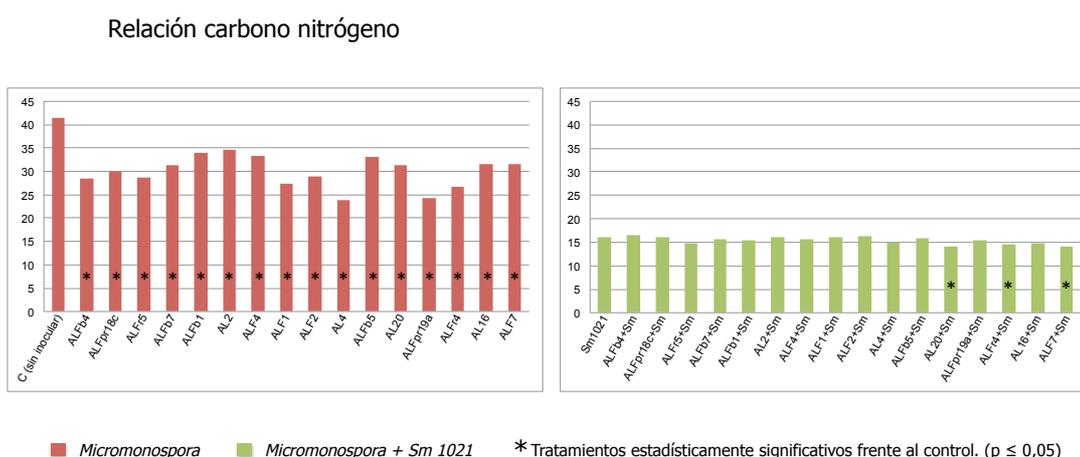


Figura 17. Medias de la relación C/N del tallo en los tratamientos llevados a cabo.

Esta relación es inversa al porcentaje de nitrógeno, por lo que no es de extrañar que las medias globales en este parámetro sean mucho más altas en el conjunto de los experimentos inoculados sólo con *Micromonospora* (30,6) que en los coinoculados con los dos microorganismos (15,4). Estos datos explican la trascendencia del vector que represente la relación C/N en el agrupamiento de las observaciones que se muestra en la figura 5.

También justifica que en los tratamientos monoinoculados todos los resultados sean significativamente menores al control sin inocular (Figura 30). En el caso de las plantas coinoculadas hay mucha homogeneidad, pero tres de los tratamientos tienen una relación C/N significativamente menor que el control.

### Número de entrenudos

Los entrenudos son las porciones de tallo que hay entre dos nudos, lugar en el que aparecen las ramificaciones laterales, ya sean tallos secundarios u hojas. Es un parámetro fenológico, habitualmente estudiado en agronomía.

En ambos tipos de tratamientos el número de entrenudos se mantiene bastante constante lo que nos impide considerar este parámetro como importante para la selección de cepas con capacidades PGPR (Figura 18). Este escaso interés se confirma con lo reflejado en la figura 5, en la que se asocia con la longitud del tallo con el que tiene una fuerte correlación. La única utilidad de este parámetro sería como medida indirecta de la altura pero parece poco práctico y por otra parte tanto la longitud del tallo como el número de entrenudos tienen una importancia pequeña en la distribución global de las observaciones.

### Entrenados

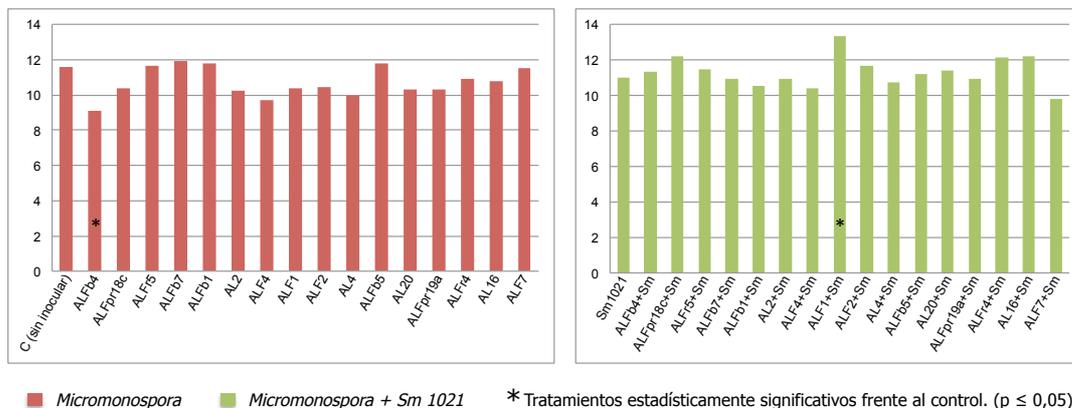


Figura 18. Medias del número de entrenados del tallo en los tratamientos llevados a cabo.

### Relación ancho/largo de los foliolos

Este parámetro es utilizado en agronomía como sustitutivo de la superficie foliar. Se obtiene midiendo el ancho y el largo de un foliolo y haciendo el cociente entre ellos (Figura 19). Su valor se mantiene bastante constante en los dos grupos experimentales.

#### Relación ancho/largo de los foliolos

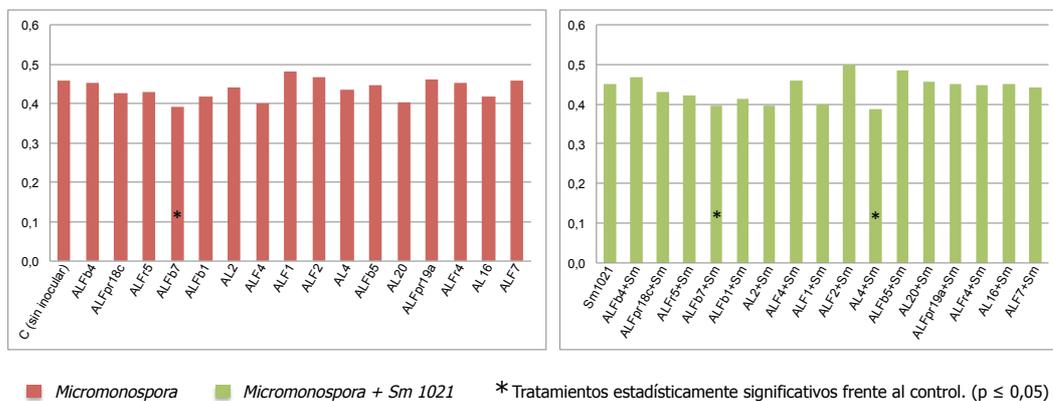


Figura 19. Medias de la relación ancho/largo de los foliolos en los tratamientos realizados.

### Diámetro de la corona

La corona es el punto de unión entre el tallo y la raíz y fue medido con un pie de rey (Figura 20). El diámetro de la corona tiene importancia puesto que de su tamaño depende el número de tallos que pueden aparecer en los rebrotes,

Diámetro de la corona

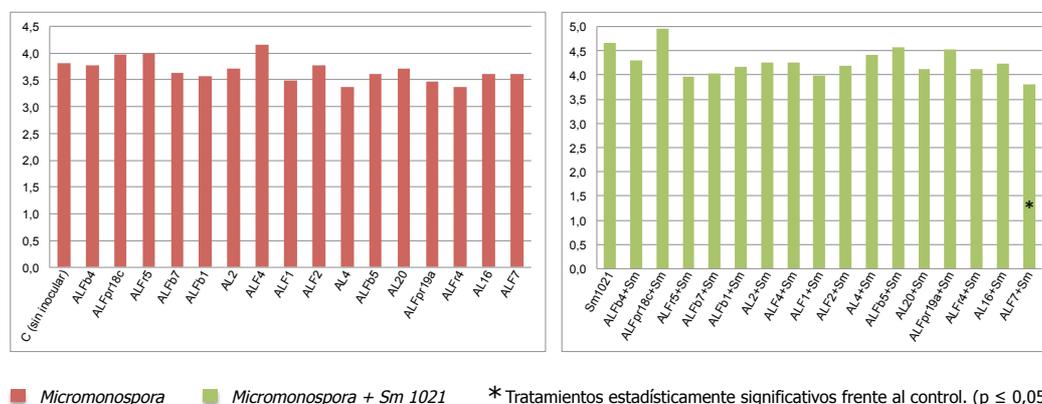


Figura 20. Medias del diámetro de la corona en los tratamientos realizados.

Las plantas inoculadas con las cepas de este estudio mantenían un diámetro relativamente constante y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, sí que observamos que en su mayoría, las plantas coinoculadas tenían un diámetro de corona mayor (4,3 mm frente a 3,7mm).

### Evaluación global de los resultados de crecimiento y nutrición nitrogenada

En este análisis pormenorizado, parámetro a parámetro, podemos perder la perspectiva del efecto global, sobre el crecimiento de la planta, de las cepas microbianas utilizadas, en cada uno de los tratamientos.

Los métodos de análisis y representación, HJ Biplot, permiten estudiar las observaciones realizadas de todos los parámetros en todos los ensayos a una escala global, sin sesgos, que no depende de lo que el investigador esté buscando, primero se recopilan todas las observaciones, y luego se le busca el sentido.

Por este motivo se decidió realizar un análisis y representación gráfica de todos los parámetros y observaciones realizadas en este apartado, que se han agrupado bajo el epígrafe "Crecimiento y Nutrición Nitrogenada". El objetivo es analizar sólo los parámetros que habitualmente se estudian para determinar el crecimiento y productividad vegetal, incluyendo el carbono y el nitrógeno, para tener una visión más clara e integradora, pero sólo con estos parámetros.

En la figura 21 se muestran los resultados de este tipo de análisis. Podemos ver los resultados para todas las observaciones individuales en el recuadro superior izquierdo y los mismos datos pero representando sólo las medias de los experimentos en formato grande. Se han puesto en mayor tamaño estos últimos por que son muy claros para su interpretación aunque seamos

conscientes de que se esta perdiendo parte de la información. En cualquier caso las gráficas son muy similares.

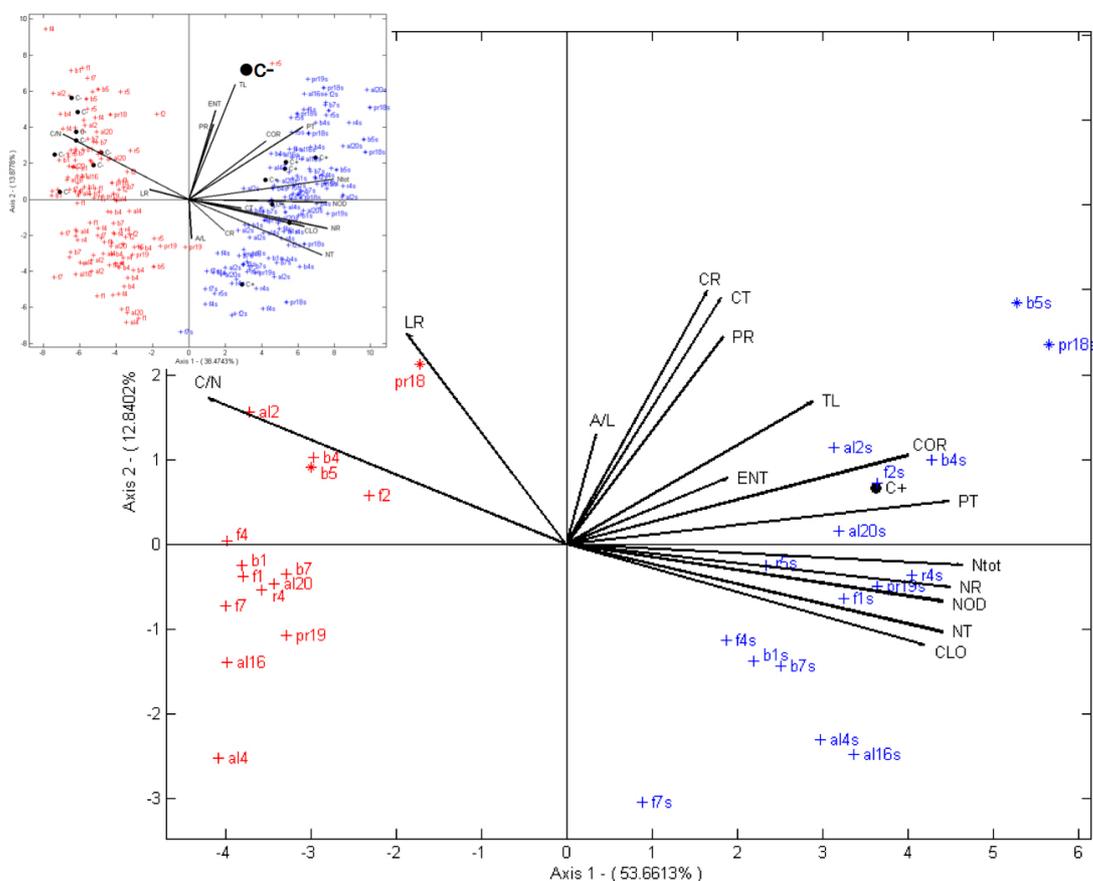


Figura 21. HJ Biplot que muestra de forma gráfica los resultados del análisis multivariante de todos los parámetros relacionados con el crecimiento y la nutrición nitrogenada de las observaciones en los 34 tratamientos. En la parte superior izquierda se muestran todas las observaciones. En grande se muestran los mismos resultados para las medias de las observaciones. En azul se representan las observaciones de plantas coinoculadas con *Micromonospora* y *Sinorhizobium meliloti*, en rojo las de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* y en negro los controles de cada experimento. Los vectores representan los parámetros analizados.

El primer hecho que se observa en ambas gráficas es la clara separación entre dos nubes de puntos que agrupan todas las observaciones de las plantas monoinoculadas por un lado y las coinoculadas por otro (Figura 5). Esta separación es aun mayor que cuando se analizan todos los parámetro de forma conjunta como el realizado en la figura 5.

El segundo hecho destacable, es que aparecen dos cepas, entre las observaciones de las plantas coinoculadas, claramente destacadas del resto por su potencial PGPR, las cepas ALFpr18c y ALFb5 de *Micromonospora* y en consecuencia, son los candidatos más prometedores. Estas cepas fueron seleccionadas para estudios posteriores, puesto que en condiciones naturales, en nuestra zona, la presencia de *Sinorhizobium* esta asegurada y por tanto son

los resultados de coinoculación los que interesan en este tipo de cultivos. De todas formas conviene reseñar que su comportamiento cuando se inocularon solas, también las sitúa entre las mejores cepas.

Y por último se confirma la fuerte correlación entre los parámetros clorofila, número de nódulos, nitrógeno del tallo y de la raíz nitrógeno total y peso del tallo y su peso en la distribución de las observaciones. También es de destacar la fuerte correlación negativa con la relación C/N y la poca o nula incidencia de los parámetros que miden el carbono en la raíz y el tallo el peso de la raíz y la relación A/L, que es un indicador de la superficie foliar. Todos estos parámetros están muy correlacionados entre sí.

Para acotar aún más este estudio, también se ha analizado por este mismo método los experimento realizados con plantas coinoculadas por un lado (Figura 22) y por otro las plantas monoinoculadas (Figura 23) por otro.

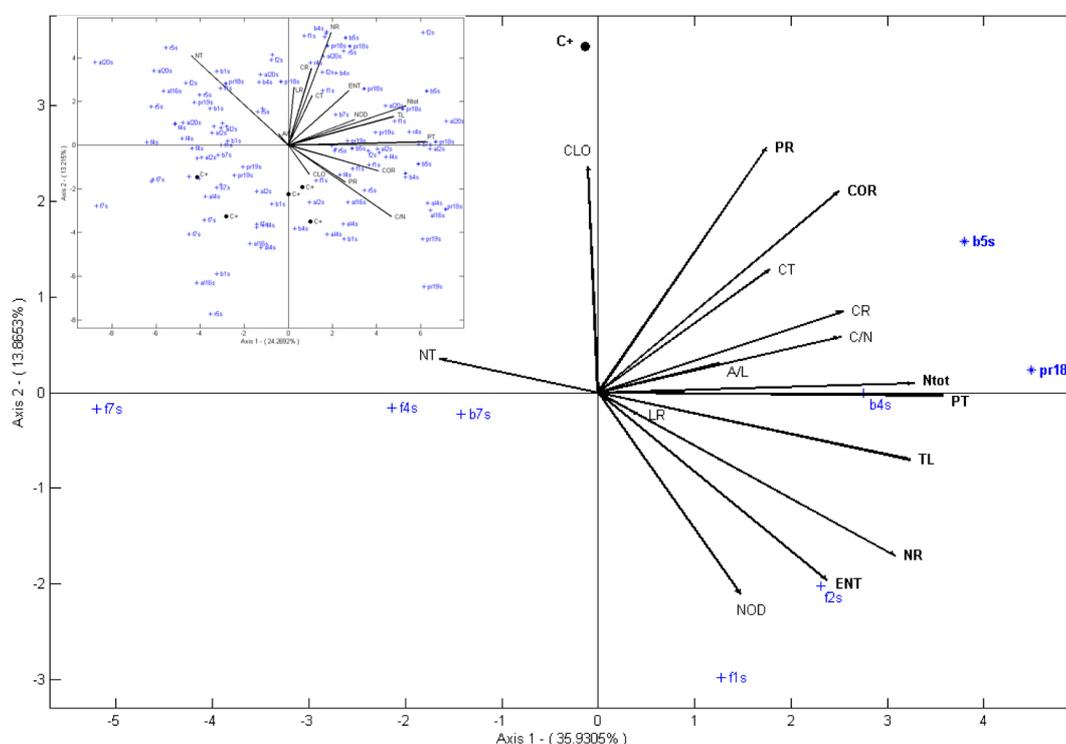


Figura 22. HJ Biplot que muestra de forma gráfica los resultados del análisis multivariante de todos los parámetros relacionados con el crecimiento y la nutrición nitrogenada las observaciones de los 13 tratamientos de coinoculación más su control. En la parte superior izquierda se muestran todas las observaciones de los 14 tratamientos. En grande se muestran los mismos resultados para las medias de las observaciones. Los puntos azules representan las observaciones de plantas coinoculadas con *Micromonospora* y *Sinorhizobium meliloti* y en negro los controles. Los vectores representan los parámetros analizados.

Los resultados de las plantas coinoculadas nos indican de forma aún más clara, que las cepas ALFpr18c y ALFb5 de *Micromonospora* son sin duda los mejores candidatos potenciales, como PGPR, para su posible explotación biotecnológica. Por tanto y tras confirmar este resultado estas cepas se eligieron, de forma

definitiva, para realizar los estudios de confirmación necesarios.

En cuanto a los resultados globales con las planta inoculadas sólo con las diferentes cepas de *Micromonospora* se representan en la figura 23.

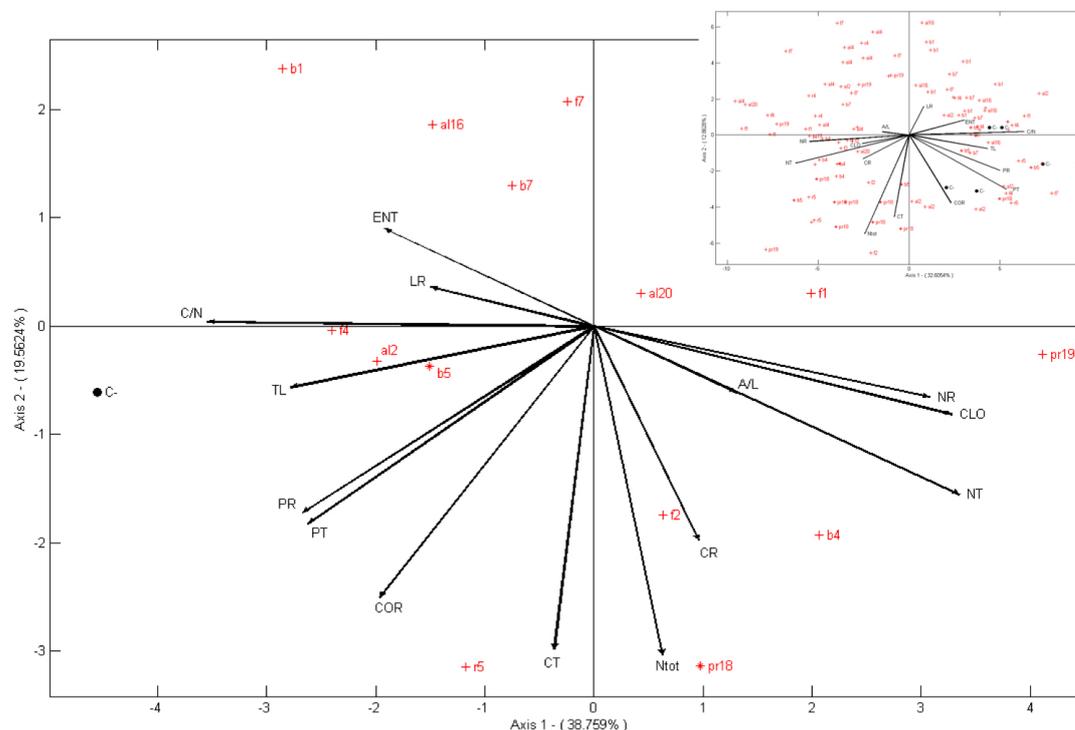


Figura 23. HJ Biplot que muestra de forma gráfica los resultados del análisis multivariante de todos los parámetros relacionados con el crecimiento y la nutrición nitrogenada y las observaciones de los 13 tratamientos de inoculación con las cepas de *Micromonospora* más su control. En la parte superior derecha se muestran todas las observaciones de los 14 tratamientos. En grande se muestran los resultados de las medias de dichas observaciones. Los puntos rojos representan las observaciones de plantas inoculadas con *Micromonospora* y en negro los controles. Los vectores representan los parámetros analizados.

De acuerdo con esta representación, en la que se han eliminado las observaciones de las plantas coinoculadas, la cepa ALFpr18c es también un excelente candidato como PGPR en estas condiciones. De hecho es el mejor si tenemos en cuenta el peso del vector nitrógeno total que en definitiva resume la productividad de la parte cosechable de la alfalfa.

### Ionómica

La deficiencia en macronutrientes: nitrógeno, fosforo, potasio y azufre afecta fuertemente al tipo y cantidad de metabolitos producidos por las cosechas con importantes efectos sobre la productividad, la calidad nutricional de esta e incluso sobre su resistencia a enfermedades.

Los micronutrientes son elementos esenciales para el crecimiento de la planta, pero son requeridos en cantidades mucho menores que los macronutrientes y

normalmente no plantean problemas en suelos agrícolas fértiles. Las plantas muestran necesidades diferentes para ciertos micronutrientes pero hay una serie de ellos que se consideran esenciales para todas las plantas superiores, estos son: boro, cloro, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, níquel y zinc. Puede que esta lista se amplíe en el futuro según se descubran nuevas estructuras proteicas o nuevos sistemas de regulación con componentes metálicos asociados. Además, en las plantas que forman simbiosis con *Rhizobia*, se considera un microelemento importante el cobalto, ya que aunque no es esencial para la planta en sí, sí lo es para el funcionamiento de varias enzimas relacionadas con la fijación de nitrógeno, y por ello el aporte de este nutriente en la fertilización favorece el crecimiento de las leguminosas.

Dada la importancia funcional de los micronutrientes, y clara su implicación en los tratamientos que no han sido inoculados con *Sinorhizobium* (Figura 5), estos elementos se analizaron de forma separada en este segundo bloque de observaciones.

### Azufre

Es un componente de muchos compuestos biológicos importantes incluyendo aminoácidos (cisteína y metionina), sulfolípidos y muchos metabolitos secundarios. Probablemente el azufre sea uno de los nutrientes mejor descritos en relación al comportamiento de transcritos y metabolitos durante la respuesta a deficiencias.

La mayor concentración de azufre en el tallo la encontramos en el control negativo sin inocular, lo que puede indicar un cierto desequilibrio nutricional en la planta, mientras que la inoculación con cualquiera de las cepas de *Micromonospora* disminuye significativamente su concentración (Figura 24). De hecho la concentración media de este elemento en los dos bloques de tratamientos son 0,35% para los monoinoculadas y 0,30% para las coinoculadas mientras que la media para el control negativo es de casi 0,5%.

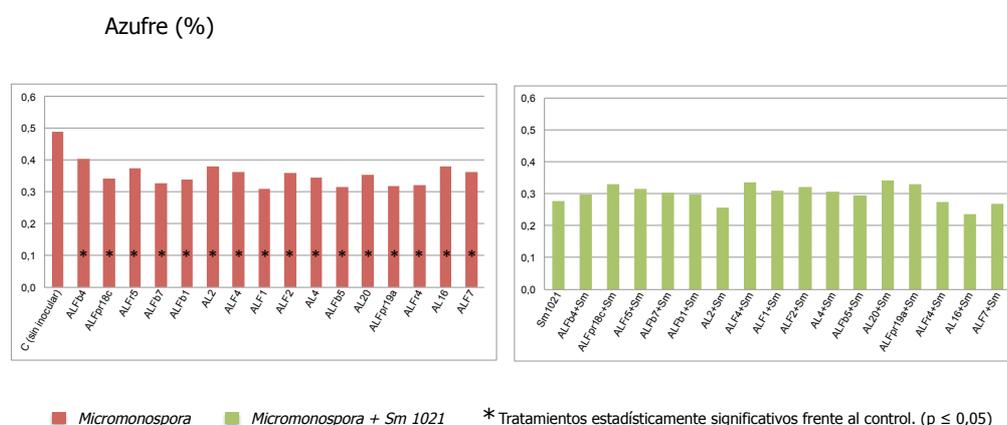


Figura 24. Medias del porcentaje de azufre de la parte aérea en los tratamientos realizados.

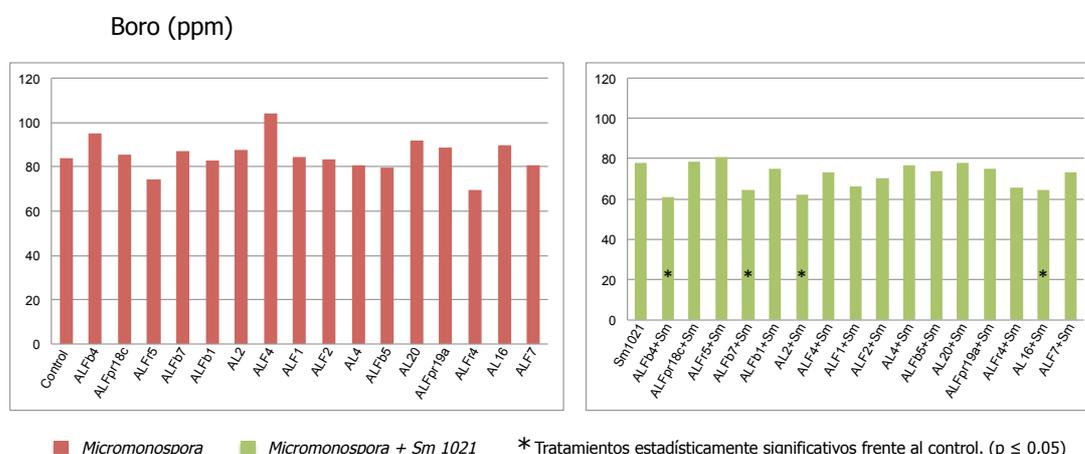
En el caso de las plantas coinoculadas hay pocas diferencias entre los tratamientos y ninguna significativa entre el control y los distintos experimentos, pero el contenido en azufre es menor que en el control sin inocular y en algunos de los tratamientos monoionoculados, sugiriendo que la concentración óptima de azufre sea más cercana a las que presentan los tratamientos coinoculados.

## Boro

La inusual naturaleza del boro sugiere la posibilidad de que desempeña una amplia variedad de funciones biológicas, pero se desconoce su función metabólica exacta. El boro está involucrado en un gran número de procesos como síntesis de proteínas, respiración, metabolismo de hormonas etc. Más del 90% del boro que se encuentra en la planta se localiza en las paredes celulares.

La concentración media de este elemento en los dos bloques de tratamientos es de 85,2 ppm en las plantas monoionoculadas y 71,6 ppm en las coinoculadas. Hay una diferencia importante entre estos dos grupos de tratamientos.

La concentración de boro no presenta diferencias significativas, tras la inoculación de *Micromonospora*, en las plantas monoionoculadas y sólo en cuatro casos en las plantas coinoculadas parece disminuir significativamente. (Figura 25).



bacteria, sin embargo, la falta de datos acerca de las funciones del boro, sumado a que las diferencias entre el control sin inocular y los tratamientos con *Micromonospora* no son muy grandes y en ningún caso significativas hace necesario llevar a cabo más estudios para la comprensión de este resultado.

## Zinc

El zinc es un componente importante de enzimas de síntesis de proteínas y producción de energía. La mayoría de las proteínas con zinc tienen un papel en la regulación de la transcripción del ADN, el procesamiento del ARN y la traducción. Se ha observado un retraso en la maduración de plantas por la carencia de zinc.

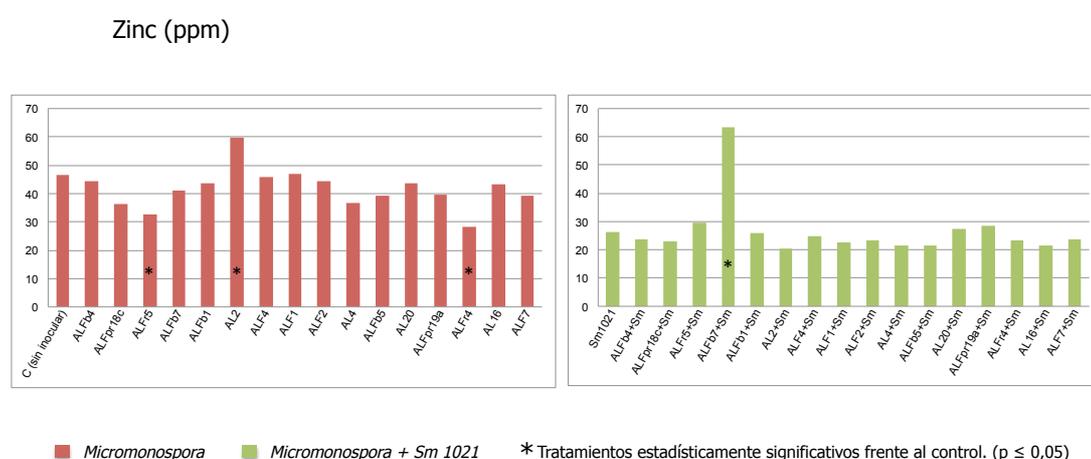


Figura 26. Medias en ppm del zinc medido en la parte aérea en los tratamientos realizados.

La concentración media de zinc en las plantas coinoculadas es de 26,5 ppm mientras que en las monoinoculadas es de 41,9. Las plantas coinoculadas en general contienen menos zinc que aquellas sólo inoculadas con *Micromonospora*, pero en pocos tratamientos hay variaciones con significación estadística frente a sus controles. En general los valores de la mayoría de los experimentos es parecida o inferior a la de sus controles respectivos. La excepción es la cepa AL2 entre las monoinoculadas, y ALFb7 cuando está coinoculada con Sm1021. Las dos cepas provocan un incremento significativo y muy pronunciado de la concentración de zinc (Figura 26). *Sinorhizobium* debe ejercer algún cambio en el metabolismo, o quizá los nódulos sean un sumidero de zinc, ya que este elemento está involucrado en una gran cantidad de procesos.

## Calcio

El calcio en las plantas es esencial para la estructura celular y también funciona como un mensajero secundario. Su deficiencia suele ir ligada a suelos de pH ácido, con los problemas que este tipo de suelo provoca para el crecimiento de

la alfalfa. También la nodulación de la alfalfa se ve inhibida cuando hay falta de calcio en suelos ácidos (Pijnenborg *et al.*, 1991). Existe, además una interacción entre el calcio y el azufre que afecta al crecimiento de *Medicago sativa* (Aulakh & Dev, 1978).

El contenido medio de calcio en las plantas monoinoculadas es del 2,65% mientras que en las coinoculadas es del 2,14%. En este parámetro las diferencias entre ambos grupos de experimentos no es tan acusada como en el precedente.

Se observa una disminución significativa en el porcentaje de calcio de las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora*, en 10 de los tratamientos, en el resto la tendencia es la misma pero las diferencias no son significativas. En las plantas coinoculadas no se observa una tendencia tan clara en todos los tratamientos, pero todos los tratamientos que tienen diferencias significativas con el control tienen un contenido en calcio menor que el control (Figura 27).

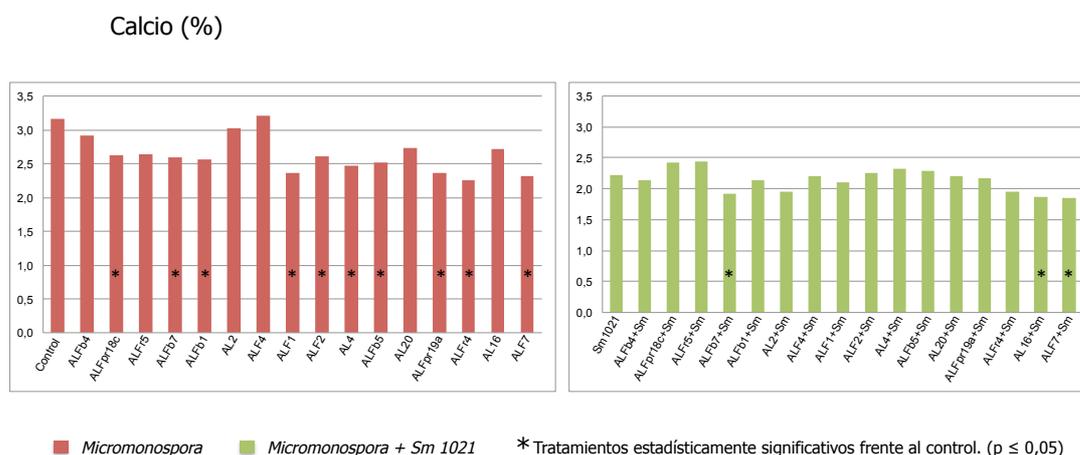


Figura 27. Medias del porcentaje de calcio de la parte aérea en los tratamientos realizados.

## Sodio

El sodio es un elemento que tradicionalmente ha sido más estudiado por su efecto negativo en altas concentraciones que como un elemento esencial. Químicamente similar al potasio, suele entrar por canales no específicos que transportan normalmente potasio, pese a que también existen transportadores específicos de sodio. Debido a esta similitud, el sodio puede sustituir al potasio en algunas enzimas en las que este participa y pueden tener un efecto positivo en el crecimiento siempre que sus valores se mantengan bajos, incluso en ciertos momentos es preferible la presencia de iones sodio en sustitución de los iones potasio (Pilon-Smits *et al.*, 2009). Pese a esta limitación, el sodio puede ser utilizado como fertilizante en cosechas ya que es un elemento esencial en animales.

Hay una gran variabilidad en los efectos de las distintas cepas de *Micromonospora* respecto a este elemento (Figura 28). Sólo la cepa ALF2, en los tratamientos monoinoculados, proporciona a la planta una cantidad significativamente mayor que la del control. Las cepas ALFr5 y ALFb1, tienen el efecto contrario, causan que la planta tenga una concentración significativamente menor de sodio. De entre las coinoculadas, sólo los tratamientos con las cepas ALFr5 y ALF1 provocan que la planta tenga un contenido significativamente mayor que el control de este elemento. Salvo por estos, los demás tratamientos se mantienen parejos y hay pocas diferencias incluso entre el tratamiento coinoculado y el monoinoculado de una misma cepa.

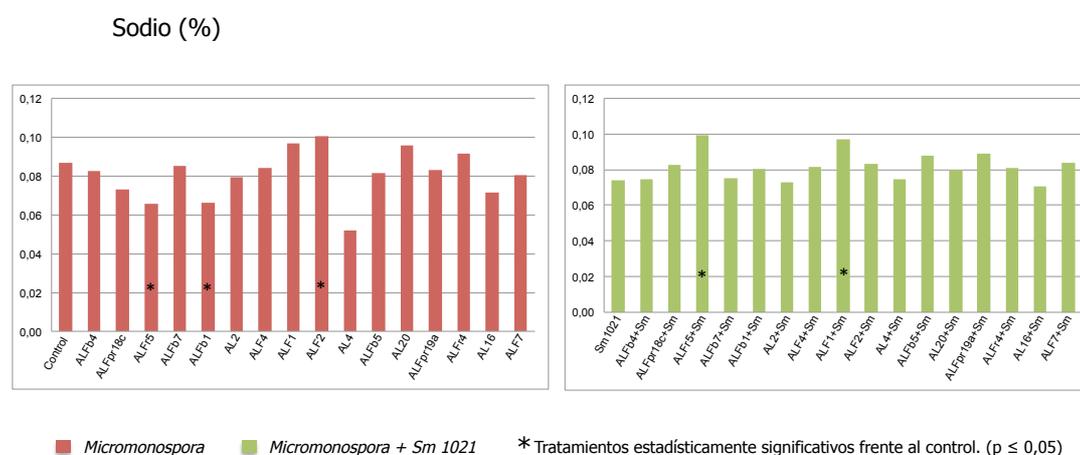


Figura 28. Medias del porcentaje de sodio de la parte aérea en los tratamientos realizados.

### Cobre

Esencial para la fotosíntesis (más del 50% del cobre de una planta se encuentra en los cloroplastos) y respiración mitocondrial, para el metabolismo del carbono y del nitrógeno y también es esencial en la formación de las paredes celulares. Su metabolismo está fuertemente unido al del hierro.

El cobre tampoco es un elemento cuya concentración se vea alterada por la presencia de *Micromonospora* (Figura 29). Sus cantidades se mantienen relativamente constantes en las plantas coinoculadas aunque se observa una tendencia de todas las cepas de *Micromonospora* a un ligerísimo ascenso, y algo similar ocurre en las cepas monoinoculadas, en las que sólo destaca un aumento significativo en los tratamientos con la cepa ALFb4.

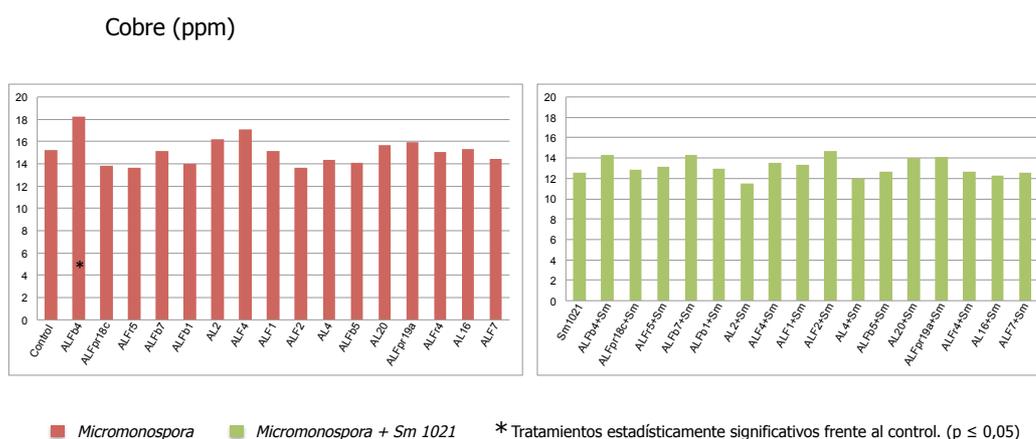


Figura 29. Medias en ppm del cobre medido en la parte aérea en los tratamientos realizados.

El cobre es un elemento de gran importancia por su relación con la fotosíntesis. Es posible que debido a su gran importancia, los niveles de este elemento en todos los tratamientos permanece relativamente homogéneo, con la única excepción de ALFb4 monoinoculada, que es el único tratamiento que es significativamente superior a su control. Una vez más, el contenido en cobre de los tratamientos coinoculados es ligeramente menor que el de las plantas monoinoculadas.

### Fósforo

Es un componente estructural mayoritario de los ácidos nucleicos y lípidos de membrana y también toma parte en rutas regulatorias como la del fosfatidil inositol. También están presentes en la moléculas de intercambio energético. Se trata de un macronutriente de vital importancia en los seres vivos, su deficiencia causa cambios profundos en el metabolismo celular y el reciclaje de fósforo a partir de otras moléculas orgánicas (Ammann & Armengaud, 2009).

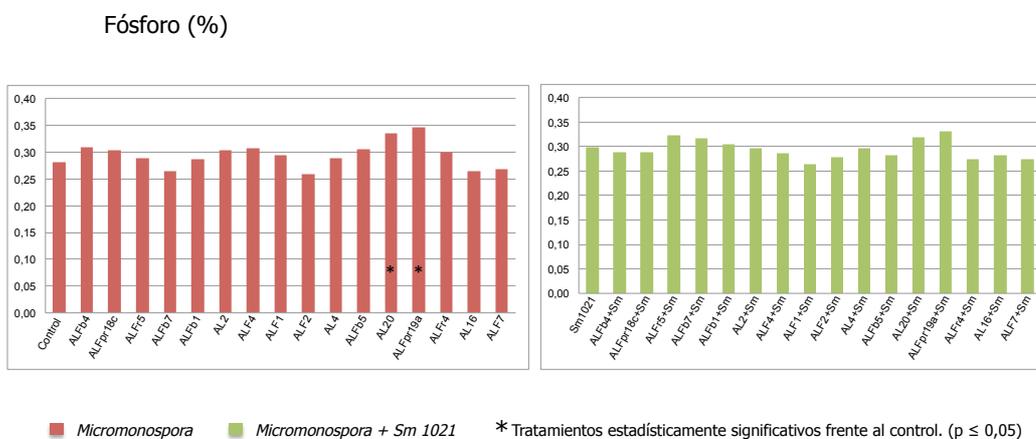


Figura 30. Medias del porcentaje de fósforo de la parte aérea en los tratamientos realizados.

Por los datos obtenidos el fósforo no varía mucho en plantas inoculadas con ningún endofito ya que sus concentraciones se mantienen sin cambios tanto en plantas coinoculadas como en las monoinoculadas y dada su importancia no es sorprendente que su concentración en casi todos los tratamientos permanezca dentro de unos límites y sea muy similar. El contenido medio en fósforo de los dos grupos de tratamientos es de 0,29% en plantas mono y coinoculadas.

Sólo dos tratamientos con las cepas AL20 y ALFpr19a (Figura 30) son significativamente superiores al control en plantas monoinoculadas, en las coinoculadas, aunque no son significativas, observamos una tendencia similar, siendo sus medias superiores a las del control inoculado sólo con *Sinorhizobium*.

### Hierro

Al ser un metal activo en reacciones redox, está involucrado en la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, asimilación de nitrógeno etc.. Hasta el 80% del hierro se encuentra en los cloroplastos, lo que es consistente con su importante función en la fotosíntesis.

Pese a la demostrada capacidad de producción de sideróforos por todas las cepas de *Micromonospora* de este estudio, no parece que la planta pueda tomarlos una vez han sido secuestrados por la bacteria, ya que en el caso de las plantas monoinoculadas casi todos los tratamientos tienen una concentración menor de hierro que el control, y los resultados significativos, 5 en total, son siempre significativamente menores que el control (Figura 31).

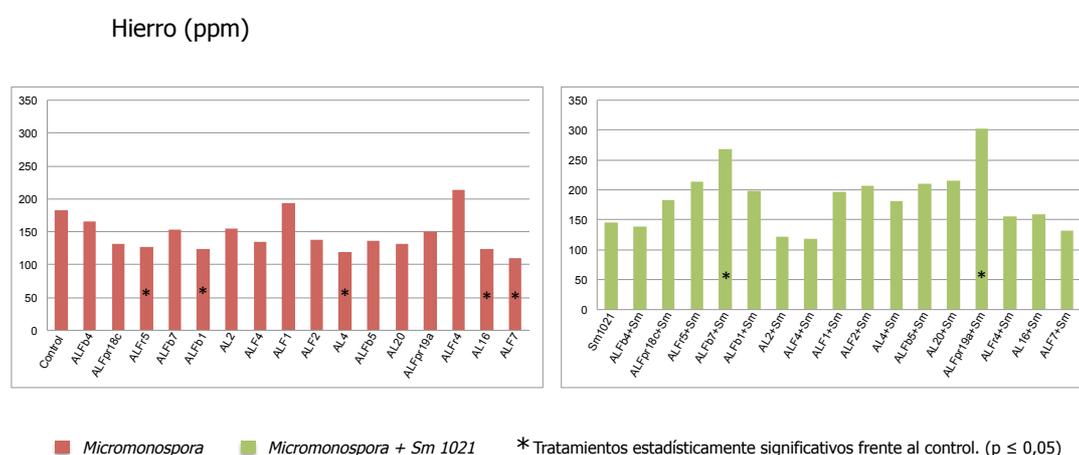


Figura 31. Medias en ppm del hierro de la parte aérea en los tratamientos realizados.

En las plantas coinoculadas se observa la situación opuesta, las plantas de muchos de los tratamientos contienen más hierro que el control aunque sólo dos tratamientos (ALFb7 y ALFpr19a) son significativamente superiores en la cantidad de hierro que contienen.

## Magnesio

Su concentración en planta es de 0,2 a 0,4% de peso seco y se encuentra principalmente la clorofila, y tiene un importante papel en la síntesis de ATP. También tiene función en la estabilización de membranas. Uno de los primeros síntomas en la deficiencia de magnesio es una disminución de la fotosíntesis seguida del cese de transcripción de ARN y traducción a proteínas. El exceso de aluminio en el suelo es una de las principales causas de deficiencia de magnesio en la planta.

Los resultados globales nos indican que la concentración de magnesio se mantiene muy parecida en los dos bloques de experimentos (0,26% para las plantas monoinoculadas y 0,21% para las coinoculadas). De acuerdo con las gráficas de la figura 32, las diferencias entre los tratamientos no son significativas en su mayoría. Observamos que las plantas monoinoculadas tienen una concentración ligeramente mayor de magnesio que las coinoculadas, pero las diferencias no son muy notables entre tratamientos. Un único tratamiento tenía un contenido significativamente menor en plantas monoinoculadas (AL4) y otro era significativamente mayor en las coinoculadas (AL20).

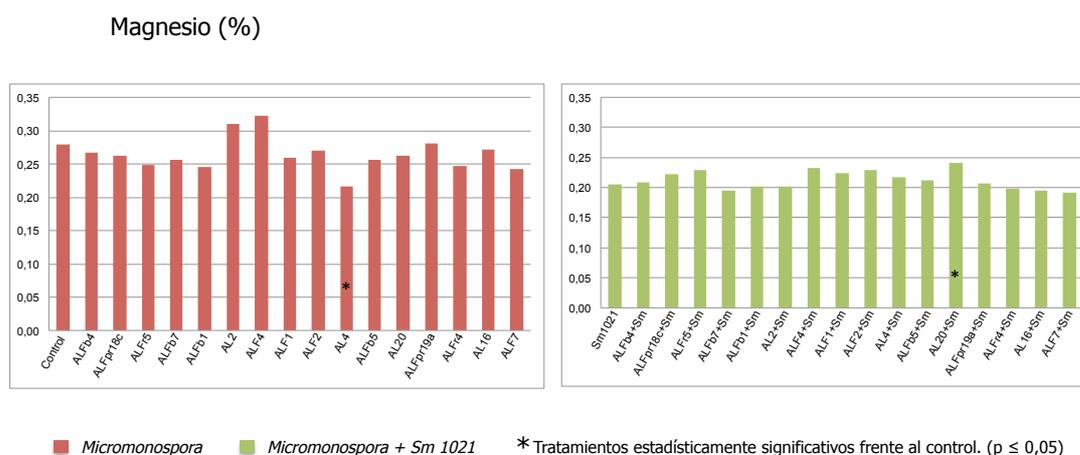


Figura 32. Porcentaje medio del magnesio de la parte aérea en los tratamientos realizados.

El magnesio y el calcio están muy estrechamente relacionados (Watanabe *et al.*, 2006), por lo que no es sorprendente que aumenten de una manera parecida en los tratamientos con las mismas cepas de *Micromonospora*. Pese a esto, en general sus cantidades disminuyen en casi todos los tratamientos con respecto a sus respectivos controles, aunque ambos elementos son siempre mayores en las plantas no coinoculadas. Cabe destacar las cepas AL2 y AL4, cuya cantidad de calcio en las cepas monoinoculadas no varía sustancialmente respecto al control, mientras que el resto de tratamientos tienen una disminución significativa (test LSD) con respecto a ese mismo control. Estas mismas cepas, son las que un mayor contenido en magnesio presentan, siendo mayor que el

contenido del control sin inocular. Las cepas coinoculadas no sufren variación con respecto al control inoculado sólo con *Sinorhizobium*.

### Manganeso

Esencial para el metabolismo y desarrollo vegetal, se encuentra en 35 enzimas diferentes, siendo sus funciones, servir de metal catalíticamente activo, o actuar como un activador de enzimas. En esta segunda función puede ser sustituido por el magnesio.

Este elemento se encuentra en cantidades muy elevadas en el control negativo y en algunos tratamientos monoinoculados, sin embargo, la mayoría son significativamente menores que el control. La concentración media de este elemento en las plantas monoinoculadas es superior (173,8 ppm) al de las plantas coinoculadas (140,2 ppm). Entre las plantas de este grupo sólo hay un tratamiento que aumenta significativamente su contenido en manganeso, es interesante que se trate de la misma cepa cuyo valor se acerca al del control en las plantas monoinoculadas: ALF2 (Figura 33). Esta cepa parece aumentar el contenido en manganeso de la planta en ambos grupos de tratamientos.

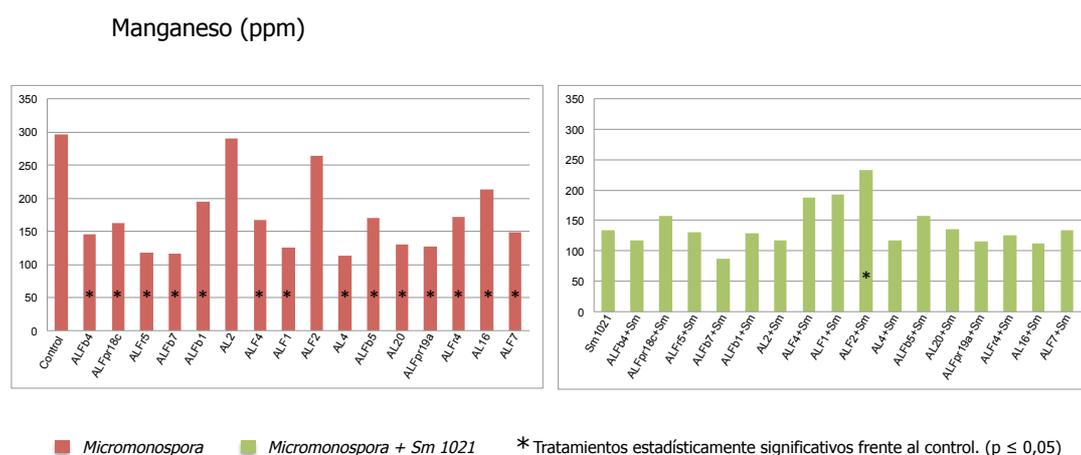


Figura 33. Medias del manganeso medido en la parte aérea en los tratamientos realizados.

Pese a que el manganeso es un elemento esencial, puede que la disminución de su concentración no afecte a la planta (de hecho, todos los tratamientos presentaban un aspecto sano), que la concentración en el control supera la necesaria por la planta, cosa que podría resultar en toxicidad, o que hay suficiente magnesio para reemplazar al manganeso que falta (Marschner, 1995).

### Potasio

Pese a que el potasio no es metabolizado, este elemento es esencial en muchos

procesos celulares, como transporte, activación de enzimas y traducción en ribosomas. Su deficiencia causa un acumulo de azúcares solubles, algunos aminoácidos y la desaparición de otros aminoácidos, ácidos y nitrato entre otros muchos síntomas.

La concentración media de este elemento en las plantas monoinoculadas es ligeramente inferior (2,2%) al de las plantas coinoculadas (2,25%).

Su porcentaje en la parte aérea, tiene una tendencia a aumentar en todos los tratamientos que tienen *Micromonospora*, salvo una excepción (ALFb7 monoinoculada), respecto a los dos controles que no la tienen (control sin inocular y plantas inoculadas sólo con *S. meliloti* 1021). Pero sólo hay 4 cepas entre los tratamientos monoinoculados y 2 entre los coinoculados cuyo contenido en potasio es significativamente mayor que sus respectivos controles (Figura 34), es factible que este aumento se deba a una mejora de la absorción de este elemento facilitada por *Micromonospora*, como ocurre con otros nutrientes.

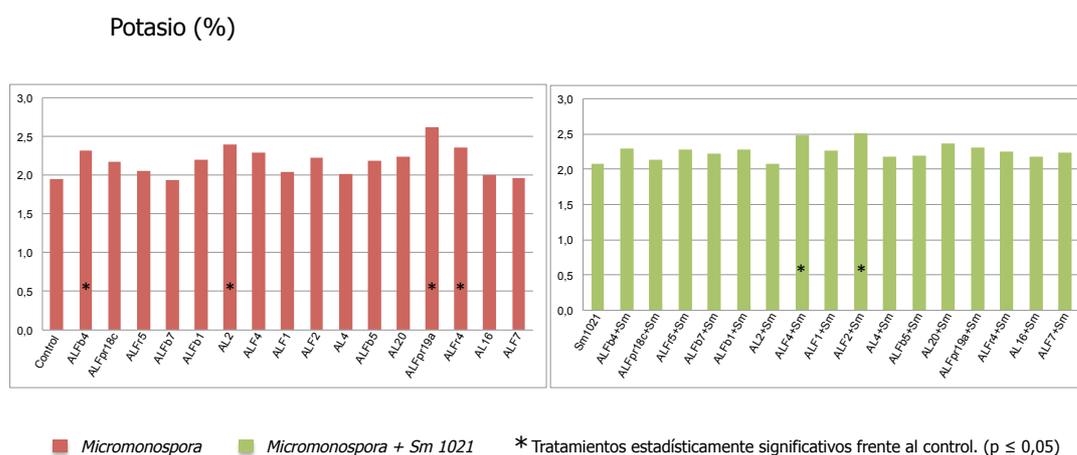


Figura 34. Porcentaje medio de potasio de la parte aérea en los tratamientos realizados.

### Evaluación global de los resultados de ionómica

El análisis parámetro a parámetro que se ha realizado, permite estudiar los detalles del comportamiento de las plantas frente a los tratamientos de este estudio, pero podemos perder la perspectiva del efecto global.

Siguiendo el esquema de análisis de las observaciones que nos hemos marcado, también en este apartado se ha realizado un análisis multivariante y la representación HJ Biplot de todos los parámetros y observaciones realizadas en este apartado, incluyendo el carbono y el nitrógeno, para tener una visión integradora de todos los datos analíticos. En la figura 35 se muestran los resultados de este análisis.

En el recuadro inferior izquierdo, se muestran los resultados para todas las

observaciones individuales y los mismos datos pero representando sólo las medias de los experimentos en formato grande. Se han puesto en mayor tamaño estos últimos por que son más claros para su interpretación aun sabiendo que se esta perdiendo parte de la información. Las dos gráficas son muy similares.

Cuando se estudian los datos analíticos de los elementos minerales en los diferentes tratamientos, los resultados muestran, también en este caso, una separación de los tratamientos en dos grupos. Sin embargo, esta separación es mucho menos clara que la observadas en la figura 21 para los datos de crecimiento y nutrición.

El primer hecho destacable, es que las observaciones individuales de todos los tratamientos se mezclan en una zona de la gráfica. La separación entre los datos de los tratamientos monoinoculados y coinoculados dejan de estar perfectamente clara en esta gráfica. Esto debe ser interpretado en el sentido de que estos parámetros tienen una menor incidencia en la distribución global de las observaciones, en la representación gráfica del análisis multivariante de los resultados. Esta diferencia es menos marcada, aunque también se aprecia claramente, para las medias de las observaciones.

El segundo hecho de interés, es que las observaciones, que están representadas como puntos rojos (monoinoculadas), azules (coinoculadas) y negros (controles), aparecen muy dispersos en la gráfica. Esto nos indica que la similitud entre los resultados es baja. Este hecho contrasta con el observado para los parámetros de crecimiento (Figura 21) en los que se aprecia un fuerte agrupamiento entre las observaciones.

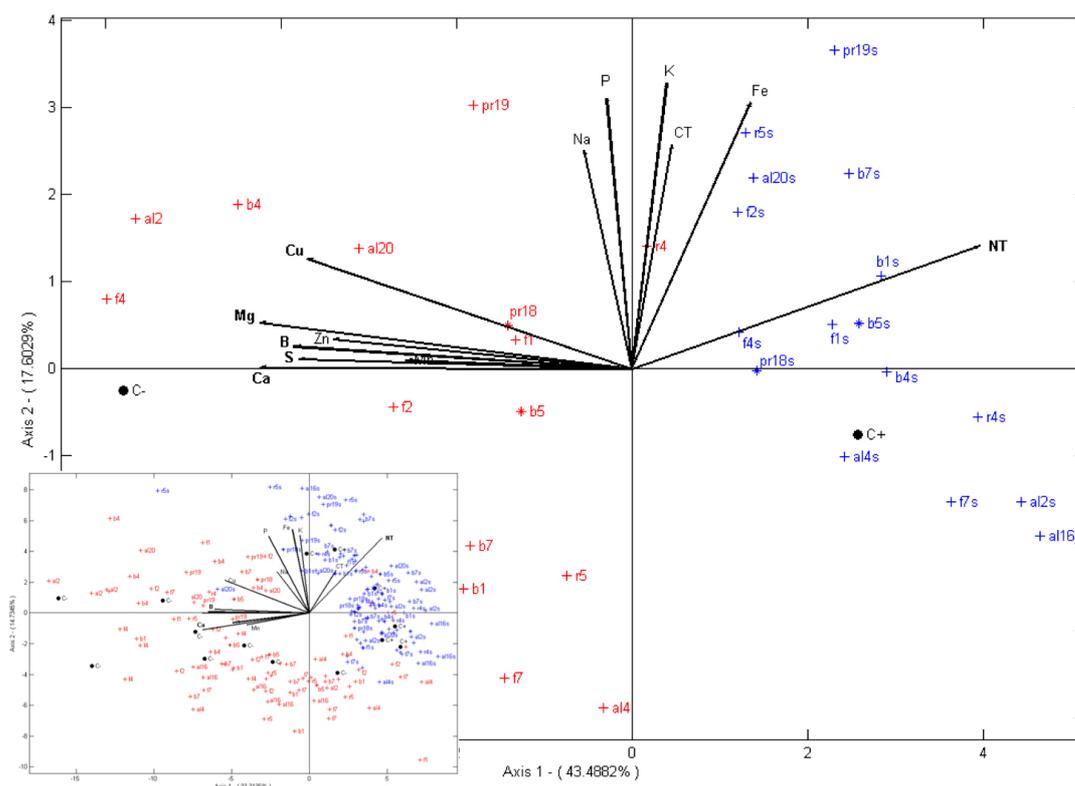


Figura 35. HJ Biplot que muestra de forma gráfica los resultados del análisis multivariante de todos los parámetros de ionómica y de las observaciones en los 34 tratamientos. En la parte inferior izquierda se muestran todas las observaciones. En grande se muestran los mismos resultados para las medias de las observaciones. En azul se representan las observaciones de, en rojo las de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* y en negro los controles de cada experimento. Los vectores representan los parámetros analizados.

Las variables con mayor peso en esta distribución son de un lado Ca, S, B, Mn, Zn, Mg, y Cu que presentan una correlación muy alta entre ellos y por el otro el nitrógeno del tallo y en menor medida el hierro. Las variables Na, P, K, y CT no tienen apenas influencia pero si muestran correlación entre ellas.

Estos resultados no han aportado información relevante para la selección de cepas para estudios posteriores. De todas formas conviene reseñar que la complejidad de los estudios de ionómica hace la interpretación de los resultados muy compleja y por esa razón, en este estudio, sólo lo hemos abordado desde un punto de vista descriptivo.

### Selección de cepas de interés agronómico

La selección de cepas, se ha basado en su capacidad para incrementar la mayoría de los parámetros de crecimiento y nutrición medidos. Este efecto PGPR aumenta la productividad de la parte aérea de las plantas de *M. sativa* en un porcentaje que oscila entre el 20% y el 30%. Este incremento es visible

tanto en las plantas coinoculadas como en aquellas que sólo se inocularon con *Micromonospora*.

Cuando *M. sativa* es inoculada solamente con las cepas seleccionadas de *Micromonospora*, la productividad se ve aumentada principalmente debido a que el porcentaje de nitrógeno en el tallo es mayor que el de las plantas control no inoculadas.

En plantas coinoculadas, se observa un efecto sinérgico entre *Micromonospora* y *S. meliloti*, ya que el número de nódulos aumenta en las plantas coinoculadas, lo que confirma los datos obtenidos en los ensayos en tubo. En este caso, el aumento en la productividad se debe al incremento en el peso seco de la parte aérea, dado que la relación C/N de la parte aérea no cambia.

Además del estudio de cada parámetro por separado, se ha realizado un análisis multivariante y la representación HJ Biplot de todos los parámetros y observaciones realizadas, para tener una visión integradora de todos los datos obtenidos en todos los experimentos del estudio y como se interpretan (Figuras 5, 21, 22 y 23).

De acuerdo con este análisis los resultados y su interpretación fueron mucho más claros, especialmente los resultados globales obtenidos de las plantas coinoculadas (Figura 22), que nos indican de forma inequívoca, que las cepas ALFpr18c y ALFb5 de *Micromonospora*, son sin duda los mejores candidatos potenciales, como PGPR, para su posible explotación biotecnológica. Por tanto y tras confirmar este resultado con los resultados del análisis de las variables de forma individualizada, estas cepas se eligieron, de forma definitiva, para realizar los estudios de confirmación necesarios.

En condiciones naturales, en nuestra zona, la presencia de *Sinorhizobium* esta asegurada y por tanto son los resultados de coinoculación los que interesan, para seleccionar las cepas para este tipo de cultivos. De todas formas conviene tener en cuenta su comportamiento cuando se inocularon solas. La cepa ALFpr18c es también un excelente candidato como PGPR en estas condiciones. De hecho es el mejor si tenemos en cuenta el peso del vector nitrógeno total que en definitiva resume la productividad de la parte cosechable de la alfalfa.

En la siguiente etapa se imponía realizar prácticas más próximas a una situación de cultivo real como fuese posible, para evaluar de forma más realista las cepas seleccionadas. Al ser una especie perenne, *M. sativa* es sembrada y se realizan varios cortes durante años sucesivos antes de cambiar el cultivo. Por tanto, en el experimento que se planteó las plantas de alfalfa sufrirían dos cortes en dos meses sucesivos de las cuales también se mediría el peso seco, la longitud de la parte aérea y el nitrógeno.

El protocolo para este experimento fue idéntico al utilizado en experimento anterior y se usó el mismo tipo de suelo.

## **Evaluación en invernadero del potencial como PGPR de las cepas de *Micromonospora* seleccionadas**

Para estos ensayos se ha utilizado la variedad Aragón de la alfalfa, que también ha sido utilizada en el resto de los ensayos. Esta variedad de la alfalfa es un ecotipo español, que se encuadra entre las alfalfas intermedias, en función de su parada invernal, que es corta. La alfalfa es un cultivo en el que se realizan varias cortes al año y durante 5 o 6 años seguidos antes de realizar una nueva siembra. En la variedad Aragón se realizan entre 5 y siete cortes al año. La frecuencia del corte y la fecha del último corte son criterios muy importantes para determinar el rendimiento y la persistencia de un alfalfar, ya que los cortes frecuentes implican un agotamiento de la alfalfa y por tanto causan una reducción en su rendimiento y densidad.

En las regiones cálidas la alfalfa se corta con el 10% de floración en otoño, primavera y a principios de verano, y con el 25-50% de floración durante el verano. Cuanto más avanzado es el estado vegetativo de la planta en el momento de defoliación, más rápido tiene lugar el rebrote siguiente. El rebrote depende del nivel de reservas reduciéndose éstas cuando los cortes son frecuentes, de forma que si se corta frecuentemente en estados tempranos de crecimiento, se provoca una insuficiente acumulación reservas en los órganos de almacenamiento y una reducción en el rendimiento

(<http://www.infoagro.com/herbaceos/forrajes/alfalfa2.htm>).

### Procedimiento

De acuerdo con esta información agronómica básica, se diseñó un experimento en invernadero, que simulara parcialmente estas condiciones de cultivo y observar el comportamiento de las plantas sometidas a diferentes tratamientos. Para este experimento se utilizaron macetas de 5 L con el mismo suelo agrícola de alta fertilidad, utilizado en experimentos anteriores. En cada maceta, preparada con suelo tinalizado, se trasplantaron 4 plántulas que habían sido previamente germinadas en condiciones axénicas y procedentes de semillas esterilizadas en superficie según la técnica habitual. Teniendo en cuenta que los cultivos en microcosmos, suponen un ambiente confinado que puede crear deficiencias, se realizaron dos cortes en este experimento. Se decidió realizarlos al principio de la floración (10% de plantas con flores), tal y como se recomienda, aunque sin prestar tanta atención a la altura de la planta, ya que los diferentes tratamientos hacía que las plantas tuvieran portes muy diferentes unas respecto a otras.

Las inoculaciones se realizaron en todas las plantas con la cepa 1021 de *S. meliloti* a partir de un cultivo líquido y los diferentes tratamientos se coinocularon, además con una cepa de *Micromonospora* que se escogió según los resultados obtenidos en el primer experimento de invernadero en el que se probaron 18 cepas diferentes. En este caso, las cepas que mejor efecto

producían sobre las plantas en las que eran inoculadas. Estas son: ALFpr18c y ALFb5.

Los resultados de este experimento fueron muy evidentes incluso antes de realizar los cortes. Se podían observar claramente en el porte de las plantas coinoculadas comparadas con el control inoculado con *S. meliloti* 1021, como se observa en las fotos tomadas algunas semanas antes del corte (Figura 36).



Figura 36. Ensayos de coinoculación. Izquierda plantas coinoculadas con la cepa de *Micromonospora* ALFpr18c y *S. meliloti* frente a su control. Derecha plantas coinoculadas con la cepa de *Micromonospora* ALFb5 y *S. meliloti* frente a su control. Los controles fueron inoculados sólo con la cepa 1021 de *S. meliloti*.

### Resultados y discusión

Tras los sucesivos cortes se midieron la longitud de la parte aérea, su peso seco y su contenido en nitrógeno. Los resultados se muestran en las figuras 37,38 y 39.

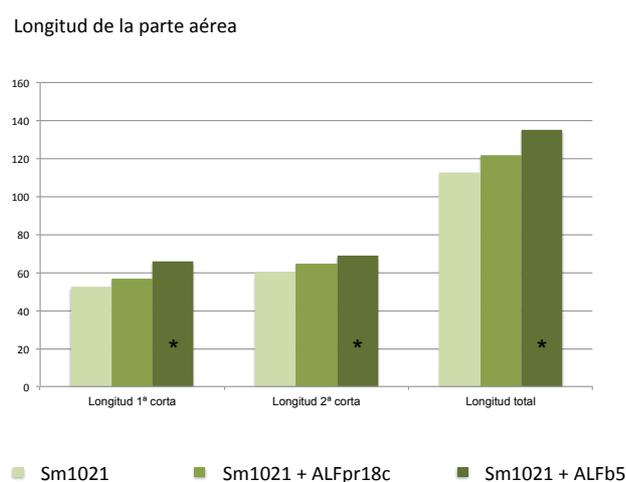


Figura 37. Longitud de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto a su control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

En la figura 37 se muestran los resultados de la longitud de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Podemos observar que este parámetro se incrementa en todos los tratamientos con *Micromonospora* pero sólo es estadísticamente significativo para el tratamiento de coinoculación con cepa ALFb5 tanto en la primera como en la segunda cosecha.

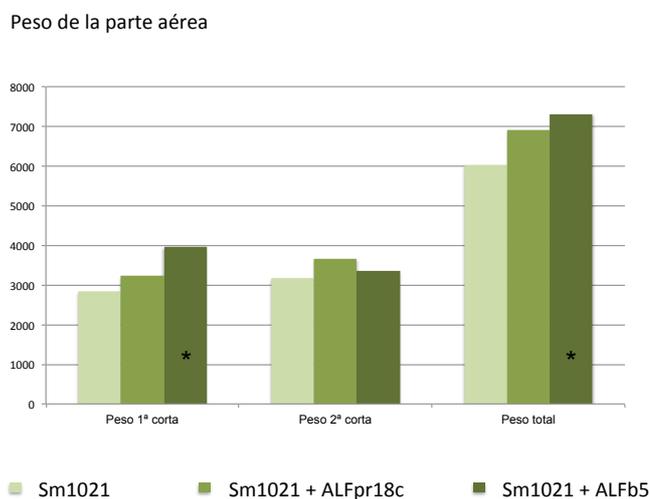


Figura 38. Peso de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto a su control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

En la figura 38 se muestran los resultados de peso seco de la parte aérea de las plantas con los distintos tratamientos. Podemos observar que el peso se incrementa en todos los casos pero sólo es estadísticamente significativo para el tratamiento de coinoculación con ALFb5 en la primera cosecha y en la producción total.

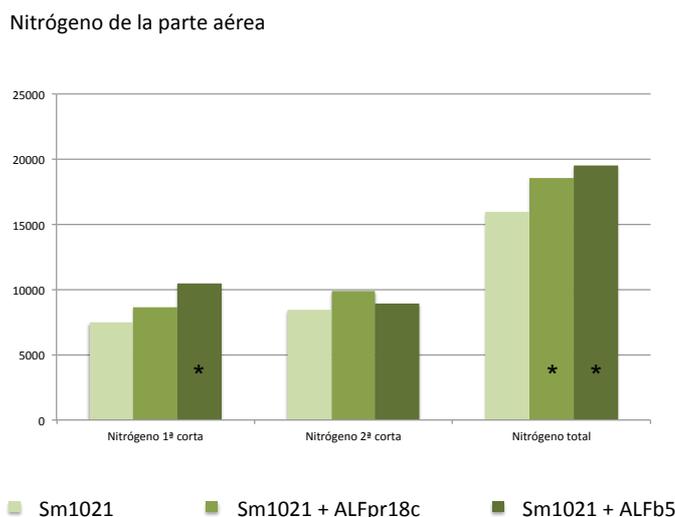


Figura 39. Nitrógeno total de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto a su control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

En la figura 39 se muestran los resultados del nitrógeno total de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Este parámetro es el más indicativo del beneficio obtenido con cada tratamiento puesto que contiene los dos parámetros más importantes de la cosecha: cantidad y contenido en nitrógeno. Observamos que también se incrementa en todos los casos y es estadísticamente significativo para los dos tratamientos de coinoculación con *Micromonospora*, si consideramos los datos finales de la cosecha.

Podemos deducir de estos resultados que ambos microorganismos son buenos candidatos para su explotación biotecnológica. Al contrario de lo observado en los experimentos precedentes, la cepa AFLb5 ha dado una respuesta mejor, en estas condiciones experimentales, pero la cepa ALFpr18c también sigue siendo un excelente candidato.

Debemos hacer notar que el peso seco tras la cosecha recolectada con el segundo corte, se incrementa tanto en el control como en las plantas coinoculadas con ALFpr18c pero no ocurre lo mismo con las plantas inoculadas con AFLb5. Este hecho puede tener trascendencia en la práctica agrícola si se confirma en ensayos de campo, puesto que puede indicar que la planta no ha acumulado suficientes reservas en la raíz y la corona para garantizar un rebrote adecuado tras la completa eliminación de la parte aérea de la planta.

Es importante para proponer su uso como posible inoculante, que su efecto sea duradero y el aumento en la producción de la alfalfa se mantenga en el tiempo, después de varias cortes, ya que es la situación real con la que se encuentran los agricultores y en este caso las cepas utilizadas cumplen este requisito.

En resumen, estas cepas de *Micromonospora* tienen un efecto notable sobre la productividad que es estadísticamente significativo en la longitud y el peso de la planta, y especialmente en el nitrógeno total de la parte aérea, que son parámetros esenciales para la explotación agrícola de esta leguminosa.

### **Potencial PGPR de las cepas aisladas en Australia**

El planteamiento experimental fue el mismo que el utilizado en los ensayos realizados con cepas de *Micromonospora* aisladas en España, la única diferencia se basa en el sustrato utilizado. Ya que estos microorganismos provenían de suelos muy pobres y arenosos (propios de Australia Occidental) que suelen tener enmiendas para su uso agrícola, el sustrato que se utilizó fue suelo arenoso de baja fertilidad complementado con compost en relación 1:1. Se utilizaron conos de 380 ml de capacidad en lugar de macetas (Figura 40) y 18 conos por experimento.



Figura 40. Fotografía de uno de los tratamientos. Se aprecian los conos usados en el experimento y las diferencias entre los controles inoculados con *S. meliloti* y las plantas coinoculadas.

Las plántulas se germinaron en semilleros en condiciones axénicas (material y métodos) y se trasplantaron a los conos cuando la parte aérea tenían aproximadamente un centímetro. Se coinocularon una semana después del trasplante, con *S. meliloti* 1021 y las 20 cepas aisladas en Australia. Para comparar los datos con los obtenidos con las cepas españolas se utilizaron plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021 y coinoculadas con *Micromonospora* ALFpr18c como controles.

Las plantas se recolectaron un mes tras la inoculación. Al finalizar el experimento se analizaron los parámetros que se consideraron más importantes para evaluar la acción PGPR de las 21 cepas utilizadas en el estudio: longitud y peso seco de la parte aérea y de la raíz y número de nódulos.

Los pesos se muestran en gramos, las longitudes en centímetros y el análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS con un ANOVA y test LSD.

## Resultados y discusión

### Longitud del tallo

En la figura 41 se muestran los resultados de la longitud de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos. Podemos observar que este parámetro se incrementa en todos los tratamientos con *Micromonospora* y estas diferencias son estadísticamente significativas incluyendo la cepa ALFpr18 que usamos para la comparación con las cepas españolas.

### Longitud del tallo

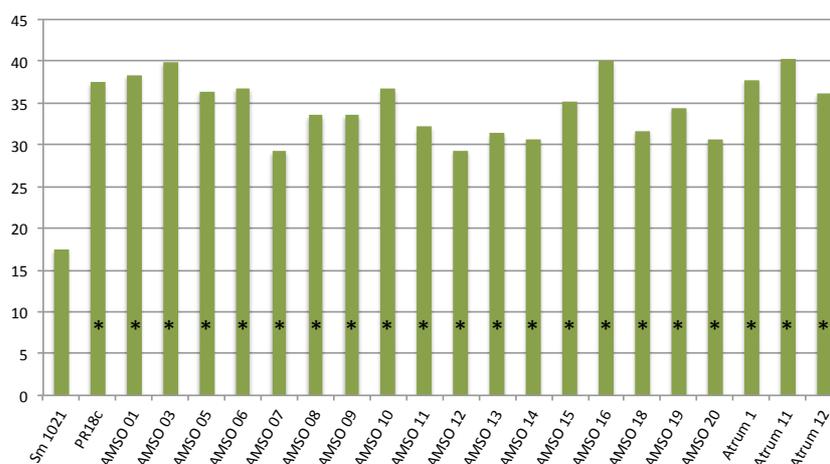


Figura 41. Resultados medios de la longitud del tallo en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

### Peso seco del tallo

En la figura 42 se muestran los resultados del peso seco de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos.

### Peso del tallo

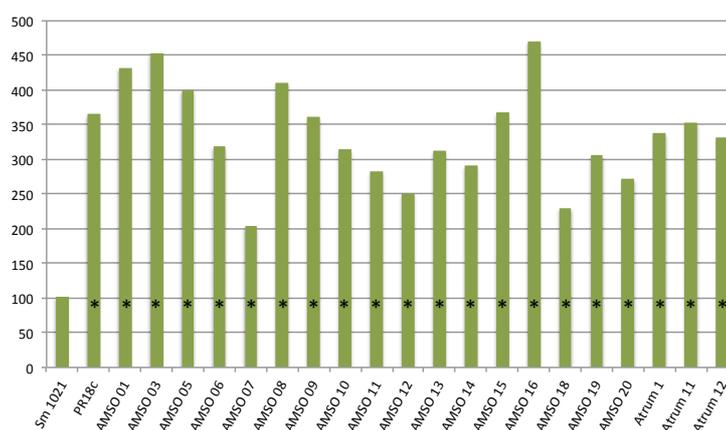


Figura 42. Resultados medios del peso seco del tallo en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

Podemos observar que el peso se incrementa en todos los tratamientos con *Micromonospora* y estas diferencias son estadísticamente significativas en todos los casos incluyendo la cepa ALFpr18 que usamos para la comparación con las

cepas españolas. En este parámetro existe una mayor heterogeneidad entre los tratamientos. La mayoría de las plantas inoculadas con cepas australianas tienen un peso inferior a la cepa ALFpr18c, pero hay cinco cepas que la superan.

### Longitud de la raíz

En la figura 43 se muestran los resultados de la longitud de la raíz de las plantas en los distintos tratamientos. Podemos observar que la longitud de la raíz, en general, disminuye en todos los tratamientos con *Micromonospora* cuando se comparan con el control. Sólo hay cuatro tratamientos con una longitud mayor y sólo uno de estos resultados es estadísticamente significativo.

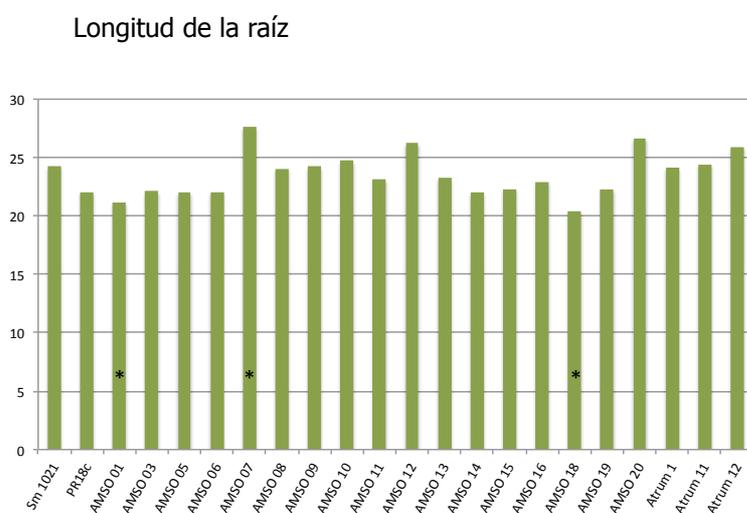


Figura 43. Resultados medios de la longitud de la raíz en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un  $p$  valor  $\leq 0,05$ .

### Peso seco de la raíz

En la figura 44 se muestran los resultados de la longitud de la parte aérea de las plantas en los distintos tratamientos.

El peso seco de la raíz se incrementa en todos los tratamientos con *Micromonospora* y estas diferencias son estadísticamente significativas en muchos de los casos, incluyendo la cepa ALFpr18 que usamos para la comparación con las cepas españolas. En ocho tratamientos, aunque los resultados para este parámetro son mayores no tienen significación estadística.

Peso de la raíz

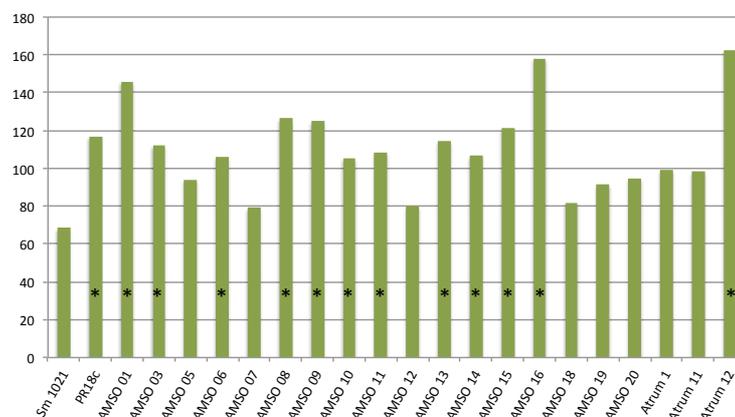


Figura 44. Resultados medios del peso seco de la raíz en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

### Número de nódulos

En la figura 45 se muestran los resultados para el número de nódulos en la raíces de las plantas en los distintos tratamientos.

Número de nódulos

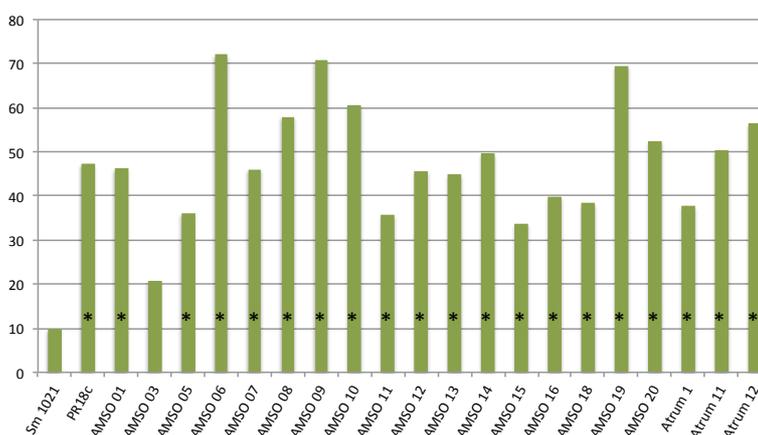


Figura 45. Resultados medios del número de nódulos en los distintos tratamientos. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto al control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

Podemos observar que este parámetro se incrementa en todos los tratamientos con *Micromonospora* y estas diferencias son estadísticamente significativas en

todos los tratamientos incluyendo la cepa ALFpr18 que usamos para la comparación con las cepas españolas, con una sola excepción.

Estos resultados son muy similares a los obtenidos con los aislados españoles, en cuanto a la capacidad de promoción del crecimiento en las plantas. Parece una característica general de este grupo de microorganismos aislados de nódulos. En todos los casos se produce un incremento altamente significativo del número de nódulos, que podría ser responsable, al menos parcialmente de los resultados de promoción del crecimiento observados.

Los resultados obtenidos, no son inesperados, si tenemos en cuenta los resultados de caracterización de las cepas, realizados en este trabajo y discutidos en el capítulo 1. En ese capítulo se expone la hipótesis de que las cepas de Australia fueron transportadas desde Europa puesto que sus características genotípicas las sitúan junto a los aislados españoles en todos los árboles filogenéticos generados con los datos de secuenciación, en consecuencia su comportamiento como PGPR podía ser esperable. Parece confirmarse el papel que estas bacteria juegan como endosimbiontes de las plantas.

## **Diseño de inoculantes**

Tras demostrar la eficacia de *Micromonospora* como PGPR, analizando el efecto beneficioso que produce en las planta inoculadas, se planteó un estudio para el diseño de inoculantes, que pudieran servir de base para la utilización de los microorganismos seleccionados en el campo, en las condiciones habituales de práctica agrícola. El primer objetivo fue la elaboración de inóculos en un soporte fácil de utilizar. El segundo objetivo valorar las proporciones, entre *Micromonospora* y *Sinorhizobium*, más adecuadas para el diseño final de un biofertilizante eficaz.

Hasta este momento siempre se había utilizado una suspensión en medio líquido de los microorganismos de 5 en la escala McFarland, pero esta técnica de inoculación es útil para investigación a escala laboratorio e invernadero, pero muy poco adecuada para su uso en condiciones de campo. Era necesario utilizar un método de inoculación que pudiese ser exportado a la industria y permitiera su comercialización.

Como soporte para los microorganismos, elegimos la turba por ser un método sobradamente probado y muy extendido en la fabricación de inoculantes a escala industrial.

Los microorganismos de este estudio se cultivaron en matraces de 250 ml con 50 ml de medio líquido. Las cepas seleccionadas de *Micromonospora* (ALFb5 y ALFpr18c) se cultivaron en SA1 y se incubaron en un agitador rotativo a 28°C durante 10 días. La cepa de *Sinorhizobium* utilizada fue la cepa comercial RRI128 que se usa para la fabricación de los inoculantes en Western Australia.

La cepa RRI128 se cultivó en YMA y se incubó en un agitador rotativo a 28°C durante 3 días. Tras la incubación los cultivos se inyectaron en bolsas independientes con turba estéril, donde se mantuvieron a 28°C durante 10 días, en el caso de la cepa SM1021 y 14 días en el caso de *Micromonospora*. Los inoculantes, así preparados, se cuantificaron mediante recuento, antes de su utilización.

Para este experimento se utilizó *Medicago sativa* en macetas de 2,5L en las que se puso como soporte arena de río y arena amarilla (procedente de caliza de Tamala) en una relación 1:1. Se sembraron 5 plantas por maceta. Tras los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, se eliminaron dos de cada maceta, para conseguir una buena homogeneidad en las plantas del experimento (Figura 46).

Para la inoculación se esterilizaron las semillas en superficie y se inocularon con los inoculantes de turba preparada como se ha descrito.



Figura 46. Fotografía de uno de los tratamientos para valorar las proporciones, entre *Micromonospora* y *Sinorhizobium*, más adecuadas para el diseño de inoculantes. Se aprecian en las macetas la cobertura hidrofoba y el sistema de riego usados en el experimento para evitar la contaminación.

Para valorar la importancia de la proporción entre *Sinorhizobium* y *Micromonospora* en los biofertilizantes, las semillas de alfalfa se inocularon con los dos microorganismos en las siguientes proporciones 1:0,5, 1:1, 1:2 y 1:3. Plantas inoculadas sólo con *S. meliloti* se utilizaron como control. La cantidad del inóculo de *Sinorhizobium* se ha mantenido constante en todos los ensayos, por que había sido bien estudiada para la formulación de los inoculantes comerciales y se conocía la cantidad necesaria para obtener los mejores resultados.

El experimento se mantuvo durante 8 semanas, regando regularmente y añadiendo solución nutritiva (material y métodos) una vez en semana. La cantidad de solución nutritiva usada fue de 20 ml al principio del experimento y

de acuerdo con el desarrollo vegetativo esta cantidad se incremento hasta 40 ml en el estadio final.

Los resultados obtenidos sobre la relación óptima entre las concentraciones de *Sinorhizobium* y *Micromonospora* se muestran en la figura 46. En este estudio se analizaron la longitud y el peso de la raíz y la longitud y el peso de la parte aérea. Los pesos se muestran en gramos y el análisis estadístico se realizó por medio del programa SPSS con un ANOVA y test LSD.

Como se observa en la figura 46, las diferencias en la proporción de los microorganismos utilizados, tuvieron una clara influencia en el peso seco de la parte aérea de la planta, aumentando en relación directa con la cantidad de *Micromonospora* utilizada. No se muestran el resto de los resultados por que, en el resto de los parámetros no se encontraron diferencias significativas.

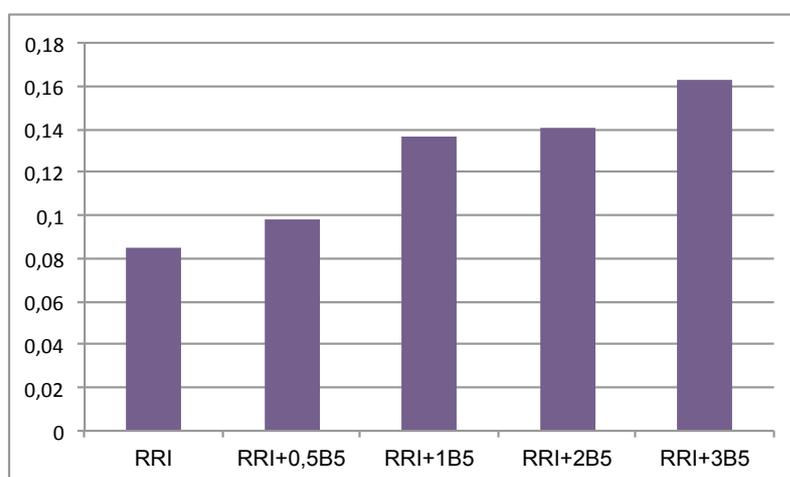


Figura 47. Medias del peso seco de la parte aérea de cada uno de los tratamientos utilizados: RRI: Plantas inoculadas únicamente con *S. meliloti* RRI128. RRI+xB5: Distintas proporciones de los dos microorganismos en la coinoculación (1:05, 1:1, 1:2 y 1:3). La cantidad de *Sinorhizobium* se ha mantenido constante en todos los tratamientos.

Aunque estos resultados son de gran interés, serán necesarios experimentos adicionales, con concentraciones de *Micromonospora* diferentes a las utilizadas en el anterior para determinar donde está ese límite y comprobar si concentraciones aún mayores afectan a la promoción del crecimiento.

### **Influencia de *Micromonospora* en la micorrización**

Las micorrizas, son asociaciones que se establecen entre los hongos formadores de micorrizas y raíces de la mayoría de las plantas. Las asociaciones micorrícicas son muy diversas pero las más extendidas son las micorrizas arbusculares, que se establecen entre hongos del phylum *Glomeromycota* y las raíces plantas superiores (Schüßler *et al.*, 2001).

El papel fundamental de las micorrizas es la mejora de la nutrición de plantas principalmente a través de un aumento en la captación de fósforo a cambio de recibir carbono de los fotosintetizados de las plantas hospedadoras (George *et al.*, 1995). Pero también se ha descrito que las micorrizas confieren a las plantas resistencia/tolerancia frente a múltiples estreses, tanto bióticos como abióticos.

*Micromonospora* pertenece a una familia de bacterias que son conocidas por producir metabolitos secundarios que actúan como antifúngicos. En el capítulo 4 de esta tesis se describe la capacidad de alguna de las cepas de este estudio para producir este tipo de sustancias bioactivas, en consecuencia se hacía necesario estudiar su influencia en el proceso de micorrización, dada la importancia de esta interacción mutualística para la planta.

### Procedimiento

Se emplearon las especies de hongos micorrízico arbusculares *Glomus mosseae* *Glomus irregulare* y las cepas de *Micromonospora* ALFpr18c y ALFb5, para realizar este estudio.

La inoculación de las plantas con *G. mosseae* se realizó añadiendo inóculo-suelo y mezclándolo homogéneamente con el sustrato en la maceta (material y métodos). Para los controles no inoculados, se añadió un filtrado de suelo para restituir el componente biológico libre de propágulos formadores de micorrizas arbusculares.

La inoculación de las plantas con *G. irregulare* se realizó agregando un cm<sup>2</sup> del medio de cultivo monoxénico del hongo, a la raíz de cada plántula al trasplantarla a la maceta (material y métodos). A los controles no inoculados se les agregó un cm<sup>2</sup> de medio de cultivo M con raíces de zanahoria transformadas, pero sin el hongo micorrízico.

La inoculación con las cepas de *Micromonospora* se realizó con una suspensión de la bacteria en agua estéril, de una turbidez de 5 en la escala de McFarland e inoculando con una micropipeta un mililitro de esa suspensión en el soporte de la planta, cerca de la raíz.

Se utilizaron semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) esterilizadas como se detalla material y métodos. Las plántulas de alfalfa, previamente cultivadas en semilleros, se trasplantaron a macetas de 300 ml de capacidad con una mezcla suelo/arena (material y métodos). Las plantas recibieron cada semana 10 ml de solución nutritiva Hewitt sin fósforo durante todo el experimento.

Se diseñaron los siguientes experimentos: Plantas inoculadas con *G. irregulare*, inoculadas con *G. mosseae*, inoculadas con ALFpr18c, inoculadas con ALFb5, plantas coinoculadas con ALFpr18c y *G. mosseae*, con ALFb5 y *G. mosseae*, con ALFpr18c y *G. irregulare*, y con ALFb5 y *G. irregulare*.

Después de 8 semanas de crecimiento, las plantas se cosecharon y se

determinó el peso seco de la parte aérea y el porcentaje de longitud de raíz micorrizada.

### Resultados y discusión

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 1 y 2.

De los resultados de las tablas podemos concluir que ninguna de las cepas de *Micromonospora* utilizadas afectan al porcentaje de micorrización de la alfalfa por *G. irregulare*, sus recuentos son muy similares al del control inoculado sólo con el hongo micorrícico.

Tabla 1. Peso seco y porcentaje de longitud de raíz de alfalfa (*Medicago sativa*) colonizada por *Glomus irregulare* en presencia de *Micromonospora* ALFpr18c y ALFb5. T0: inoculadas al mismo tiempo y T1: quince días después del endófito arbuscular.

	Peso seco (mg) T0	Longitud raíz micorrizada (%) T0	Peso seco (mg) T1	Longitud raíz micorrizada (%) T1
Control	10,2	0	10,2	0
ALFpr18c	12,3	0	10,6	0
ALFb5	14,6	0	12,2	0
<i>G. irregulare</i>	63,3	6,2	63,5	6,2
pr18c + <i>G. irregulare</i>	63,3	3,4	150,1	1,2
b5 + <i>G. irregulare</i>	33,3	6,3	26,6	3,3

Tabla 2. Peso seco y porcentaje de longitud de raíz de alfalfa (*Medicago sativa*) colonizada por *Glomus mosseae* en presencia de *Micromonospora* ALFpr18c y ALFb5. T0: inoculadas al mismo tiempo y T1: quince días después del endófito arbuscular.

	Peso seco (mg) T0	Longitud raíz micorrizada (%) T0	Peso seco (mg) T1	Longitud raíz micorrizada (%) T1
Control	10,1	0	10,1	0
ALFpr18c	12,3	0	10,6	0
ALFb5	14,6	0	12,2	0
<i>G. mosseae</i>	46,6	6,5	46,5	6,5
pr18c + <i>G. mosseae</i>	30,2	14,2	33,3	11,6
b5 + <i>G. mosseae</i>	73,3	13,5	133,3	19,4

Esto es importante ya que *Micromonospora* no actúa contra hongos simbioses sino que únicamente causa una respuesta más potente de la planta en el caso de un ataque por patógeno, como se puede ver en el capítulo referente a defensa. Además, en los resultados con *G. mosseae* se observa una tendencia a un aumento del porcentaje de micorrización cuando están en presencia de cualquiera de las dos *Micromonospora* estudiadas.

El peso seco de las plantas si parece variar dependiendo del tipo de inóculo y del momento de la inoculación de *Micromonospora*. Los mejores resultados se observan cuando *G. irregulare* es inoculada 15 días antes de ALFpr18c, ya que hay un incremento del peso seco de la planta y también en el caso de ALFb5 inoculada 15 días después de *G. mosseae*. En las demás combinaciones parece existir una tendencia a una ligera disminución o permanencia en los mismos

pesos de las plantas coinoculadas frente a las inoculadas sólo con *Glomus*. Es probable que esto se deba a una competencia entre los microorganismos si son inoculados al mismo tiempo que no sucede cuando el hongo ya se ha establecido, permitiendo una sinergia mayor cuando la inoculación es escalonada.



# Capítulo 4:

ESTUDIO MICROSCÓPICO DE  
NÓDULOS DE *MEDICAGO SATIVA*  
PROCEDENTES DE PLANTAS  
INOCULADAS CON  
*MICROMONOSPORA*



## ESTUDIO MICROSCÓPICO DE NÓDULOS DE *MEDICAGO SATIVA* PROCEDENTES DE PLANTAS INOCULADAS CON *MICROMONOSPORA*

### Introducción

El suelo contiene una gran cantidad y diversidad de microorganismos que interaccionan de una manera positiva o negativa con las raíces vegetales. Una de las interacciones más estudiadas y mejor conocidas es la que tiene lugar entre las raíces de las leguminosas y microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno atmosférico, que englobamos en el grupo de los Rhizobia. El resultado de esta interacción es la formación de nódulos en las raíces, cuya misión es transformar el nitrógeno de la atmósfera en formas asimilables para la planta.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que los nódulos de las raíces vegetales estaban ocupados por un único tipo de microorganismos, los Rhizobia, puesto que era un órgano específicamente desarrollado para albergarlos. Ahora sabemos que varios endofitos pueden convivir en el interior de un nódulo. Existen en la actualidad numerosos trabajos que describen la enorme diversidad de microorganismos que podemos encontrar en los nódulos de las leguminosas (Muresu *et al.*, 2008), (Deng *et al.*, 2011), (García-Fraile *et al.*, 2008), (Trujillo *et al.*, 2010).

Las bacterias que forman los nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*) pertenecen al género *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y son fácilmente visibles en su interior, mediante estudios de microscopía. La visualización del interior del nódulo implica la inclusión de los nódulos en resinas, obtención de cortes ultrafinos, tinción de dichos cortes con colorantes específicos y observación al microscopio óptico o electrónico, según se ha especificado en el apartado de material y métodos. Los bacteroides forman estructuras características que son claramente distinguibles de los orgánulos celulares por su tamaño y forma de bacilo.

Sin embargo, otro tipo de bacterias que actualmente sabemos que se encuentran en el nódulo (Capítulo 2), nunca han sido observadas por microscopía, ya que no se conoce la forma que puedan adoptar sus células al entrar en el nuevo sistema ni tampoco si forman estructuras especiales. Sería importante descubrir su localización para poder demostrar inequívocamente su presencia en el interior de los nódulos.

El objetivo de este capítulo ha sido abordar este problema analizando como afecta la interacción con *Micromonospora* la estructura de los nódulos.

Para cumplir con este objetivo se realizaron varias aproximaciones a este problema: (i) observación macroscópica de la morfología de los nódulos, (ii)

análisis de la estructura del nódulo mediante microscopía óptica y (iii) y análisis de la ultraestructura nodular mediante microscopía electrónica tanto de barrido como de transmisión.

## Diseño experimental

En este estudio se inocularon plantas de *Medicago sativa*, crecidas en condiciones axénicas en macetas de un litro con suelo estéril, con *Sinorhizobium meliloti* 1021 y dos cepas de *Micromonospora* seleccionadas de entre los aislados estudiados, la ALFb5 y ALFbpr18c (material y métodos).

Cada tratamiento, de 10 plantas, fue inoculado con *S. meliloti* 1021 y las dos cepas de *Micromonospora* seleccionadas. Además de todas las combinaciones posibles entre *Sinorhizobium* y *Micromonospora*. También se cultivaron plantas como control negativo sin inocular y plantas inoculadas únicamente con cada una de las cepas del estudio.

## Morfología de los nódulos

En el control negativo no aparecieron plantas noduladas lo que nos indica que las condiciones de limpieza microbiológica fueron mantenidas de forma eficaz durante todo el experimento.

Los nódulos de las plantas inoculadas sólo con *S. meliloti*, eran nódulos típicos tanto en la forma como en el tamaño y de coloración rosada debido a la presencia de leghemoglobina (Figura 1). La mayoría de los nódulos eran típicos indeterminados: piriformes con algunos de ellos bi o trilobulados.



Figura 1. Detalle de raíces de plantas inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* mostrando los nódulos típicos de este tipo de interacción.

Por el contrario, en las plantas inoculadas únicamente con *Micromonospora*, los resultados obtenidos fueron sorprendentes. En las raíces de muchas plantas aparecieron nódulos blancos, frágiles y con forma de roseta, más parecidos a nódulos actinorrhízicos que a los de alfalfa, muy diferentes por su aspecto y textura a los nódulos típicos. Este tipo de estructuras tampoco se asemejaban a los nódulos espontáneos que se han descrito en alfalfa (Tirichine *et al.*, 2006) (Figura 2).



Figura 2. Raíces de plantas inoculadas con *Micromonospora* mostrando nódulos coraloides atípicos y blancos que aparecen en este tipo de interacción.

El número de plantas en las que observamos este tipo de estructuras fue relativamente elevado, en las plantas inoculadas con la cepa de *Micromonospora* ALFb5, el 50 por ciento de las plantas presentaba este tipo de nódulos. El número de nódulos por planta osciló entre 2 y 10, aunque sólo uno o dos tenían un gran tamaño. En el caso de la cepa ALFpr18c el porcentaje de plantas con nódulos atípicos fue algo menor, sólo un tercio de las plantas los presentaban, pero el tamaño, forma, coloración y estructura macroscópica fue similar.

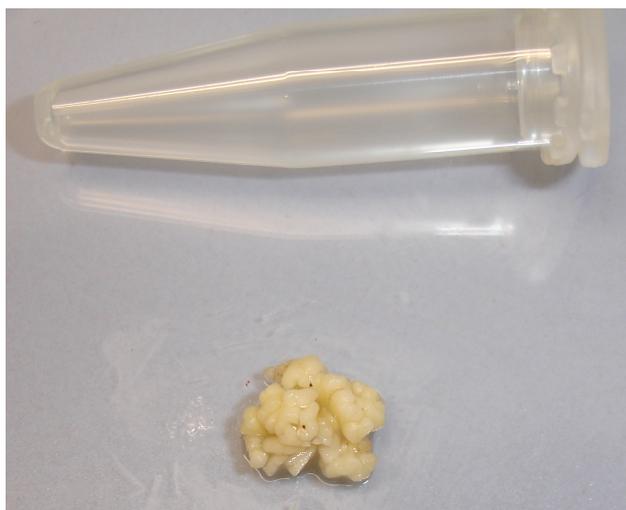


Figura 3. Nódulo escindido de raíces de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora*.

En las plantas coinoculadas, junto a los nódulos típicos de forma y tamaño normal, que son los más abundantes, también aparecían este tipo de nódulos coraloides de gran tamaño, pero al contrario de los descritos en el párrafo anterior, su coloración era normal (Figura 4). En cuanto al número de este tipo de nódulos y la frecuencia con la que aparecen es algo menor, sólo un 30% de las raíces de las plantas coinoculadas presentaban este tipo de nódulos.

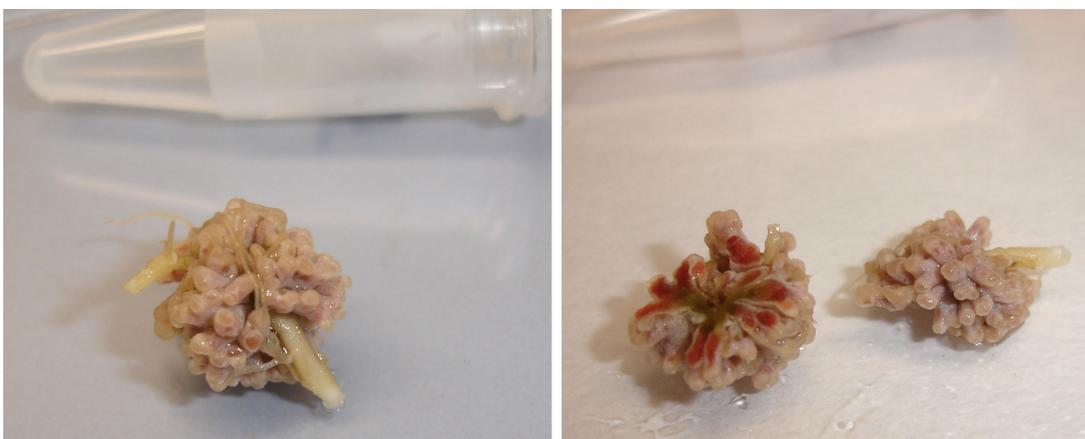


Figura 4. Ejemplo de nódulos en roseta de plantas coinoculadas con *Sinorhizobium* y *Micromonospora*.

## Estructura de los nódulos

Para los estudios de microscopía se escogieron representantes de nódulos en roseta y también de nódulos típicos para realizar un estudio comparativo entre todos los grupos experimentales. Los nódulos de alfalfa pertenecen al tipo de nódulos indeterminados (meristemo apical permanente) y en ellos existe una perfecta organización celular en capas, que da lugar a las dos zonas principales del nódulo: la corteza y la zona infectada (Figura. 6A). La corteza es la parte más externa del nódulo y en ella se encuentran los haces vasculares. La zona infectada, en el interior, es donde se realiza la fijación de nitrógeno y en ella se pueden distinguir células infectadas repletas de bacteroides y las células no infectadas o intersticiales, que realizan funciones específicas de la asimilación de amonio y del transporte del nitrógeno fijado.

### Microscopía óptica

La preparación de los nódulos para realizar cortes y observarlos al microscopio se realizó por medio de inclusión en resina (material y métodos) y posterior corte de secciones con un ultramicrotomo, equipado con una cuchilla de diamante.

Estas preparaciones se colocaron en portaobjetos y en el caso de microscopía óptica se utilizó la tinción con azul de toluidina como colorante para el estudio de las estructuras nodulares y fucsina para las preparaciones en las que se buscaban específicamente canales de infección.

Las diferencias entre los nódulos blancos, procedentes de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* y los rojos (de plantas coinoculadas) fueron patentes. Los nódulos blancos están formados por un tejido celular desorganizado, con un escaso grado de organización alrededor de los haces vasculares (Figura 5 A y B). En sus células no se observan bacteroides pero sí una gran concentración de gránulos de almidón. En las células de los nódulos efectivos normales inoculados sólo con *S. meliloti* 1021 la presencia de gránulos de almidón es mucho menos abundante, tanto en las células infectadas como en las no infectadas (Figuras 5 y 6).

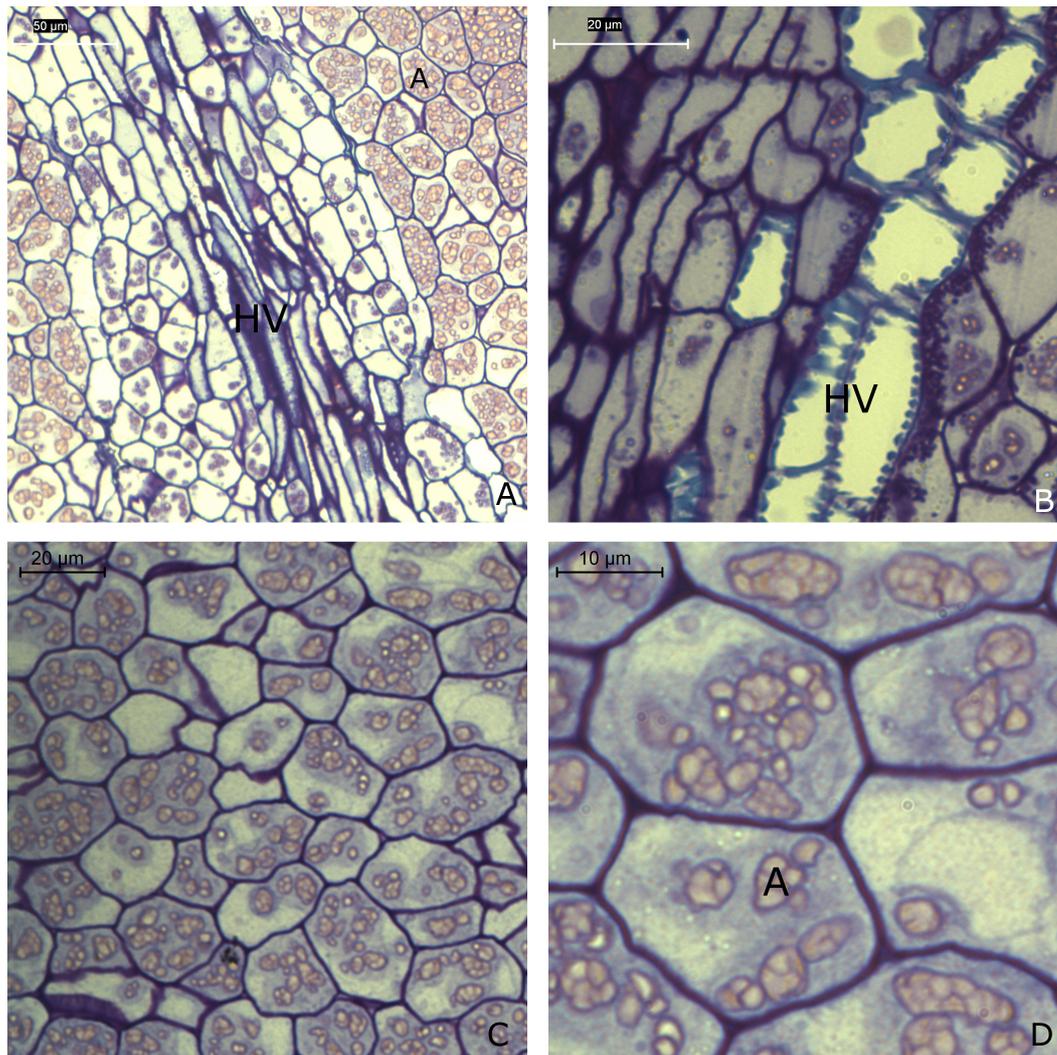


Figura 5. Microfotografías de un nódulo coraloide blanco de una planta inoculada únicamente con *Micromonospora* ALFpr18c. HV: Haz vascular, A: gránulos de almidón.

En los nódulos típicos de plantas que habían sido coinoculadas con *Micromonospora* y *S. meliloti* encontramos algunas células con formaciones en su interior que no se parecían a los bacteroides típicos formados por *Sinorhizobium meliloti* 1021 (Figuras 6 D, E y F). Este tipo de células aparecían tanto en plantas inoculadas con *Micromonospora* ALFpr18c como con ALFb5, siendo su frecuencia baja en ambos casos (Figuras 6, 7 y 8).

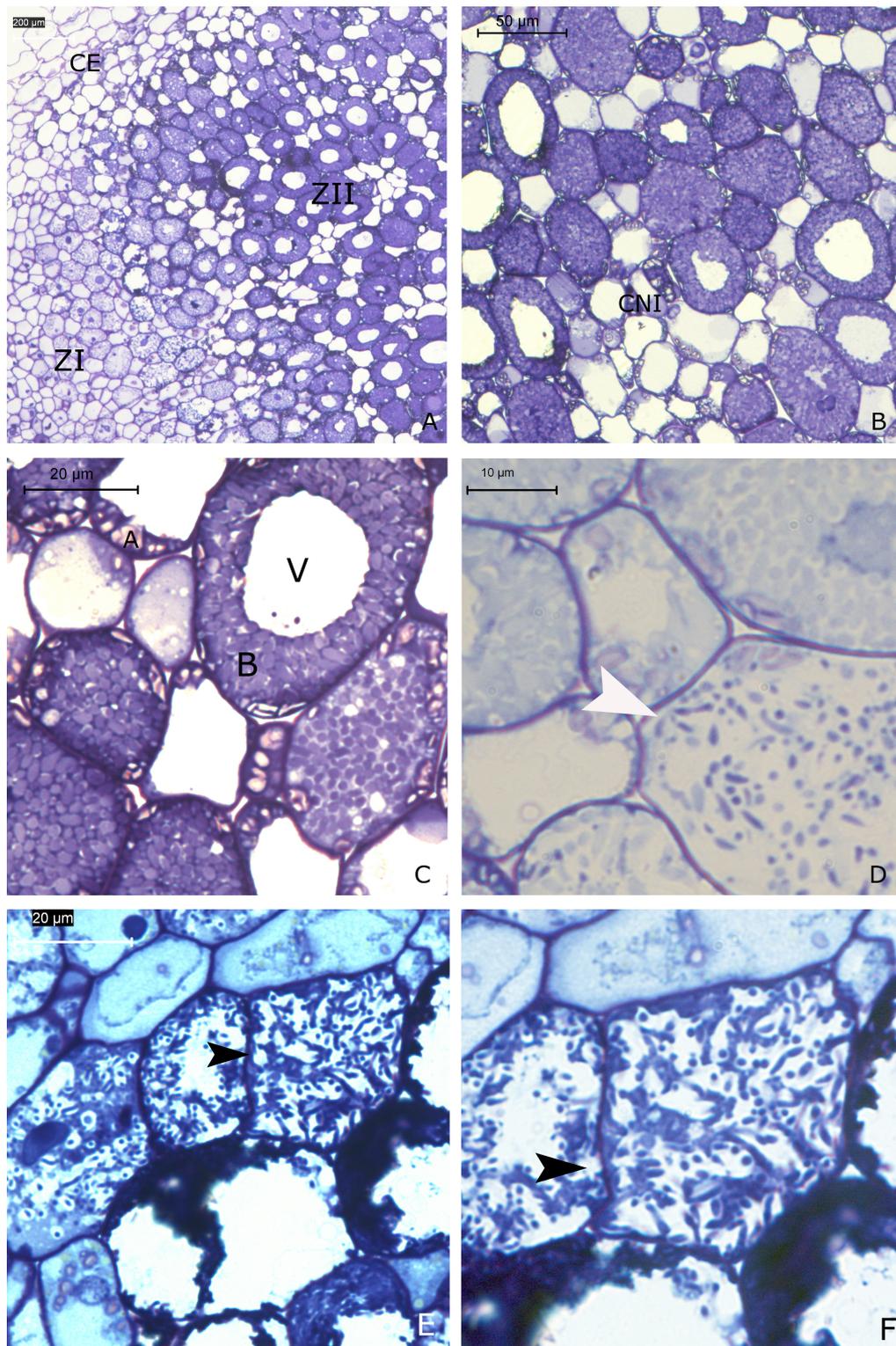


Figura 6. Microfotografías de cortes de un nódulo extraído de una planta coinoculada con *S. meliloti* 1021 y *Micromonospora* ALFpr18c y teñido con azul de toluidina. Se observan los bacteroides en el interior de las células, teñidos de color azul. V: Vacuola, B: Bacteroides, CNI: célula no infectada, CE: córtex externo, ZI: zona de invasión, ZII: interzona. Las flechas muestran endosimbiontes (D, E y F) de formas no comunes, posiblemente *Micromonospora*.

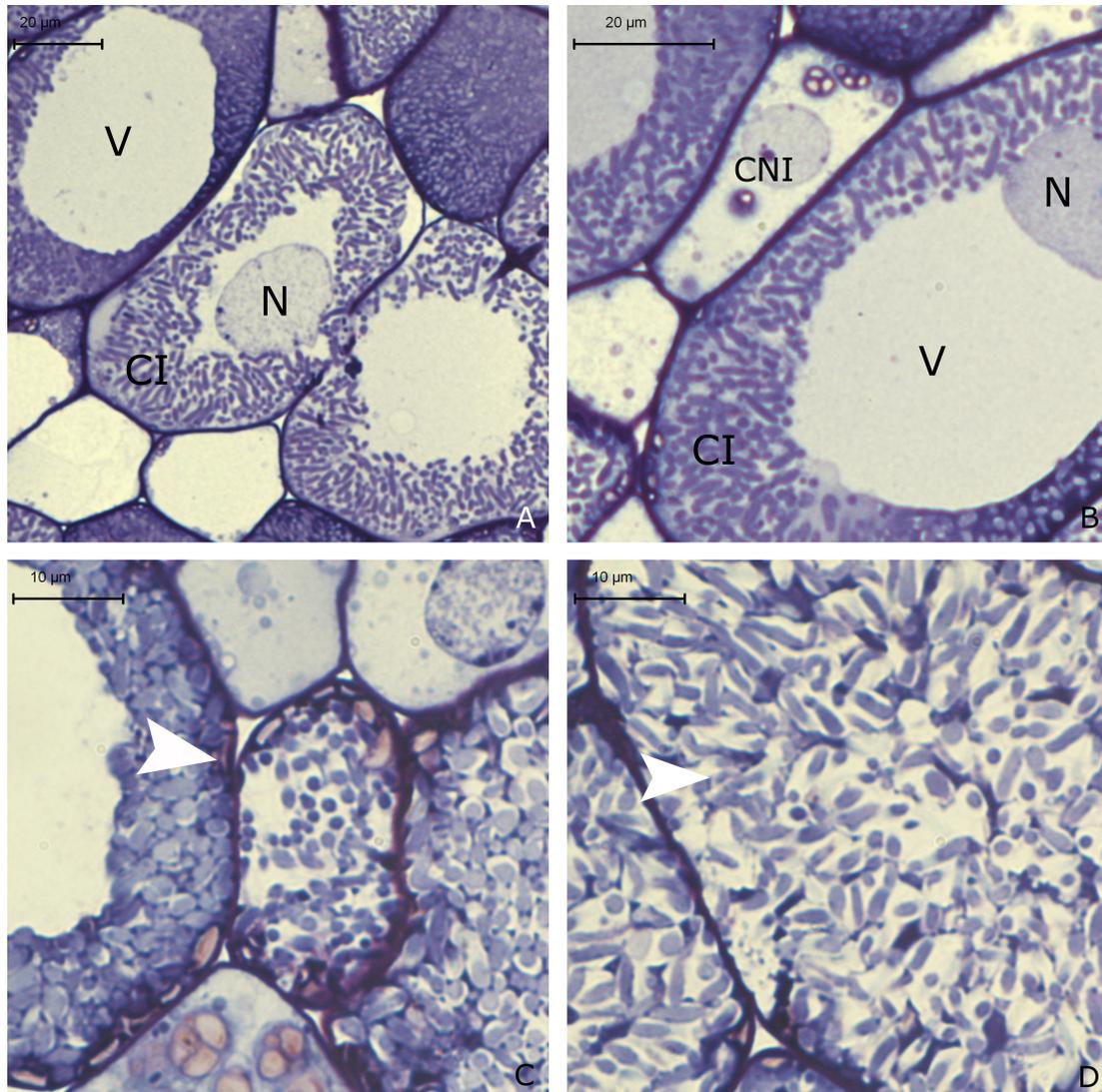


Figura 7. Microfotografías de secciones de un nódulo extraído de una planta coinoculada con *S.melloti* 1021 y *Micromonospora* ALFb5 y teñido con azul de toluidina. Se observan los bacteroides en el interior de las células, teñidos de color azul. V: Vacuola, B: Bacteroides N: núcleo, CNI: célula no infectada, A. almidón. Las flechas (C y D) muestran endosimbiontes de formas no comunes, posiblemente *Micromonospora*.

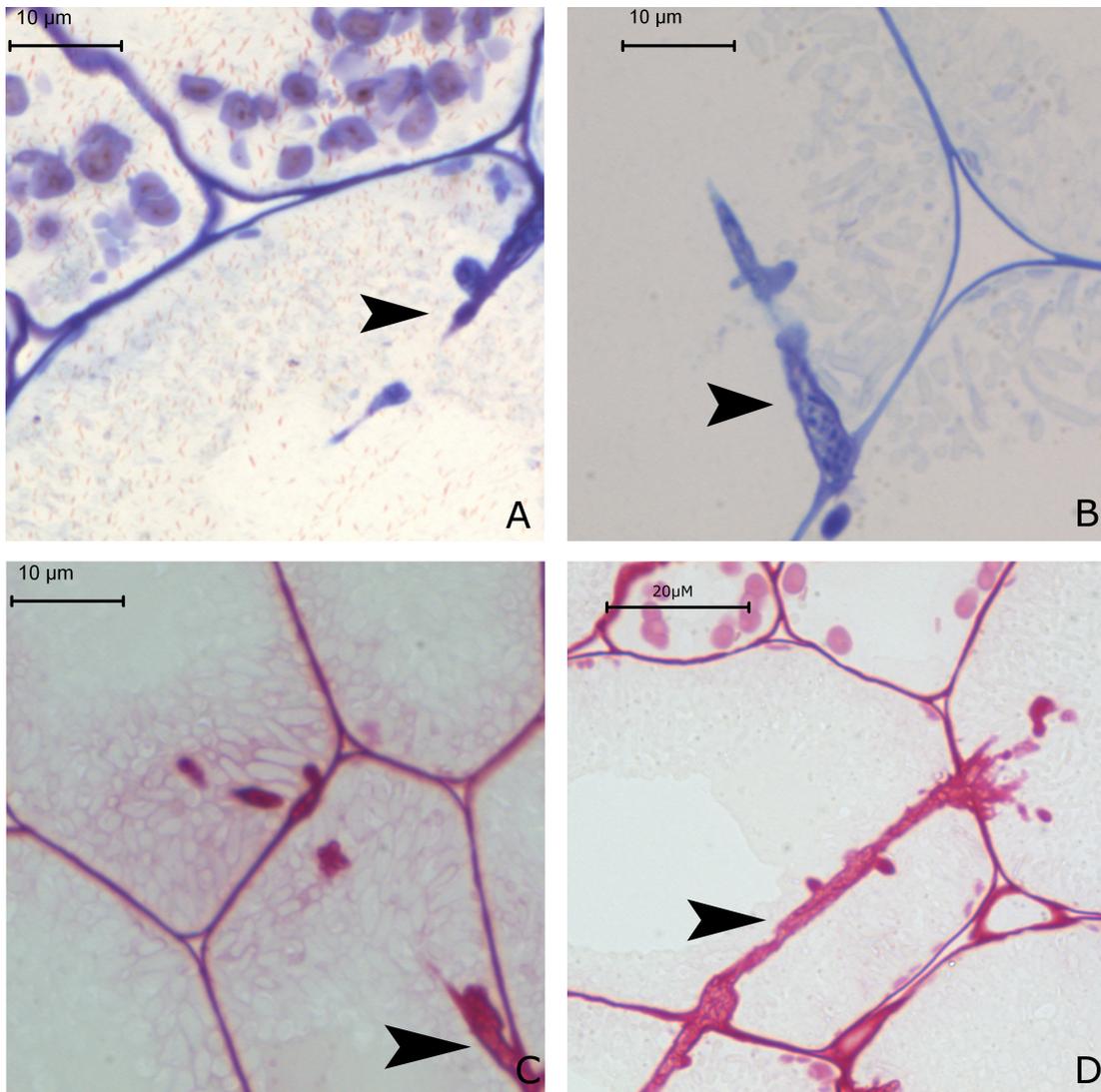


Figura 8. Fotografías de cortes de Nódulos de plantas coinoculadas con *S.meliloti* 1021 y *Micromonospora* ALFb5 mostrando canales de infección. A y B, tinción con azul de toluidina, C y D con fucsina.

### Microscopía electrónica

Los mismos bloques de estas muestras se observaron al microscopio electrónico, tanto de transmisión como de barrido, para estudiar en detalle las estructuras detectadas con microscopía óptica y en especial aquellas que sólo se observan en nódulos de plantas coinoculadas y en consecuencia parecen deberse a la presencia de *Micromonospora* en el interior de los nódulos.

### Microscopía de barrido convencional SEM

Mediante microscopía electrónica de barrido, y utilizando los mismos bloques que para microscopía óptica, se observaron estructuras similares (Figura 9). En los nódulos blancos formados en plantas inoculadas con *Micromonospora* se observó, con mayor nitidez que las células del nódulo estaban repletas de gránulos de almidón (Figura 9).

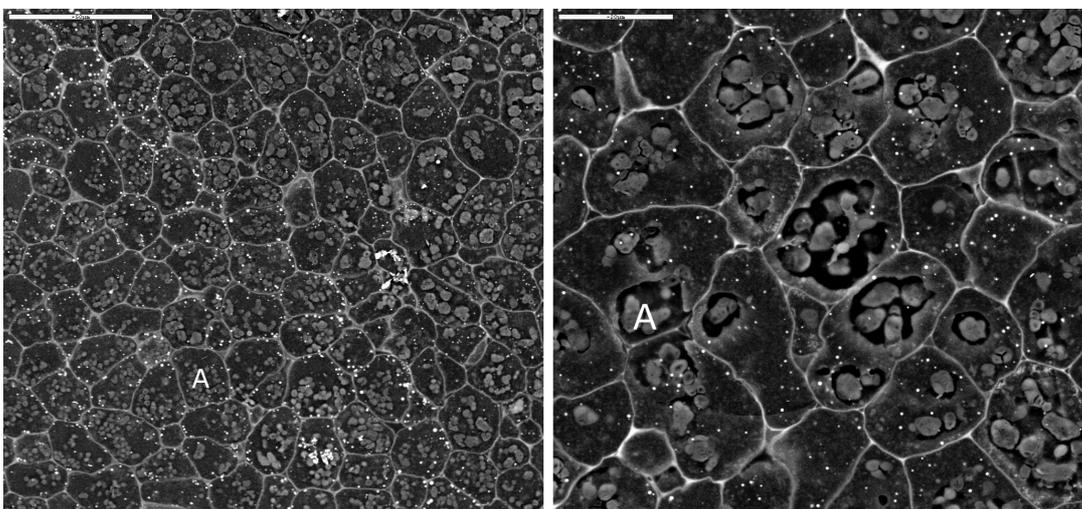


Figura 9. Microfotografías obtenidas mediante SEM convencional de un nódulo coraloide blanco de una planta inoculada únicamente con *Micromonospora* ALFpr18c. Las formaciones que se observan en el interior de las células son gránulos de almidón (A).

Los nódulos típicos obtenidos de plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021 mostraban bacteroides en toda la célula, salvo en las grandes vacuolas centrales. Son las estructuras clásicas de los nódulos de alfalfa desarrollados en presencia de su microsimbionte, con células infectadas y no infectadas. En muchos casos las células no infectadas aparecen completamente negras, debido a la gran vacuola central (Figura 10).

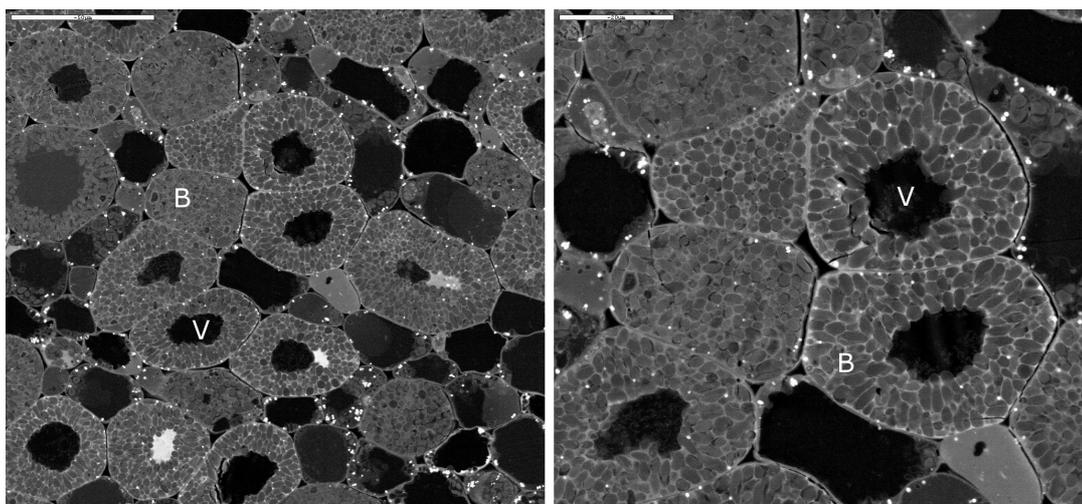


Figura 10. Microscopía electrónica de barrido de nódulos típicos de plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021. B bacteroides. V vacuola

En estos cortes no se encontraron estructuras extrañas que no correspondieran a un nódulo típico.

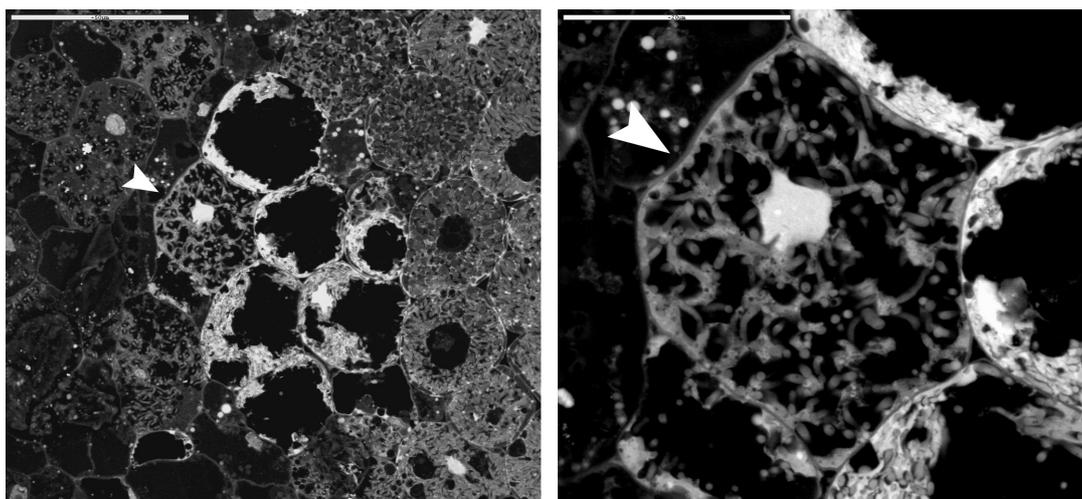


Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de nódulos típicos de plantas coinoculadas con *S. meliloti* 1021 y *Micromonospora* ALFpr18c. Las flechas señalan estructuras celulares con morfología no descrita para bacteroides.

Por el contrario, al observar los cortes de nódulos de plantas coinoculadas, se encontraron estructuras anormales que no parecían corresponder a las descripciones de la estructura nodular normal y que aparecen de forma sistemática en este tipo de nódulos (Figura 11). Junto a células invadidas con una estructura perfectamente normal y que son las más abundantes, encontramos células invadidas de características muy diferentes, las estructuras de su interior no se parecen a los simbiosomas típicos. El hecho de que sólo aparezcan en experimentos donde inoculamos las plantas con ambos microorganismos nos hace pensar que es *Micromonospora* el responsable de este tipo de estructuras.

### Microscopía electrónica de barrido SEM (criofractura)

Para profundizar en este estudio se ha utilizado también la técnica de criofractura, para el estudio de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta técnica no necesita la inclusión de las muestras en resinas, llevándose a cabo únicamente una fijación en frío y una fractura del nódulo directamente después de ser arrancado de la planta. Los resultados obtenidos confirman lo observado en los cortes de los nódulos tanto en microscopía óptica como en barrido convencional.

En la figura 12 se muestra una microfotografía obtenida por esta técnica en la que podemos observar la estructura de los nódulos blancos procedentes de plantas inoculadas con *Micromonospora*.

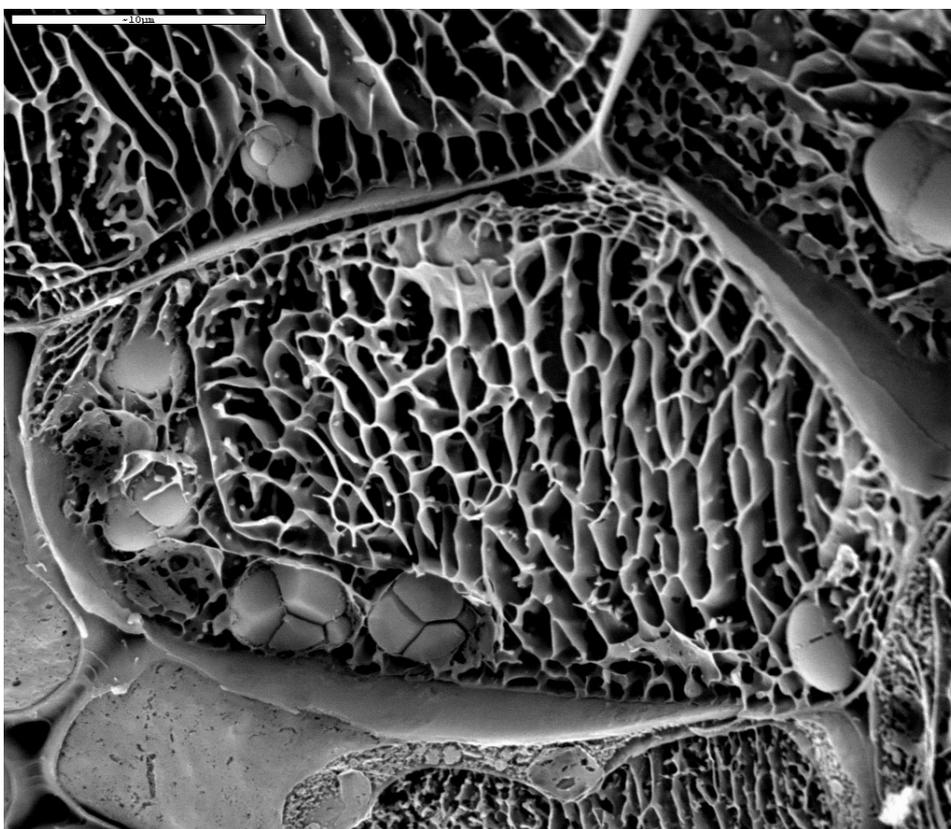


Figura 12: Microscopía electrónica de barrido por criofractura de una célula de un nódulo grande coraloide y blanco, que fue inoculado sólo con ALFb5, sin ningún *Rhizobia*. Se observan gran cantidad de gránulos de almidón así como vacuolas de gran tamaño.

En esta imagen se observan con gran claridad los gránulos de almidón que llenan el citoplasma de la célula vegetal y la gran vacuola central que son los elementos característicos de estos nódulos.

Las microfotografías de los nódulos rojos típicos, obtenidos tanto de las plantas inoculadas con *Sinorhizobium* como de las coinoculadas con todas las

combinaciones posibles entre *Sinorhizobium* y *Micromonospora*, se muestran en la Figura 13.

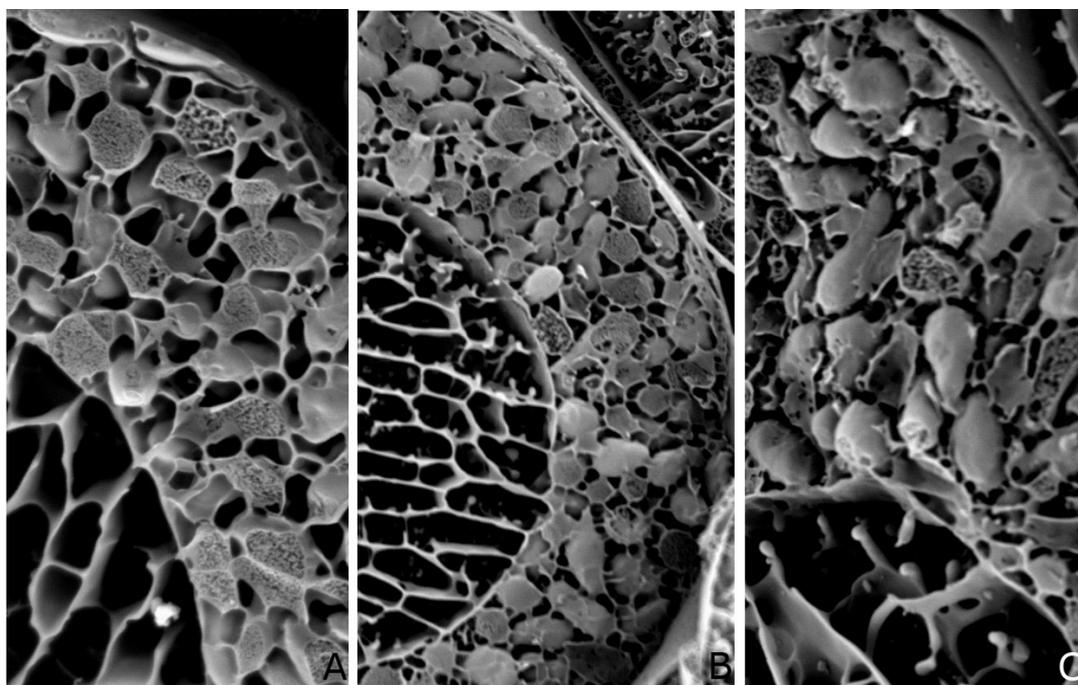


Figura 13. Fotografía microscópica de barrido en la que se observan tres muestras de nódulos de diferentes tratamientos. A: nódulo inoculado con *S. meliloti* 1021; B: coinoculado con *S. meliloti* y ALFpr18c y C: coinoculado con *S. meliloti* y ALFb5. En las tres podemos observar bacteroides y una parte de la vacuola central.

En esta composición se muestran tres microfotografías representativas de tres tratamientos distintos: plantas inoculadas con *S. meliloti* 1021, coinoculadas con *S. meliloti* y ALFpr18c y por último, coinoculadas con *S. meliloti* y ALFb5. La estructura básica de estos tres nódulos es muy parecida, una gran vacuola central y el citoplasma circundante repleto de simbiosomas.

Sin embargo, en las microfotografías representativas de plantas coinoculadas con *S. meliloti* y ALFpr18c o ALFb5 también se encontraron estructuras atípicas que no parecen corresponder a las estructuras conocidas de nódulos típicos y que ya han sido mencionadas en las observaciones de microscopía descritas en párrafos anteriores.

En las figuras 13 y 14 se muestran con detalle las estructuras de los nódulos de plantas coinoculadas con *S. meliloti* y ALFpr18c o ALFb5. En ellas se pueden observar, junto a los detalles de la estructura del nódulo que comparten con los descritos para los nódulos clásicos, las nuevas estructuras observadas sólo en los nódulos procedentes de estos ensayos de coinoculación (Figura 13 B y C Figura 14 C).

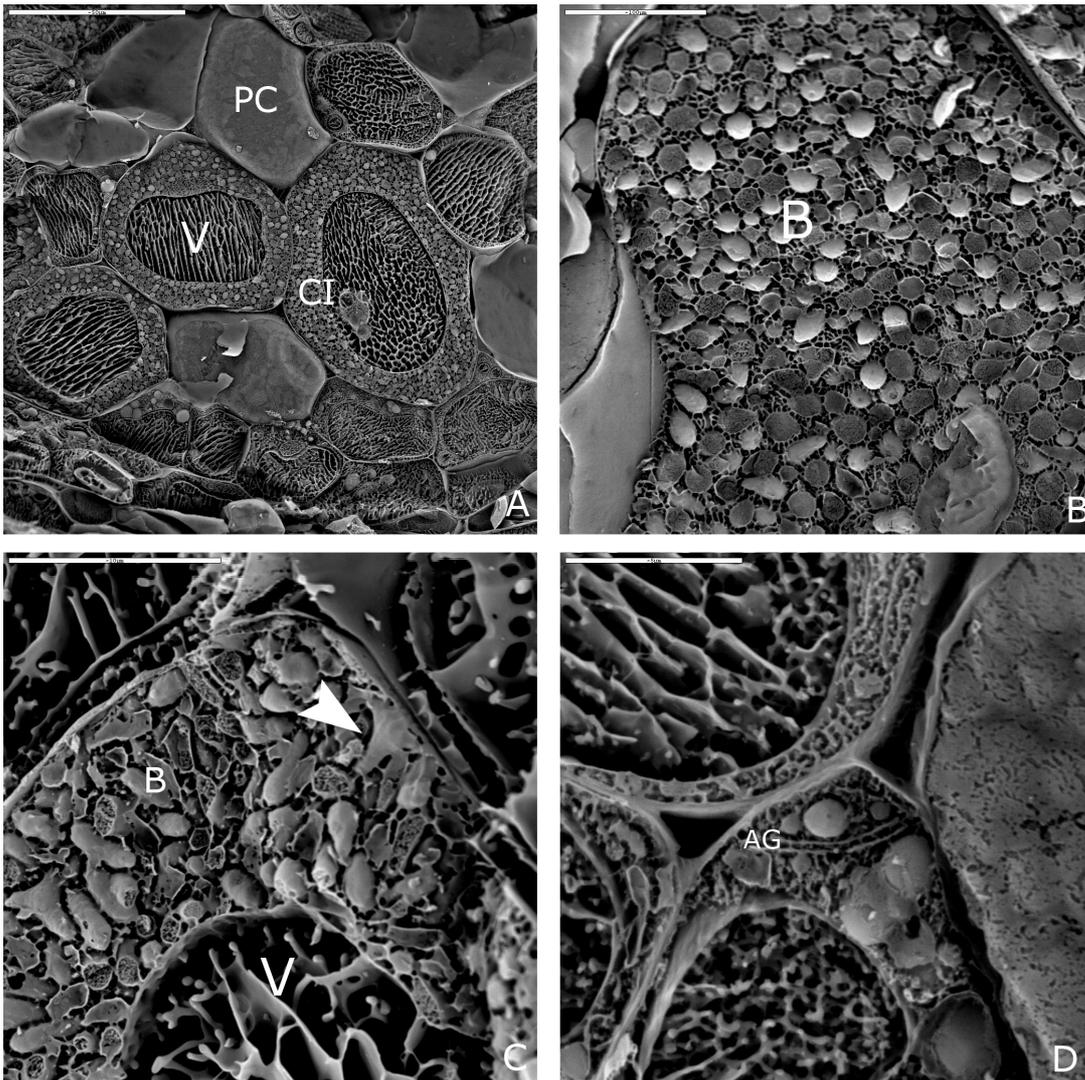


Figura 14. Células de un nódulo indeterminado de color rosáceo normal, inoculado con *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Micromonospora* ALFb5. PC: Pared celular, CI: Célula infectada. V: vacuola. B: Bacteroides. Flecha: Excrecencia de la pared, que no aparece en células inoculadas sólo con *Sinorhizobium*. AG: Aparato de Golgi.

Como ya se ha mencionado, estas protuberancias que emergen de las membranas celulares, no aparecieron en ninguno de los cortes de nódulos procedentes de plantas inoculadas sólo con *S. meliloti* 1021, lo que nos permite plantear la hipótesis de que esta sea la forma que adquiere *Micromonospora* en el interior del nódulo. Ya que los bacteroides son morfológicamente diferentes al microorganismo del que proceden, la misma situación podría darse en el caso de *Micromonospora*.

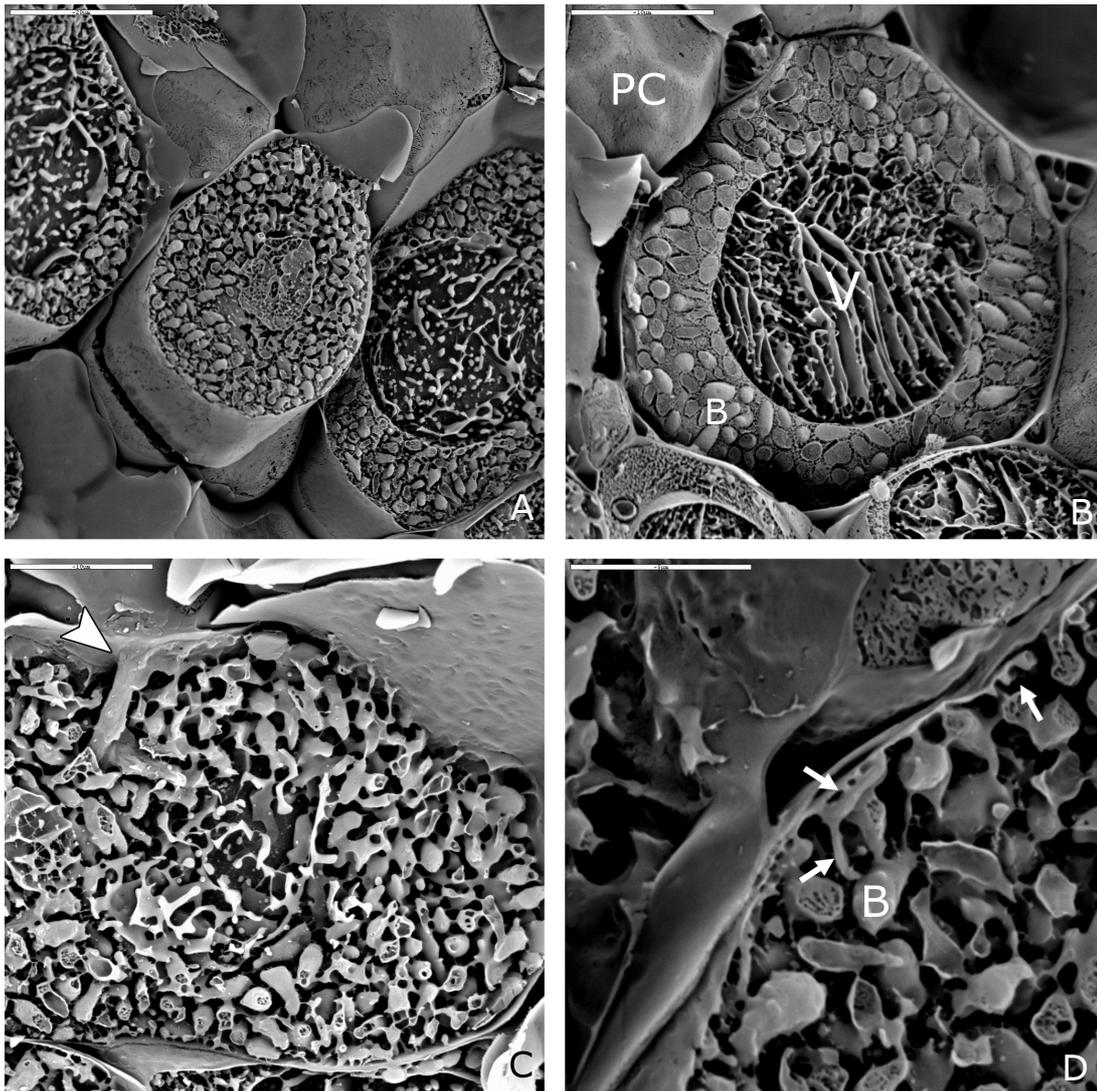


Figura 15. Células de un nódulo indeterminado de color rosáceo normal, inoculado con *Sinorhizobium meliloti* 1021 y *Micromonospora* ALFpr18c. PC: Pared celular V: vacuola. B: Bacteroides. Notar en microfotografías C y D flechas: Excrecencias de la pared que no aparece en células sólo inoculadas con *Sinorhizobium*.

#### Microscopía de transmisión TEM

Para completar el estudio comparativo de la estructura de los nódulos desarrollados en las raíces de alfalfa, en cada uno de los tratamientos, se procedió al estudio de la ultraestructura de los diferentes tipos de nódulos mediante TEM.

Las muestras se prepararon para microscopía electrónica de transmisión de acuerdo con la metodología descrita en material y métodos.

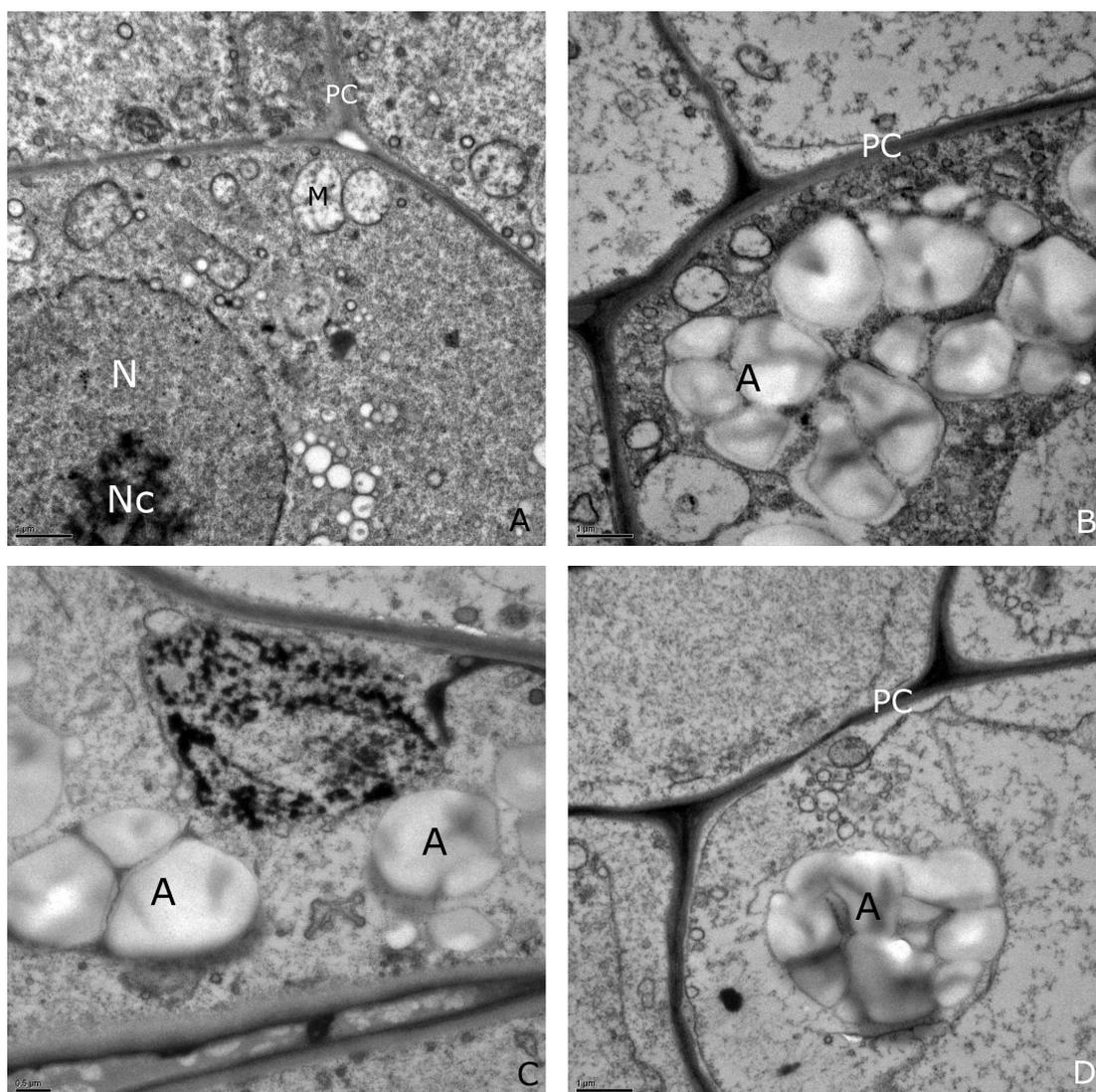


Figura 16. Ultraestructura de un nódulo blanco encontrado en plantas inoculadas sólo con ALFpr18c. N: Núcleo, Nc: Nucleolo, A: Almidón, M: mitocondria, PC: pared celular.

Los resultados de este estudio confirman los obtenidos con microscopía óptica y electrónica de barrido, que se han descrito previamente. Además, mediante microscopía electrónica de transmisión podemos observar la ultraestructura mucho más detalladamente pudiendo llegar a ver la estructura interna de los orgánulos celulares.

En la figura 16 se muestran microfotografías electrónicas de nódulos coraloides blancos inducidos en plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* y como podemos observar se confirman plenamente los resultados de microscopía óptica y SEM. El detalle de esta técnica de microscopía corrobora que la abundancia de los gránulos de almidón son la característica distintiva de este tipo de nódulos. También se pueden observar los orgánulos subcelulares como núcleo o mitocondrias perfectamente definidos.

El aspecto más interesante de los resultados obtenidos en los estudios con microscopía óptica y electrónica de barrido, son las formaciones que emergen de la membrana y que están relacionadas con los nódulos que procedían de plantas coinoculadas. Las fotografías de TEM nos permiten un análisis más detallado de la ultraestructura del nódulo, como podemos observar en la figura 17. En estas imágenes se visualizan con claridad los detalles típicos de una célula de la zona central nódulo.

En dicha figura podemos observar estructuras celulares como mitocondrias o paredes celulares junto con las características de las células invadidas, con los simbiosomas en los que se aprecian detalles de la membrana peribacteroidal y el espacio peribacteroidal o peribacteroidal, los bacteroides del interior, con la diversidad de formas habitual.

Aunque, como ya se ha mencionado, los bacteroides son pleomórficos, en algunos casos se observaron formas poco convencionales, más alargadas y sinuosas de lo normal. Además en esta figura podemos observar un corte transversal del canal de infección, de un diámetro aparentemente más grande. Este hecho atípico podría estar relacionado con la presencia de *Micromonospora*, dado que se ha descrito este tipo de eventos, cuando la simbiosis tiene lugar con mutantes superproductores de celulasas (Robledo *et al.*, 2008) y no podemos olvidar la gran capacidad de *Micromonospora* para producir este tipo de enzimas (Hirsch & Valdés, 2010), (de Menezes *et al.*, 2008).

En las figuras 18 y 19 podemos observar junto a estructuras fácilmente identificables como bacteroides, otras estructuras que no son asimilables, ni por la forma ni por el tipo de borde ni por la densidad. Algunas de estas estructuras se encuentran en el interior del citoplasma y otras surgen de la membrana celular y se ramifican en el interior de la célula. Estas últimas son las que observamos en microscopía óptica y en SEM y volvemos a localizar en este estudio. Estos hechos, que sólo aparecen en nódulos desarrollados en presencia de *Micromonospora*, junto con el aparentemente mayor tamaño de los canales de infección en las células coinoculadas hacen pensar que este microorganismo está implicado en la generación de estas estructuras claramente distintas y que no hemos podido localizar en otro tipo de nódulos.

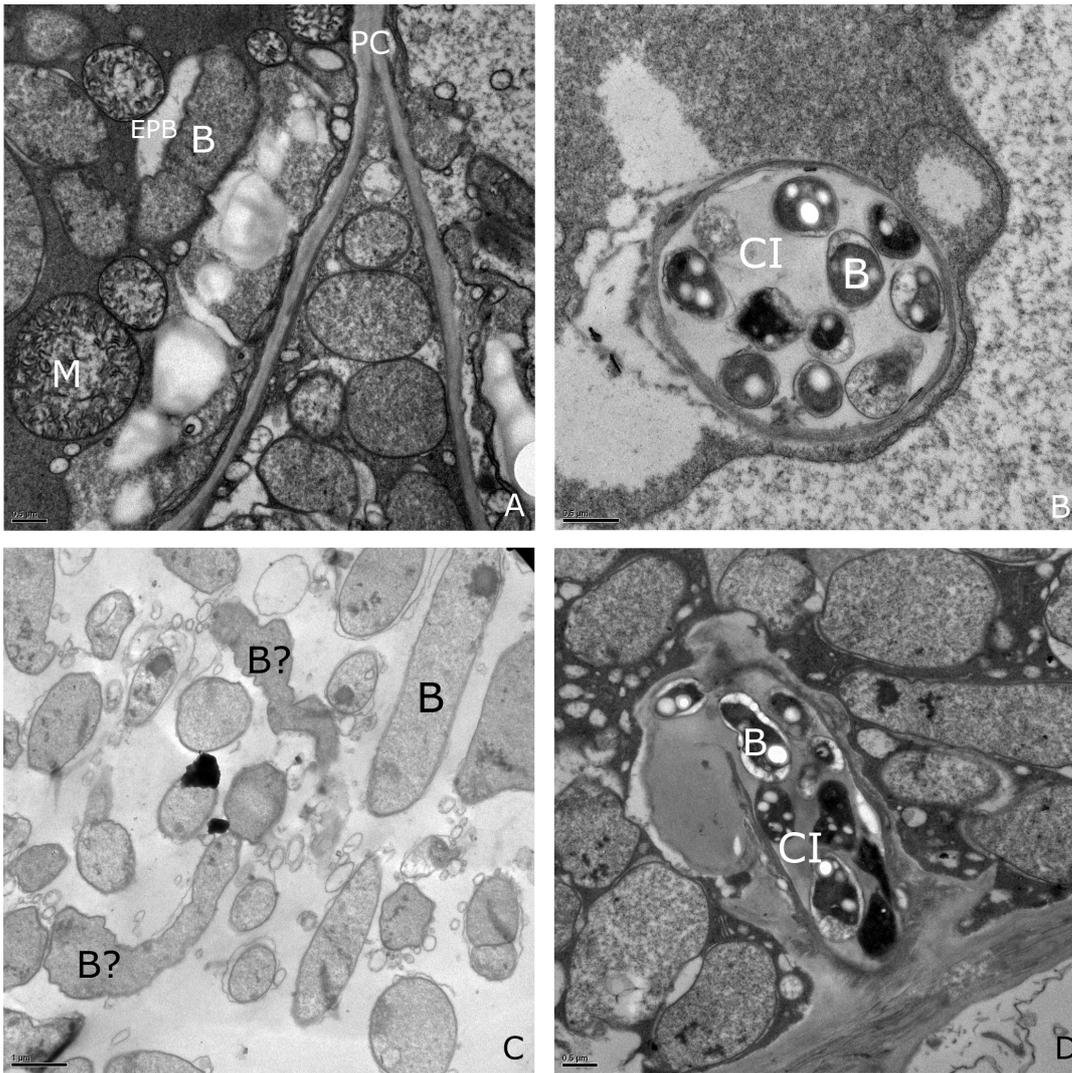


Figura 17. Nódulo indeterminado y rosáceo proveniente de una planta inoculada con SM1021 y *Micromonospora* ALFb5. EPB: Espacio peribacteroideo, B: Bacteroide/Bacteria (en canales de infección), PC: Pared celular, CI: Canal de infección, B?: posibles bacteroides pero de formas aberrantes. En B y D podemos ver distintos cortes de canales de infección, transversal en B y oblicuo en D. Determinados bacteroides presentan formas poco comunes (en C).

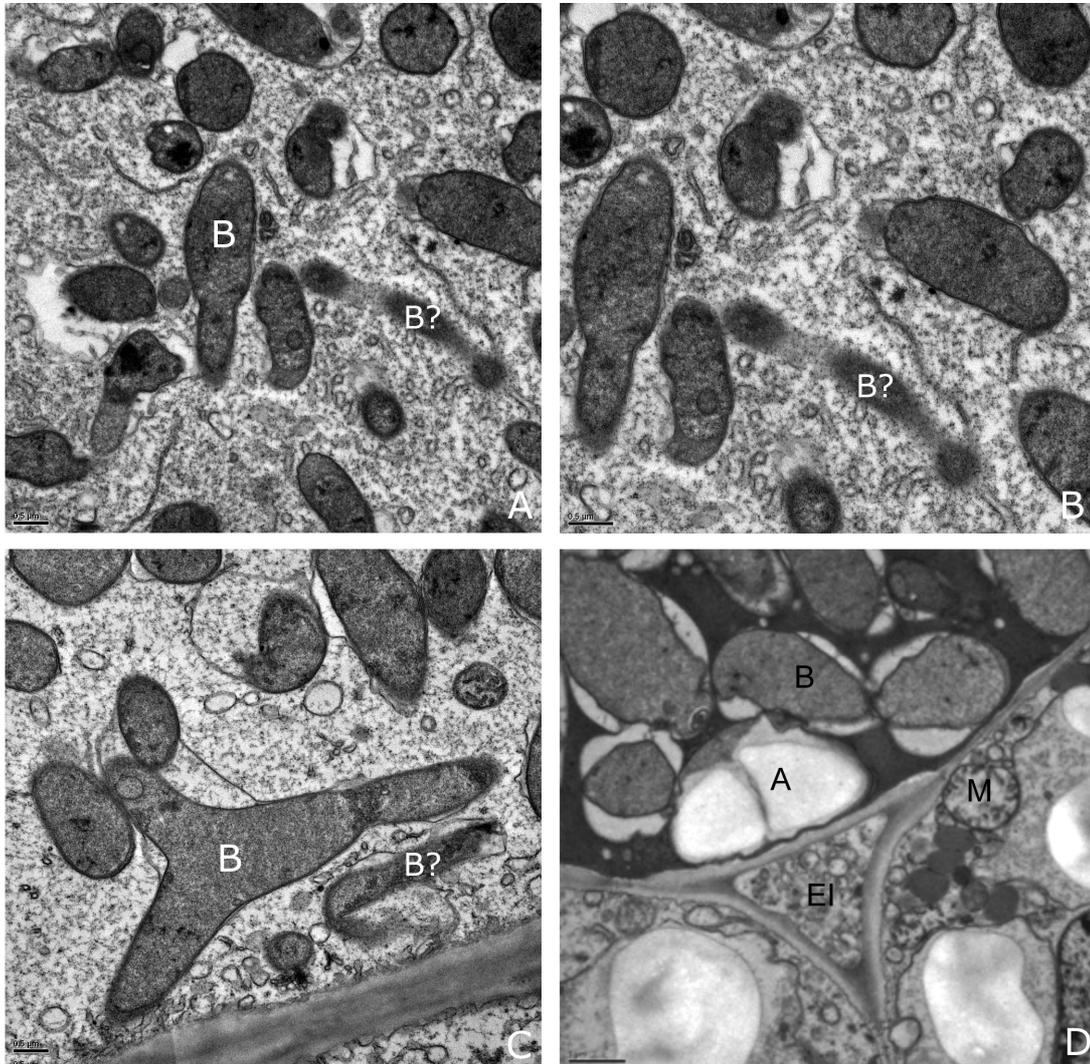


Figura 18. Microscopía electrónica de transmisión de nódulos indeterminados rosáceos inoculados con SM1021 y *Micromonospora* ALFpr18c. B: Bacteroide, B?: Formas que podrían ser microorganismos distintos a bacteroides de SM1021. EI: Espacio intercelular, PC: Pared celular, A: Almidón, M: Mitocondria, EPB: Espacio peribacteroideo, MPB: Membrana peribacteroidea o peribacteroidal.

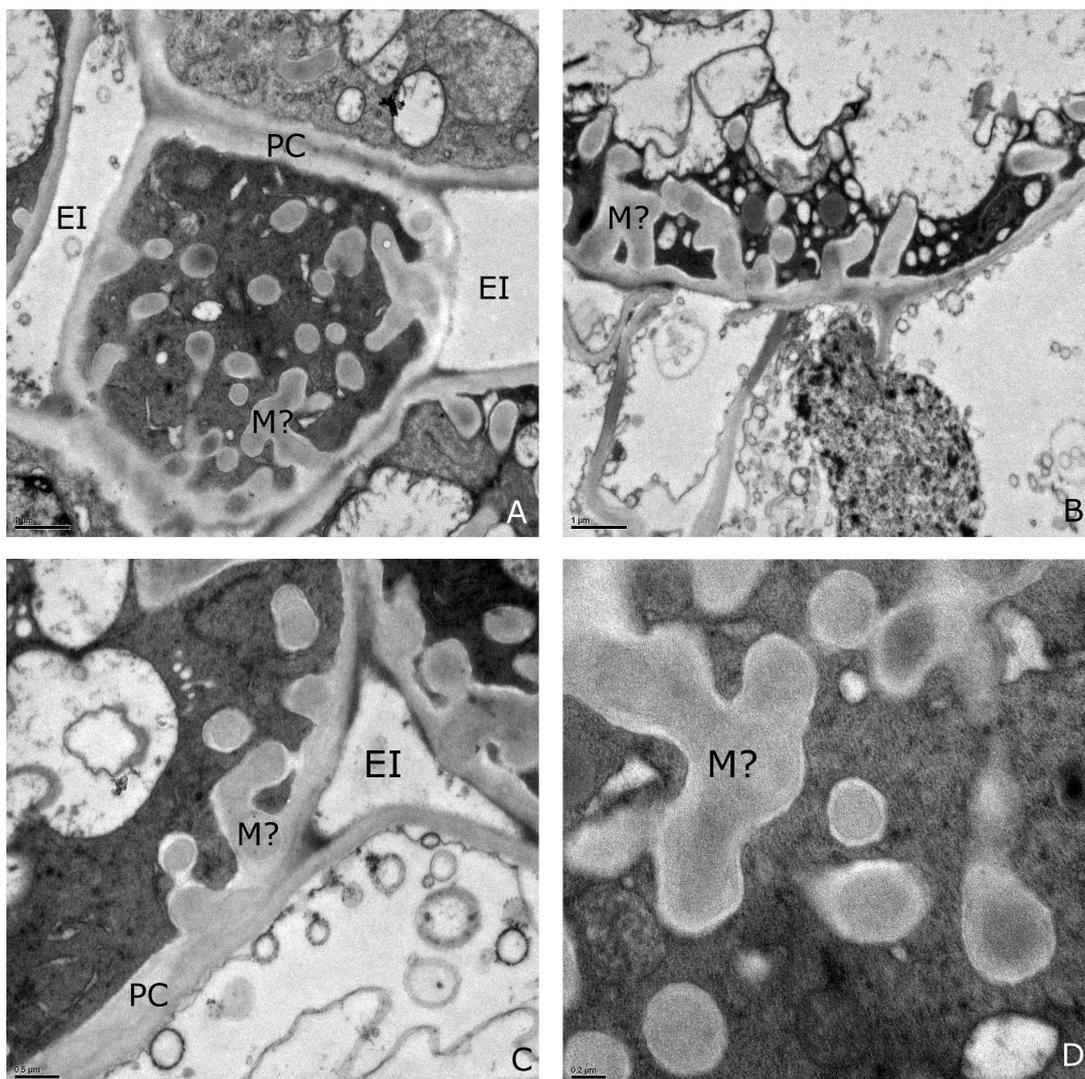


Figura 19. Detalle de un nódulo de alfalfa inoculada con *Micromonospora* ALFpr18c y *S. meliloti* 1021 en la que se observan estructuras extrañas que no aparecen en nódulos sin coinocular. PC: Pared celular, EI: espacio intercelular M?: Posible *Micromonospora*.

Tras el estudio realizado, en el que se han usado diversas técnicas de microscopía, para obtener una visión lo más completa posible de la estructura de estos nódulos, parece claro que existen diferencias morfológicas en la estructura interna de los mismos cuando las plantas han sido sometidas a los diferentes tratamientos de inoculación o coinoculación ya descritos.

Teniendo en cuenta la novedad y relevancia de este estudio, tanto desde un punto de vista teórico como práctico, consideramos que se deben hacer esfuerzos adicionales para establecer de forma inequívoca la presencia de *Micromonospora* en el interior de los nódulos.

Para la confirmación de estos resultados, en el futuro, sería necesaria la utilización de técnicas como la inmunolocalización, utilizando anticuerpos

específicos de *Micromonospora*, que nos permitan confirmar su posición exacta en el nódulo mediante microscopía electrónica de transmisión.

## Discusión

El estudio microscópico de los nódulos generados en los diferentes ensayos descritos en este capítulo, ha permitido profundizar en el conocimiento de la estructura de los diferentes tipos de nódulos que hemos estudiado.

La primera conclusión de este estudio es que *Micromonospora* puede inducir nódulos, especiales por su tamaño y morfología en las raíces de las leguminosas, es interesante que estos tengan una forma afín a los nódulos actinorrícos que están formados por actinobacterias también. Sin embargo, la inducción de esos nódulos no es un evento que tiene lugar siempre, el porcentaje de plantas en las que observamos este tipo de nódulos oscila entre un 0% y un 50% y este porcentaje depende de la cepa que inoculemos. Este es un hecho que se describe por primera vez y que abre nuevas vías para el estudio y aprovechamiento de las interacciones planta-microorganismo.

Cuando se aborda el estudio de estos nódulos, es de destacar que los nódulos de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* son estructuras muy diferentes a los nódulos fijadores de nitrógeno típicos de las asociaciones entre Rhizobia y leguminosas. Son nódulos de gran tamaño blanquecinos o céreos y en los que sus células están repletas de gránulos de almidón y no se observa ninguna estructura que recuerde a las de los nódulos típicos de las raíces de las leguminosas inducidos por Rhizobia. En lugar de órganos para la fijación del nitrógeno atmosférico se han convertido en órganos de reserva.

Otro hecho destacable es que no se pudo detectar ninguna estructura que pudiera ser interpretada como un microorganismo endosimbionte, por tanto, aunque *Micromonospora* es capaz de inducir dichos nódulos no es capaz de colonizarlos, o al menos en este estudio a pesar de que se han utilizado diferentes tipos de microscopía de gran resolución, no han sido detectados.

Aunque estos nódulos parecen haber surgido como consecuencia de una señal o por la producción de alguna sustancia bioactiva capaz de desencadenar una división celular localizada, en las raíces de alfalfa producida por *Micromonospora*, no se concluye el proceso con la colonización del nódulo. La ausencia de *S. meliloti* puede ser la causa de que *Micromonospora* sea incapaz de entrar en esos nódulos aunque estén formados, es de suponer que no posee la capacidad para realizar el proceso de infección y aprovecha los canales de infección proporcionados por *Sinorhizobium* para entrar al nódulo.

Los gránulos de almidón de algunos cortes, son parecidos a las estructuras descritas por El-Tarabily (El-Tarabily *et al.*, 2009) en sus fotografías de microscopía. Cabía la posibilidad de que en este caso también se tratase de

esporas aglutinadas de *Micromonospora*, pero en nuestro caso, las fotografías tomadas en los estudios de microscopía electrónica de barrido muestran que estas formaciones son almidón por la geometría que presentan, y no se trata de ninguna forma de resistencia de una *Actinobacteria*.

Por el contrario, cuando se estudian este tipo de nódulos coraloides de gran tamaño, pero procedentes de plantas que han sido coinoculadas con *S. meliloti* y con *Micromonospora* su estructura es diferente: Su color rosado nos indica que se trata de verdaderos nódulos fijadores de nitrógeno, al contrario que los de color blanquecino. Pese a esto, siguen manteniendo una gran similitud con los nódulos que forma *Frankia*, otra *Actinobacteria*, en no leguminosas.

Además, cuando se comparan los cortes de estos nódulos tan diferentes de los habituales, con los nódulos típicos, que son la mayoría, procedentes de la misma raíz, no hay diferencia alguna entre ellos a nivel microscópico.

Sin embargo, sí se han encontrado diferencias entre la estructura de estos nódulos y los generados por *S. meliloti*. También en este aspecto la presencia de *Micromonospora* acompañando a *S. meliloti* genera cambios en la estructura nodular. Es la presencia de este microorganismo la que da lugar a esos cambios, independientemente de la morfología macroscópica del nódulo.

Los aspectos más destacables de los cambios en la estructura y la ultraestructura nodular son los siguientes:

En primer lugar se observan células infectadas con estructuras peculiares y claramente diferentes de los bacteroides, en ambos tratamientos de coinoculación, lo que nos lleva a pensar que se trate de un endosimbionte que no es *Sinorhizobium* y puesto que (i) sólo se observa en los tratamientos de coinoculación con *S. meliloti* y *Micromonospora*, (ii) se han mantenido las condiciones axénicas en el cultivo, (iii) que este hecho no es puntual sino que se repite de forma consistente en los cortes analizados y (iv) se reaisla *Micromonospora* de los nódulos, cumpliendo los postulados de Koch, se puede deducir que el nuevo endosimbionte tiene que ser *Micromonospora*. Además, este tipo de estructura nueva se repite en las observaciones realizadas con todas las técnicas de microscopía, óptica, TEM y SEM lo que no implica que haya que comprobar estos datos mediante inmunolocalización.

Pese a que se han descrito modificaciones en la estructura del nódulo en plantas sometidas a diversos tipos de estrés (Carpena *et al.*, 2003) (Bolaños *et al.*, 1994) (de María *et al.*, 2005), ninguna de las modificaciones es similar a las encontradas en nuestro caso.

Las estructuras encontradas en algunas células del nódulo, son diferentes de las que *Micromonospora* adopta en los medios de cultivo. Sin embargo, no podemos descartar que aunque en el exterior formen un micelio característico con hifas, en el nódulo puedan adaptar su morfología a las necesidades del nuevo entorno como ocurre con otros rizoendosimbiontes.

El segundo aspecto destacable es el aparente ensanchamiento de los canales de infección que puede deberse a la presencia de *Micromonospora*. Nuestra hipótesis sostiene que *Micromonospora* utiliza los canales de infección inducidos por *Sinorhizobium* y su capacidad demostrada para producir enzimas que degradan la pared celular vegetal, dando lugar a ese agrandamiento en los canales de infección. Esta hipótesis se apoya en los estudios realizados sobre el proceso de infección en la asociación entre *Rhizobium leguminosarum* y el trébol. En este trabajo se describe un fenotipo parecido, cuando se analiza dicho proceso utilizando una cepa superproductora de celulasas (Robledo *et al.*, 2008). Sin embargo, es necesario llevar a cabo un estudio más detallado y estudiando un número mayor de cortes para poder aseverar que el tamaño de los canales está modificado.



# Capítulo 5:

PROTECCIÓN FRENTE A  
PATÓGENOS VEGETALES POR  
*MICROMONOSPORA*



## PROTECCIÓN FRENTE A PATÓGENOS VEGETALES POR *MICROMONOSPORA*

### Introducción

En las interacciones mutualistas entre bacterias y plantas, el efecto beneficioso que estas bacterias ejercen, puede ser debido, como hemos visto en capítulos anteriores de esta tesis, a que tienen un efecto directo sobre el crecimiento de las plantas, por diversos mecanismos. También puede deberse a mecanismos indirectos, evitando los efectos negativos de organismos fitopatógenos sobre el crecimiento y productividad vegetal (Glazebrook, 2005).

Se han descrito un buen número de actinobacterias que incrementan la producción vegetal eliminando los efectos negativos de los patógenos de las plantas. La protección de las plantas se puede llevar a cabo por mecanismos directos, como la síntesis de sustancias que inhiben el crecimiento del patógeno (antibióticos, enzimas líticas o sideróforos) o de forma indirecta induciendo las respuestas de defensa de la planta (Conn *et al.*, 2008), (Hirsch & Valdes, 2010) (Qin *et al.*, 2010), (Shimizu, 2011), (Verma *et al.*, 2011).

Debido a estos antecedentes y con el objetivo de analizar el estudio de las capacidades antimicrobianas de nuestros aislados, para descubrir su potencial en relación a la protección de la plantas, frente a patógenos de cuarentena seleccionados por su virulencia e importancia agronómica en la península, se plantearon unos objetivos específicos que se detallan a continuación.

Los objetivos que nos planteamos fueron los siguientes: (i) Estudiar la producción de antibióticos difusibles al medio de cepas de *Micromonospora* seleccionadas de entre los aislados de nuestro estudio. (ii) Determinar la capacidad de producción de sideróforos por las cepas de este estudio. (iii) Analizar la capacidad de estas cepas como inductores de mecanismos de defensa de la planta frente a patógenos, en concreto *Botrytis cinerea*. (iv) Determinar que rutas de señalización regulan los mecanismos de defensa inducidos en la planta en presencia de *Micromonospora* cuando se infecta con *B. cinerea*.

### Antibiosis

Las actinobacterias en general, desde la década de los 40, han sido consideradas como el grupo microbiano que alberga el mayor número de productores de antibióticos de la naturaleza. *Streptomyces* en concreto es el género del que se conocen un mayor número de metabolitos secundarios con capacidades

antibióticas, pero *Micromonospora* es también uno de los géneros microbianos más importantes en este aspecto.

La antibiosis como mecanismo de acción de los PGPR se ha ido documentando, cada vez de forma más amplia, durante las pasadas décadas y se han identificado una gran variedad de especies de microorganismos, capaces de desarrollar este tipo de acción PGPR, muchos de los cuales como era de esperar, son actinobacterias (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006) (Tan *et al.*, 2006).

Estos resultados, indican que un amplio y diverso número de actinobacterias endofitas tiene la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana. Muchas de estas sustancias tienen actividad antifúngica o antibacteriana. Por tanto, era evidente la necesidad de estudiar este mecanismo de protección en nuestros aislados.

### Estudios in vitro

El objetivo de este estudio fue determinar si alguna de nuestras cepas producía antibióticos que inhibieran *in vitro* el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas de interés. Puesto que en la mayoría de los casos la capacidad de producir este tipo de sustancias es una característica ligada a las cepas, estos estudios se desarrollaron con todas las cepas aisladas en España.

Las cepas de hongos y bacterias utilizadas fueron cedidas por el Centro de diagnóstico Biológico de la Junta de Castilla y León en Aldearrubia (Salamanca) y todos son patógenos vegetales de cuarentena, elegidos por su importancia en los cultivos de la península. Las bacterias utilizadas aparecen en la tabla 1.

Tabla 1: Bacterias utilizadas en los ensayos de antibiosis.

ORGANISMO	REFERENCIA	HOSPEDADOR	HÁBITO
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CRD 04/210	<i>Solanum lycopersicum</i>	Biotrofica
<i>Erwinia amylovora</i>	CRD 08/FB42	<i>Pyrus communis</i>	Necrotrofico
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	CRD 08/327	<i>Daucus carota</i>	Necrotrofico
<i>Pectobacterium chrysanthemi</i>	CRD 07/239	<i>Solanum tuberosum</i>	Necrotrofico
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisi</i>	CRD 08/148	<i>Pisum sativum</i>	Hemibiotrofo
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	CRD 08/FB4	<i>Pyrus communis</i>	Hemibiotrofo
<i>Ralstonia solanacearum</i>	CRD 08/C53	<i>Solanum tuberosum</i>	Necrotrofico
<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	CRD 04/XV19B	<i>Capsicum annuum</i>	Biotrofica

Los hongos usados en el estudio tenían en su totalidad hábito necrotrofo de alimentación, son los siguientes:

*Fusarium circinatum*  
*Sclerotinia sclerotiorum*  
*Rhizoctonia solani*  
*Botrytis cinerea*

### Procedimiento

Todos los patógenos fueron cultivados en placas Petri con medio de cultivo SA1, antes de los ensayos de antibiosis frente a *Micromonospora*, para comprobar que su crecimiento era normal en este medio. Para realizar el ensayo, *Micromonospora* fue sembrada en una única estría central una semana antes de la inoculación de los patógenos e incubada a 28 grados centígrados durante 7 días (Figura 1).

La inoculación de las bacterias patógenas se realizó con asa de siembra en estrías perpendiculares a la de *Micromonospora* y los hongos se inocularon por plugs (material y métodos), dos por placa, equidistantes a la estría de *Micromonospora* como se puede ver en la figura 1.

Estas placas, tras la segunda siembra, se incubaron a 28 grados centígrados en el caso de las bacterias patógenas y a 31 grados en el caso de los hongos. Y en ambos casos se mantuvieron en estas condiciones durante 6 días más, realizando observaciones cada 48 h.

### Resultados y discusión

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se ha intentado utilizar un criterio de valoración basado en el halo de inhibición, que pudiera aplicarse para todos los patógenos estudiados y nos permitiera un análisis semicuantitativo de los resultados. El hábito de crecimiento de los hongos y las características del ensayo hacen que en este caso la mejor opción fuera utilizar un sistema cualitativo.

Ninguna de las bacterias fitopatógenas estudiadas (Tabla 1) vio afectado su crecimiento cuando fueron inoculadas frente a las cepas de *Micromonospora* con las que se realizó el estudio. Estos resultados son coherentes con resultados de las interacciones microbianas intranodulares, ya que *Micromonospora* convive en el interior de los nódulos de leguminosas con bacterias, principalmente Rhizobia, sin causar ningún perjuicio a su desarrollo. De hecho, en muchos casos *Micromonospora* tiene incluso un efecto sinérgico con los Rhizobia del interior de la planta (capítulo 3).

Por el contrario, algunas cepas de *Micromonospora*, mostraron una clara actividad antifúngica frente a los hongos fitopatógenos estudiados. Se observaron distintos tipos de respuesta en el efecto inhibitor sobre estos hongos.

La respuesta inhibitoria más clara se muestra en las imágenes de la figura 1, en la que observamos como se detienen el crecimiento del hongo a una cierta distancia del microorganismo productor, el efecto de inhibición (por difusión en el medio de la sustancia antibiótica) crea una línea a partir de la cual el hongo no crece, en este caso el hongo que sufre la inhibición es *S. sclerotiorum* (este

comportamiento se corresponde con la letra R en la tabla 2. En la figura 2 se muestran otros ejemplos de microorganismos que producen el mismo tipo de inhibición, en esta figura, la imagen de la derecha, muestra una placa Petri en la que la cepa de *Micromonospora*, no producía ningún antibiótico y se puede apreciar que la placa está completamente invadida por el hongo que es capaz de crecer sobre la estría de *Micromonospora*.



Figura 1. Ensayos de antibiosis *in vitro*. A la izquierda, placa inoculada con las bacterias patógenas, en la que no se observa inhibición para ninguna de ellas, y a la derecha placa inoculada con dos de los hongos patógenos seleccionados (*Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*) en la que se observa inhibición del crecimiento muy marcada para segundo de ellos.



Figura 2. Inhibición del crecimiento de los hongos *Fusarium circinatum* y *Sclerotinia sclerotiorum* frente a tres cepas diferentes de *Micromonospora*. De izquierda a derecha, las dos primeras muestran una inhibición del crecimiento de uno de los hongos y la última, ningún efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

En otros casos, se observaba una disminución, a veces muy drástica, del crecimiento los hongos patógenos. El tamaño de la colonia se reduce de forma clara frente a los controles y frente a cepas que no producen agentes inhibidores del crecimiento (Figura 3). Este tipo de inhibición del crecimiento es

representada con una P en la tabla 2. En algunas ocasiones también se produce una inhibición total de crecimiento del hongo, que se representa con una T en la tabla 2.

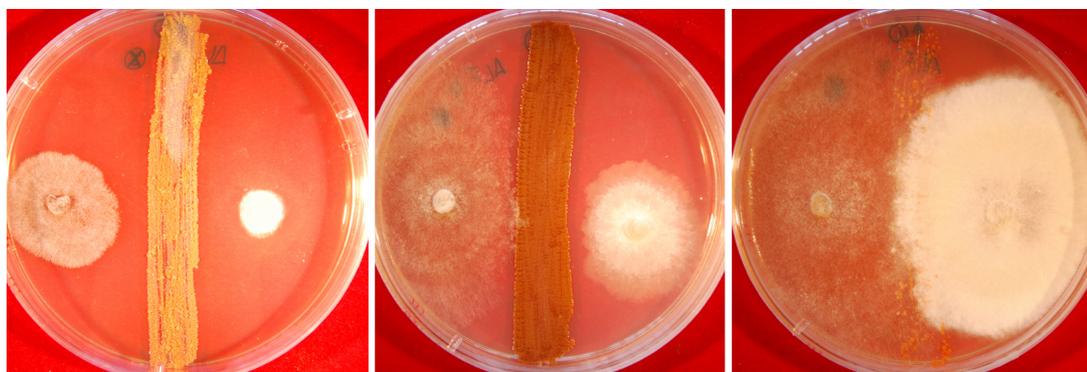


Figura 3. Inhibición del crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* frente a tres cepas diferentes de *Micromonospora*. De izquierda a derecha, fuerte inhibición del crecimiento, inhibición parcial del crecimiento, ningún efecto sobre el crecimiento de los hongos fitopatógenos.

En la figura 3 podemos observar ejemplos de cepas de *Micromonospora* que causan el tipo de inhibición representado con la P en la tabla. En la fotografía de la izquierda el tamaño de las colonias de los dos hongos *B. cinerea* y *R. solani* es muy pequeño, en un caso se reduce al tamaño del plug usado para la inoculación. En la imagen del centro la inhibición es menos drástica y en consecuencia el tamaño de las colonias es mayor. En la imagen de la derecha no se observa inhibición en el crecimiento de los hongos, cuyo micelio crece por encima de la estría de la cepa de *Micromonospora*.

De estos resultados se infiere que algunas cepas de *Micromonospora* (Tabla 2) producen sustancias con actividad antifúngica, que difunden en el medio e inhiben el crecimiento de los hongos fitopatógenos estudiados.

Tabla 2. Cepas de *Micromonospora* capaces de inhibir el crecimiento de los hongos patógenos del estudio. R: Inhibe el crecimiento a una distancia determinada de *Micromonospora*, P: El hongo crece más despacio que en condiciones normales, T: El hongo no crece.

Cepas	AL4	AL16	AL20	ALF1	ALF2	ALF4	ALF7	ALFb1	ALFb5	ALFb7	ALFpr18c	ALFpr19a	ALFr4
<i>F. circinatum</i>						P				P			
<i>S. sclerotiorum</i>	R	R	P								R		R
<i>R. solani</i>			R	T	T				P	P	P	T	
<i>B. cinerea</i>	P		P	T	T		P	P	R		P	T	P

Se han estudiado una gran número de cepas de *Micromonospora*, pero sólo las trece cepas que se incluyen en la tabla 2 tuvieron algún tipo de efecto sobre el crecimiento de los hongos estudiados.

En concreto, sólo dos cepas de *Micromonospora* (ALF4 y ALFb7) mostraron actividad frente a *F. circinatum*. Cinco cepas (AL4, AL16, AL20, ALFpr18c y ALFr4) produjeron metabolitos activos frente a *S. sclerotiorum*. Siete cepas (AL20, ALF1, ALF2, ALFb5, ALFb7, ALFpr18c y ALFpr19a) fueron activas inhibiendo el crecimiento de *R. solani* y por último, *B. cinerea* fue el hongo fitopatógeno más sensible a las sustancias con capacidad antibiótica, que producían estas cepas de *Micromonospora*, puesto que, 10 de ellas inhibieron su crecimiento (AL4, AL20, ALF1, ALF2, ALF7, ALFb1, ALFb5, ALFpr18c, ALFpr19a y ALFpr4).

Este ensayo nos ha permitido seleccionar 13 cepas que pueden ser útiles para la protección de cultivos, frente a los patógenos que hemos utilizado. Su potencial como agentes de biocontrol tiene que ser investigado en el futuro, pero los resultados obtenidos en estos estudios *in vitro* son realmente prometedores.

Los agentes de biocontrol son una alternativa real a los fungicidas químicos y pueden ser aplicados solos o dentro de una estrategia de control integrado. Este tipo de agentes se han venido utilizando a lo largo de décadas con excelentes resultados, el caso más claro de su utilidad ha sido *Bacillus thuringiensis* que se viene utilizando como agente de biocontrol desde la década de 1920. La gran especificidad de acción de las toxinas que producen, es la razón de su interés puesto que son considerados respetuosos con el medio ambiente, al producir pocos efectos no deseables en otros seres vivos que no son su diana específica.

## Sideróforos

El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de todos los seres vivos. Es un metal esencial en reacciones redox, estando involucrado en la fotosíntesis, la respiración mitocondrial, asimilación de nitrógeno etc. Este elemento es muy común en el suelo pero difícil de obtener por los seres vivos, puesto que, mayoritariamente se encuentra como  $Fe^{3+}$ , que es insoluble y por tanto no asimilable. Su escasa biodisponibilidad en el suelo, da lugar a una competencia muy fuerte por este elemento. En condiciones limitantes de hierro muchos microorganismos producen compuestos de bajo peso molecular denominados sideróforos que secuestran el ión férrico. Esta producción de sideróforos, por algunos de los microorganismos que interaccionan con plantas y actúan como PGPR, priva a los hongos patógenos de este elemento esencial, debido a que los sideróforos fúngicos tienen una afinidad por el hierro más baja que las bacterianas.

Las actinobacterias se encuentran entre los grupos microbianos capaces de producir sideróforos y han desarrollado mecanismos eficientes para la captación

de hierro. Varias especies de *Nocardia*, *Streptomyces* y *Arthrobacter* se han descrito como productoras de sideróforos de tipo hidroxamato (Verma *et al.*, 2011) (Lee *et al.*, 2012).

Dada la importancia de este tipo de metabolitos, el objetivo de este apartado es determinar la capacidad de producción de sideróforos por las cepas de *Micromonospora* aisladas en este estudio.

### Procedimiento

Para estudiar la capacidad de producir sideróforos se ha utilizado el medio de cultivo M9-CAS-AGAR (material y métodos) La producción de cada cepa fue evaluada observando el tamaño y tonalidad de los halos que se generan alrededor de las colonias del microorganismo.

Las cepas de *Micromonospora* aisladas para este estudio se sembraron en medio de cultivo sólido SA1 (material y métodos). Tras su incubación durante 10 días se realizaron suspensiones de turbidez 5 en la escala de McFarland y se sembraron, por agotamiento en estría en el medio M9-CAS-AGAR. La dispersión y tamaño de las colonias evita los falsos positivos. Sólo se han considerado positivos las cepas que daban lugar a un halo nítido como los que se aprecian en la figura 4.

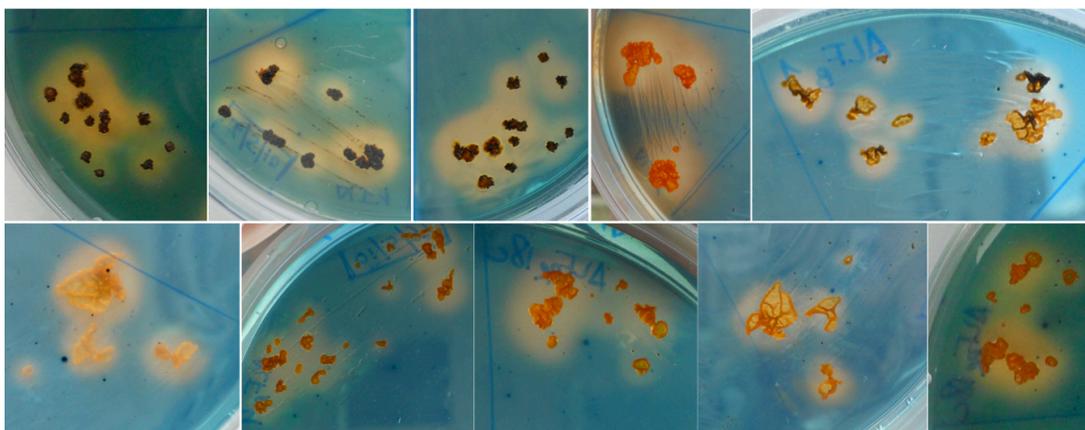


Figura 4. Detalle de colonias de *Micromonospora* en medio CAS exhibiendo su capacidad para producir sideróforos.

### Resultados y discusión

La capacidad de producir sideroforos es un carácter muy común entre las cepas aisladas de nódulos de este género. De hecho, todas nuestras cepas producen un halo extenso y claro que indica la producción de este tipo de sustancias.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el biocontrol es considerado como un mecanismo indirecto de promoción del crecimiento de las plantas por los microorganismos. En este efecto pueden jugar un papel importante la

producción de sideróforos. Los sideróforos bacterianos, provocan una deficiencia a los hongos patógenos de este elemento esencial, debido a que los sideróforos fúngicos tienen una afinidad por el hierro más baja que los bacterianos.

Se demuestra, que los aislados de este estudio, tienen la capacidad de producción de sideróforos y por tanto un nuevo mecanismo que puede, en condiciones naturales, estar implicado tanto en el aporte de nutrientes a la planta como en su defensa frente a hongos patógenos lo que incrementa su interés potencial en agrobiotecnología.

### **Inducción de los mecanismos de defensa vegetales**

Como se ha descrito en los apartados anteriores, la acción PGPR también puede llevarse a cabo, evitando los efectos negativos de organismos fitopatógenos, sobre el crecimiento y productividad vegetal (Compant *et al.*, 2005a), (Gadelhak & El-Tarabily, 2005). Esta protección se puede realizar, además de por mecanismos directos que ya han sido descritos o estimulando los mecanismos de defensa de la plantas. Muchas actinobacterias descritas como PGPR tienen una acción clara como inductores de las respuestas defensivas de la plantas (Lehr *et al.*, 2008), (Conrath *et al.*, 2006).

Las plantas han desarrollado mecanismos para percibir posibles agresores y defenderse de ellos activando una serie de mecanismos de defensa como la producción de sustancias tóxicas y enzimas con propiedades antimicrobianas (Pathogenesis Related Proteins). La regulación de estas respuestas está coordinada principalmente por las fitohormonas ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y etileno (ET). Las rutas de señalización reguladas por estas hormonas interactúan por medio de la sinergia o el antagonismo para ajustar el tipo de respuesta activado según el patógeno al que se enfrente.

Diversos estímulos pueden aumentar la capacidad defensiva de la planta. Algunos microorganismos beneficiosos o tratamientos químicos pueden activar directamente los mecanismos de defensa, lo que puede hacer a la planta más resistente en caso de ataque, pero si este no se da, la producción continua de defensas causa un perjuicio para la planta debido a su alto coste energético y nulo beneficio al no ser atacada. Sin embargo, existe un fenómeno conocido como "priming", en el que el estímulo no activa directamente las defensas, sino que preconditiona a la planta de modo que en caso de ataque su respuesta sea mayor o más rápida, lo que implica una inducción de resistencia eficaz y con costes mínimos para la planta (van Hulten, 2006). La inducción de resistencia mediante "priming" tiene un coste mínimo sobre el crecimiento de la planta o la cosecha final, ya que la respuesta defensiva se desencadena sólo en caso de necesidad.

La respuesta SAR se produce cuando las plantas activan sus mecanismos de defensa, en respuesta a la infección primaria de un microorganismo fitopatógeno, que induce una reacción hipersensible en la que el patógeno queda confinado en una zona necrótica (Walters & Heil, 2007). La respuesta ISR suele ser activada por microorganismos beneficiosos (Bakker *et al.*, 2003) y es muy similar fenotípicamente a la respuesta SAR ya que ambas respuestas tienen la misión de proteger a la planta frente a ataques de fitopatógenos (Vallad & Goodman, 2004). Esta capacidad de inducción de la respuesta defensiva de la planta ha sido demostrada en bacterias que interactúan con plantas entre las que se incluyen las actinobacterias endofitas y hongos beneficiosos del suelo.

La diferencia entre ambos mecanismos defensivos es que el ISR es inducido por PGPRs los cuales no causan síntomas en la planta. Los mecanismos que utilizan los PGPRs para activar la respuesta ISR es aún desconocido (Haas *et al.*, 2002). Para reconocer y responder a esta gran variedad de organismos tanto patógenos como beneficiosos, las plantas han desarrollado estrategias muy sofisticadas para percibir microorganismos y responder adecuadamente a ese estímulo. Esta respuesta es muy compleja y también flexible en su capacidad para reconocer y responder a patógenos. El ácido jasmónico y sus derivados, los jasmonatos (JAs), son considerados señales importantes en la regulación de las respuestas vegetales a microorganismos. La compleja interacción entre los JAs y las señales de alarma: ácido salicílico y etileno proveen a la planta de un sistema regulatorio que es responsable del resultado de las interacciones planta-microorganismo.

### Estudios de protección in vivo (planta entera)

Gracias a los excelentes resultados obtenidos en las pruebas de antibiosis *in vitro*, y tomando en consideración los resultados de los estudios de promoción directa de la productividad vegetal, se utilizaron las cepas de *Micromonospora* más prometedoras (en este caso se trataba de las denominadas ALFb5 y ALFpr18c) en ensayos que tuvieran una mayor proyección agronómica. Se seleccionó *Botrytis cinerea* como microorganismo fitopatógeno de prueba, por ser un hongo que además de ser un problema severo en agricultura está bien caracterizado, por su facilidad de manejo y la sencillez y objetividad con la que se podían ver y cuantificar los síntomas. Además, al ser un patógeno foliar permitía estudiar el efecto de la bacteria PGPR a través de la planta, excluyendo interacciones directas bacteria-patógeno. La planta de tomate variedad Roma, fue elegida como soporte vegetal en este estudio.

### Procedimiento

Para este experimento se germinaron semillas de tomate previamente esterilizadas en superficie (material y métodos). Estas semillas se germinaron en bandejas con turba estéril y se dejaron crecer hasta que apareció la primera hoja verdadera, en este momento se trasplantaron a macetas pequeñas de 1 litro.

Pasadas dos semanas de crecimiento en invernadero, se realizaron las inoculaciones. La inoculación con las dos cepas de *Micromonospora* se realizó, echando un mililitro de una suspensión de la bacteria, de turbidez 5 en la escala Mcfarland. Transcurridas 24 horas, se realiza la infección con *Botrytis* colocando en el centro de cada foliolo un disco de agar con *Botrytis* que había sido incubado durante 48 horas.

Tras la inoculación, las macetas completas fueron introducidas en cajas de plástico transparente, se cerraron, para mantener un ambiente de saturación de humedad y se metieron en cámaras de cultivo a 25°C con un fotoperiodo de 16/8. La evaluación de síntomas se realizó a las 48 horas, midiendo con un pie de rey el diámetro de cada uno de los halos necróticos formados por *Botrytis* en las hojas alrededor del plug.

### Resultados y discusión

Las medidas de los halos de necrosis, tomadas para las plantas que habían sido infectadas sólo con *Botrytis* fueron consistentemente mayores que aquellas que provenían de plantas que habían sido inoculadas previamente con *Micromonospora*. Podemos observar las diferencias en la figura 6.

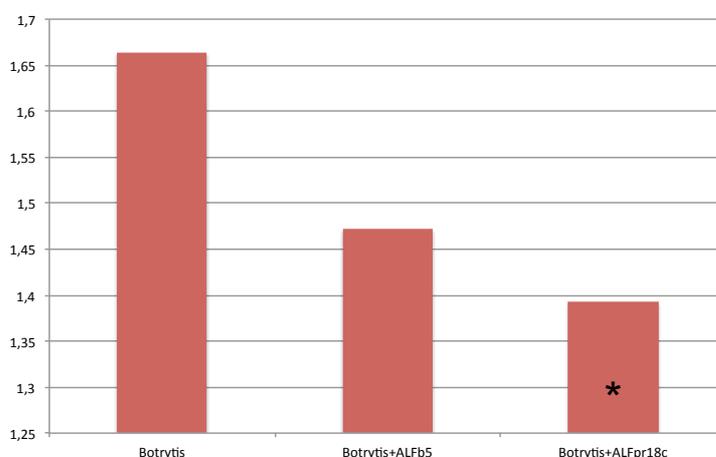


Figura 6. Medidas del diámetro del halo de necrosis en centímetros de los distintos tratamientos. Tratamiento control infectado sólo con *Botrytis*, tratamiento con *Botrytis* y *Micromonospora* ALFb5 y *Botrytis* con *Micromonospora* ALFpr18c. Los asteriscos indican que las diferencias son estadísticamente significativas con respecto a su control en un test LSD para un p valor  $\leq 0,05$ .

En la figura 6 y tabla 3 se observa que las plantas inoculadas con la cepa de *Micromonospora* ALFpr18c son las que tenían un menor diámetro de halo en las lesiones ocasionadas por *Botrytis*. Los diámetros de las lesiones de las plantas inoculadas con ALFb5 también eran menores que las de los controles, pero únicamente los resultados de las plantas inoculadas con ALFpr18c eran significativamente menores, según los resultados obtenidos a partir del programa SPSS con un ANOVA univariante y un test post hoc LSD.

Por tanto, podemos concluir que además de capacidades antifúngicas, las cepas de *Micromonospora* seleccionadas son capaces de inducir algún tipo de respuesta defensiva en la planta.

El procedimiento seguido para este experimento implica que las cepas ALFpr18c y ALFb5 se inocularon en la raíz, sin ningún contacto con las hojas y los resultados mostrados indican que hay diferencias en cuanto al tamaño del área de necrosis y por tanto mayor protección de la planta frente a *Botrytis* que sólo se inoculó en las hojas. Parece poco probable que un antifúngico excretado por una bacteria en la raíz de la planta sea captado y se desplace por vía de los haces vasculares, desde la raíz hasta las hojas. La explicación más plausible es que *Micromonospora* sea capaz de inducir o potenciar alguno de los sistemas defensivos vegetales, como la respuesta SAR asociado a la ruta del salicílico o la respuesta ISR ruta de respuesta en la que están implicadas las rutas del etileno y el jasmónico, y esa respuesta de la planta sea la causa de que disminuya de forma clara el daño que causa la acción del hongo.

#### Estudios de protección in vivo (hojas escindidas)

Para demostrar que *Micromonospora* realmente causaba una activación de las rutas defensivas de la planta y descartar cualquier otro tipo de interacción, se decidió repetir el experimento de infección por plugs con micelio del hongo, pero cambiando el protocolo de inoculación de las plantas con las cepas de *Micromonospora*. Las plantas se inocularon con las cepas ALFpr18c y ALFb5, en dos etapas del experimento. En un bloque de macetas con un mes de antelación y en otro con sólo un día antes de la escisión de las hojas de tomate que se iban a utilizar en el ensayo. Tras cortar las hojas, se colocaron en cámaras húmedas y se inocularon los folíolos con un plug de *Botrytis* cada uno, de la misma forma que se habían inoculado en plantas completas.

Se midieron los halos de necrosis tanto en hojas de plantas sin florecer, como en hojas de plantas que ya habían florecido, esta vez asignando valores según la gravedad de la necrosis y no el diámetro del halo. El valor 1 se le da a los folíolos menos afectados por el hongo y el valor 5 a folíolos casi completamente necrosados, se pueden ver ejemplos de halos en la figura 7.



Figura 7. Halos de necrosis ocasionados por *B. cinerea* en hojas de tomate. De izquierda a derecha los valores asignados a estas lesiones son 1, 2 y 3.

### Resultados y discusión

En este estudio se confirman los resultados para la cepa ALFpr18c. La protección frente al fitopatógeno se mantiene independientemente del momento de inoculación de esta bacteria (ya fuera un día o un mes antes de la infección) en ambos casos se observa la misma tendencia que en ensayos previos, siendo las lesiones de los tratamientos con ALFpr18c de menor tamaño que las del control, que presenta un 60% de lesiones de nivel 3, cuando las plantas inoculadas con la bacteria tenían un 90% o un 70% de las lesiones entre los valores 1 y 2. Sin embargo, la capacidad de defensa frente a *Botrytis* de la cepa ALFb5 no queda clara a largo plazo aunque, en la inoculación un día antes se observan resultados similares a los de ALFpr18c (Figura 8).

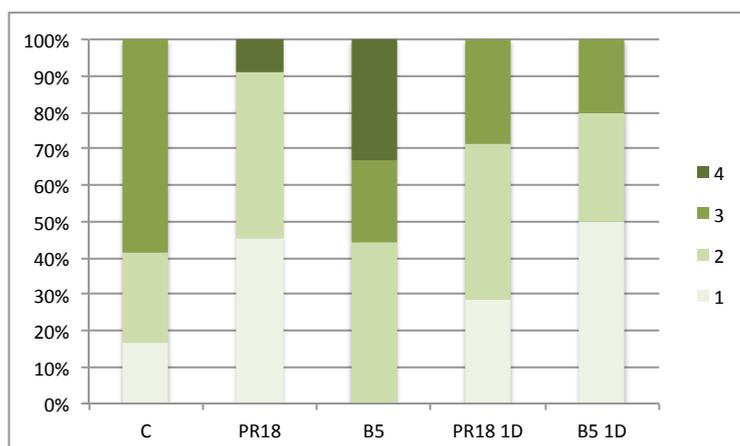


Figura 8. Áreas de necrosis, ocasionadas por *Botrytis*, en hojas escindidas de plantas sin florecer con los siguientes tratamientos: C: Control inoculado sólo con *Botrytis*, PR18: Inoculadas con ALFpr18c un mes antes de la infección con *Botrytis*, B5: Inoculadas con ALFb5 un mes antes de la infección con *Botrytis*, PR18c1D: Inoculadas con ALFpr18c un día antes de la infección con *Botrytis*, B51D: Inoculadas con ALfb5 un día antes de la infección con *Botrytis*. Área de necrosis: 1: pequeña, 2: mediana, 3: extensa y 4: muy extensa.

También en el caso de plantas con flores, obtenemos un resultado similar, aunque las lesiones provocadas por el hongo son mayores en todos los tratamientos. Este resultado era esperable, ya que al entrar en fase reproductiva, las plantas derivan todo el fotosintetizado a las flores y a la formación del fruto, bloqueando otros procesos importantes en estadios vegetativos, lo que se traduce en que las lesiones producidas son mucho mayores que en plantas sin flores. Aún así, ALFpr18c parece causar una disminución en la gravedad de las lesiones ocasionadas, se observa un claro efecto en las plantas inoculadas un mes antes pero el efecto es más evidente sobre todo en las plantas inoculadas un día antes de la infección. Las lesiones de nivel 4 se reducen casi a la mitad y casi a 1/6 respectivamente. ALFb5 continúa sin afectar de forma tan clara al tamaño del halo necrótico (Figura 9).

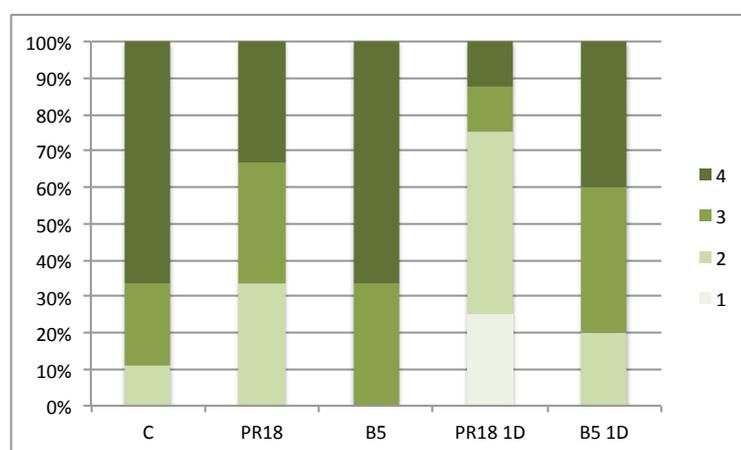


Figura 9. Áreas de necrosis, ocasionadas por *Botrytis*, en hojas escindidas de plantas florecidas con los siguientes tratamientos: C: Control inoculado sólo con *Botrytis*, PR18: Inoculadas con ALFpr18c un mes antes de la infección con *Botrytis*, B5: Inoculadas con ALFb5 un mes antes de la infección con *Botrytis*, PR18c1D: Inoculadas con ALFpr18c un día antes de la infección con *Botrytis*, B51D: Inoculadas con ALfb5 un día antes de la infección con *Botrytis*. Área de necrosis: 1: pequeña, 2: mediana, 3: extensa y 4: muy extensa.

Volvemos a constatar con esta nueva técnica, que las dos cepas de *Micromonospora* tienen un efecto protector de la planta frente al patógeno. En este experimento los ensayos se realizan con hojas escindidas de la planta y en ellas se efectuó la infección en el estudio de protección en planta, lo que nos permite excluir la producción de antibióticos como mecanismo responsable. La acción de estos era poco probable que se trasladara hasta las hojas y menos probable aún, utilizando la técnica de hojas escindidas.

En consecuencia debemos suponer que se trataba de dos mecanismos de defensa diferentes y para demostrarlo se estudió la expresión de determinados ARN mensajeros de la planta infectada, por medio de PCR cuantitativa, para comprobar si *Micromonospora* podía activar alguna ruta defensiva de la planta.

### Inducción de las respuestas defensivas de la planta

A la vista de los interesantes resultados obtenidos en los experimentos realizados con la cepa ALFpr18c, que demuestran la capacidad de protección frente a *Botrytis* tanto en plantas enteras como usando la técnica de las hojas escindidas, se hacía necesario investigar como actuaban estas bacterias y demostrar su modo de acción en la planta a nivel génico. El estudio se realizó con plantas que habían sido inoculadas con *Micromonospora* un tiempo relativamente largo antes de la infección para simular las condiciones que se darían más probablemente en el supuesto de que se aplicaran como inoculantes en cultivos, en los que no se puede prever la aparición de un patógeno.

### Procedimiento

La PCR cuantitativa se basa en la reacción en cadena de la polimerasa pero utilizando métodos por los que se puede observar el desarrollo de esta amplificación de un gen a tiempo real. Es una de las tecnologías más importantes de la era genómica y se ha convertido en el método más usado para la detección y cuantificación de ARN mensajero y por tanto medir la expresión de los genes implicados en un proceso, en un momento concreto.

Varios factores han contribuido a la prevalencia de esta tecnología y su conversión en una técnica de investigación de gran popularidad: (i) Elimina la necesidad de procesado después de la PCR. (ii) Debido a su amplio rango de actuación, permite la comparación directa de ARNs cuya cantidad es muy diferente y (iii) el ensayo permite utilizar el potencial cuantitativo de la PCR, convirtiéndolo al mismo tiempo en un ensayo cualitativo y cuantitativo. Gracias a la importancia que se le confiere hoy en día a la cuantificación de ácidos nucleicos y también a la aparición de instrumentos de segunda generación y reactivos alternativos, ha permitido que esta tecnología pueda desarrollarse en casi cualquier laboratorio de investigación (Bustin *et al.*, 2005).

Además, la PCR a tiempo real ha conseguido eliminar las limitaciones que se presentaban en el pasado gracias a la monitorización del aumento del producto generado en el proceso de la reacción de una PCR.

### Cuantificación del ARN mensajero

Para la PCR cuantitativa, se toma como base el momento o ciclo en el que la amplificación se detecta por primera vez. En cada ciclo se mide la acumulación de producto de PCR y se puede comparar entre dos muestras para determinar una medida relativa de cuantificación, lo que permite medir expresión génica.

Para medir la acumulación de producto, se utiliza un fluoróforo (SYBR Green) que aumenta su fluorescencia con la acumulación de producto. El momento en el que la señal del fluoróforo se hace detectable, o supera un valor designado arbitrariamente (Ct), se mide el número de ciclos que han pasado hasta ese

punto. Este valor (Ct) puede ser comparado con una muestra de la misma planta en la que se mida un gen constitutivo para su normalización.

Dado que hay una relación lineal entre la cantidad de ADN inicial y el Ct, los valores permanecen comparables en varios ordenes de magnitud. También la sensibilidad que se asocia a los fluoróforos es muy grande y la posibilidad de contaminación cruzada se minimiza con este método ya que no es necesario abrir los viales que contienen la reacción de PCR para un posterior estudio ni tampoco la utilización de geles de agarosa para el análisis de estos productos de la amplificación (<http://www.gene-quantification.de/keer-qpcr-book-chapter-7.pdf>).

### Obtención y preparación de las muestras

El protocolo experimental seguido para preparar las muestras, es muy parecido al descrito en el apartado anterior. Semillas de tomate Money Maker se pregerminaron en vermiculita y se trasplantaron en macetas con turba cuando apareció la primera hoja verdadera. Se realizaron los siguientes tratamientos con la cepa ALFpr18c de *Micromonospora*: Unas plantas se inocularon inmediatamente después de ser trasplantadas (aproximadamente un mes antes de la infección con el patógeno) y un grupo de plantas control que no fueron inoculadas.

De todos los tratamientos se recogieron hojas, siempre la misma en cada planta, y se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente. Estas hojas serían usadas como controles frente a las hojas de las mismas plantas que fueron infectadas con el patógeno.

Para la infección con *Botrytis*, se cortaron hojas de características similares, de las plantas de cada tratamiento y se colocaron en bandejas con agua y plataformas de corcho para que sólo el peciolo estuviera en contacto con el agua. En cada bandeja se colocaron todas las repeticiones de cada tratamiento. Para la infección, se obtuvo una suspensión de esporas, siguiendo el protocolo que aparece en material y métodos. Esta suspensión se aplicó a todas las hojas de cada bandeja con un spray en una cantidad de 15 ml por bandeja. Posteriormente, se cubrieron con film transparente y se mantuvieron a 24°C con luz ininterrumpida durante 72 horas con cuidado de mantener la humedad. Pasado este periodo, se realizó el mismo proceso de congelación que con las hojas control.

El procesado de las muestras para la extracción del ARN se llevó a cabo moliendo cada una de las muestras en un mortero cerámico con ayuda de nitrógeno líquido, manteniendo siempre las muestras congeladas; a partir de este preparado se extrae el ARNm con el kit TRIagent (material y métodos).

Se comprobó la cantidad, integridad y calidad de este ARN mediante electroforesis en gel de agarosa y en un Nanodrop respectivamente, para

después utilizarlo como molde para sintetizar por retrotranscripción el cDNA de estos ARN mensajeros.

### Genes analizados

Este cDNA se ajustó a 3µg y fue posteriormente utilizado para una PCR cuantitativa que permite cuantificar el ARNm de genes relacionados con las distintas rutas de defensa de la planta (a nivel de biosíntesis de la hormona o marcador de la respuesta que estas regulan) y medir su nivel de expresión. Se analizaron los siguientes genes cuyo uso como marcadores de rutas de señalización ya está contrastado (López-Ráez *et al.*, 2010):

- LOXA en el caso de la ruta del jasmónico (ISR), que pertenecen a la rama 9-LOX de la biosíntesis de oxilipinas. Su función es la producción de lípidos 9-hidroxi-peróxidos por adición de un oxígeno molecular al ácido linolénico o linoléico en la posición C-9 (Ferrie *et al.*, 1994).
- PinII, que es un gen marcador típico de la ruta del jasmónico y que codifica el inhibidor de la proteínasa II.
- PR1, un marcador bastante común de la ruta del salicílico (SAR), que codifica para una proteína de patogénesis.
- SIEF fue utilizado como gen control para la normalización del resto de los genes. Se trata del gen constitutivo que codifica para el factor de elongación en *Solanum lycopersicum*.

Por medio de esta técnica se puede determinar el nivel de transcripción de cada uno de los genes anteriormente mencionados, de tal modo que si la cantidad de ARNm es alta, la ruta a la que pertenece dicho gen está activada y la respuesta será mayor cuanto mayor cantidad de ARNm se tenga.

### Resultados

En las figuras 10, 11 y 12 se muestran los resultados de todos los tratamientos y los genes estudiados. Se muestran los resultados normalizados, con el gen de expresión constitutiva SIEF.

Aunque esperábamos que la inoculación con *Micromonospora* arrojase luz sobre el mecanismo de acción de esta bacteria, los resultados muestran que la bacteria no induce la expresión de ninguno de los genes estudiados. Esto quiere decir que no tiene un efecto directo en la inducción de los mecanismos de defensa de la planta, ni en la respuesta ISR (ruta del jasmónico) (Figuras 10 y 11) ni en la SAR (ruta del salicílico) (Figura 12).

Por el contrario, cuando comparamos la expresión de los genes en las hojas de plantas de los tratamientos con *Micromonospora* y las infectadas solamente con *Botrytis*, vemos que la respuesta es muchísimo mayor en las hojas coinoculadas, lo que indica que estamos ante un caso de "priming", en el que *Micromonospora*

por sí sola no induce respuesta, pero cuando aparece un patógeno, provoca un incremento importante en la expresión de los genes de la ruta de defensa del jasmónico, que no sucede cuando no ha habido un tratamiento previo con *Micromonospora*.

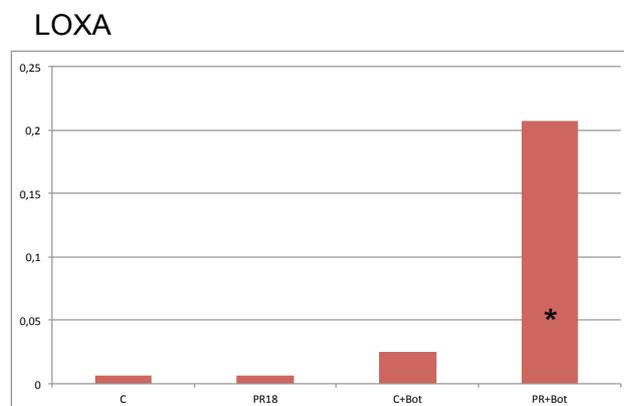


Figura 10. Resultados normalizados de la PCR cuantitativa para el gen LOXA. C: Control sin inocular. PR18c: Tratamiento inoculado sólo con *Micromonospora* ALFpr18c. C+Bot: Tratamiento inoculado sólo con *Botrytis*. PR+Bot: Tratamiento inoculado con ALFpr18c y *Botrytis*. Los asteriscos muestran los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas.

La bacteria por sí sola no provoca ningún cambio en la expresión de ninguno de los genes estudiados, que fueron escogidos por ser los más importantes en respuesta a patógenos en las rutas del jasmónico (LOXA y PinII) y ácido salicílico (PR1).

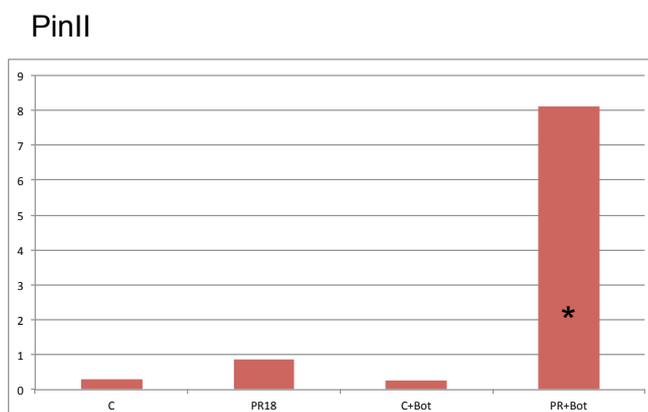


Figura 11. Resultados normalizados de la PCR cuantitativa para el gen PinII. C: Control sin inocular. PR18c: Tratamiento inoculado sólo con *Micromonospora* ALFpr18c. C+Bot: Tratamiento inoculado sólo con *Botrytis*. PR+Bot: Tratamiento inoculado con ALFpr18c. y *Botrytis*. Los asteriscos muestran los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas.

En efecto, los resultados nos muestran que tras el tratamiento de inoculación con *Micromonospora*, si la planta es infectada con *Botrytis*, los niveles de expresión de los genes de la ruta del jasmónico (LOXA y PinII) se ven

incrementados mientras que hay una represión de los genes de la ruta del ácido salicílico (PR1). Este efecto en las plantas tratadas frente a los controles (plantas inoculadas únicamente con *Botrytis*), puede verse en las figuras 10, 11 y 12.

En ellas queda patente que la diferencia entre los valores de los controles y las plantas que sólo habían sido inoculadas con *Botrytis*, frente a las plantas que han sido inoculadas con ALFpr18c antes de la infección con *Botrytis*, supone un incremento de alrededor de 6 veces en la expresión de los genes de la ruta del jasmónico. Todos los datos fueron normalizados con el gen que codifica el factor de elongación de tomate, que es constitutivo.

Es importante volver a reseñar, que en las plantas que sólo habían sido inoculadas con *Micromonospora* no encontramos ninguna expresión de esos genes, ni tampoco el hecho de haber escindido la hoja para el ensayo (daño mecánico) repercutieron en la activación de las respuestas SAR o ISR. En ambos casos los niveles de expresión se mantienen igual de bajos, lo que indica que es *Botrytis* el causante de que se dispare el mecanismo de defensa de la ruta del jasmónico y que esto sólo sucede en plantas pretratadas con *Micromonospora*.

La figura 12, muestra los valores de expresión del gen PR1. Existe una gran diferencia entre las medias de los diferentes tratamientos que marca una tendencia muy clara.

El gen PR1, relacionado con la ruta del ácido salicílico presenta una expresión muy alta en las hojas que fueron únicamente infectadas con *Botrytis* y casi nula en el caso de la coinoculación.

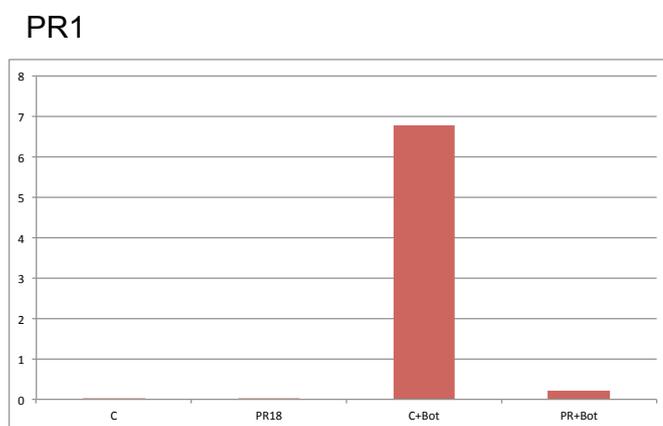


Figura 12. Resultados normalizados de la PCR cuantitativa para el gen PR1. C: Control sin inocular. PR18c: Tratamiento inoculado sólo con *Micromonospora* ALFpr18c. C+Bot: Tratamiento inoculado sólo con *Botrytis*. PR+Bot: Tratamiento inoculado con ALFpr18c. y *Botrytis*. Los asteriscos muestran los tratamientos con diferencias estadísticamente significativas.

Esta diferencia en la expresión de los distintos genes concuerda con estudios anteriores en los que se pone de manifiesto que cuando una de las rutas de defensa se activa la otra tiende a inhibirse.

Por otra parte, la respuesta SAR frecuentemente se produce, cuando la planta activa sus mecanismos de defensa en respuesta a la infección primaria de un microorganismo fitopatógeno. Mientras que la respuesta ISR, puede ser activada por microorganismos PGPR lo que concuerda también con los resultados obtenidos en este estudio.

## Discusión

La producción de sustancias con actividad antibiótica por *Micromonospora*, que se ha puesto de manifiesto en los ensayos *in vitro*, es de gran interés pero debe ser completada en estudios posteriores. Esta capacidad puede estar ligada a la defensa directa de la planta inhibiendo el crecimiento de forma selectiva de hongos fitopatógenos, lo que puede tener un efecto positivo en la productividad vegetal, evitando las pérdidas ligadas a la infección por patógenos, que en algunos casos puede ser muy alta.

Esta misma función se le puede asignar a los sideróforos producidos por la planta, aunque en este caso también pueden tener una función, bajo determinadas condiciones, en la nutrición de hierro en la planta.

Debemos considerar para el futuro, que esta bacteria tiene una versatilidad metabólica muy alta y una gran capacidad de producción de metabolitos secundarios y exoenzimas y es posible que produzca, además de las descritas en la caracterización fenotípica, algún tipo de enzima lítica, de manera análoga a algunas especies de *Streptomyces*, que inhiben la germinación de las esporas de *B. cinerea* por medio de quitinasas (Frankowski *et al.*, 2001). También sería interesante el estudio de la producción de proteasas que se conoce están involucrados en la supresión del crecimiento de *S. sclerotiorum* y *B. cinerea* en otra cepa de *Streptomyces* (Kamensky *et al.*, 2003).

El efecto de "priming" que produce la cepa ALFpr18c de *Micromonospora* es muy útil para la planta, ya que no causa un perjuicio inicial a esta cuando es inoculada, esto quiere decir que su inoculación no induce una respuesta defensiva en la planta de forma inmediata, lo que supondría un coste innecesario para la planta, sino que promueve una respuesta mayor en el momento necesario, con la aparición de un patógeno.

El hecho de que no provoque una alteración en las rutas defensivas de la planta es interesante desde el punto de vista simbiótico, puesto que, incluso frente a bacterias tan beneficiosas como *Rhizobium*, se observa una respuesta inicial. También debemos tener en cuenta que provoca una inhibición de la ruta del salicílico. Este comportamiento podría ser una de las causas que explican que las plantas con capacidad formadora de nódulos como la alfalfa, cuando son coinoculadas con *Micromonospora* y *Sinorhizobium*, tienen un número mucho mayor de nódulos que aquellas que sólo son inoculadas con *S. meliloti*.

Que *Micromonospora* induzca la ruta del jasmónico no es sorprendente, ya que se han encontrado otros endófitos que actúan activando estas rutas (Pettersson & Bååth, 2004), (Pieterse *et al.*, 1998), aunque también son conocidos algunos PGPRs que actúan liberando ácido salicílico (De Meyer & Höfte, 1997), (De Meyer *et al.*, 1999). Además, la ruta del jasmónico está asociada a la defensa de patógenos necrotrofos, ya que no promueve la muerte celular programada como ocurre con la ruta del salicílico. Esta muerte celular no sólo no detiene a organismos necrotrofos sino que es posible que incluso los ayude (Govrin & Levine, 2000), (McDowell, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que la ruta del jasmónico aumenta la resistencia de la planta a patógenos biotrofos cuando se hace constitutiva por mutagénesis (Ellis & Turner, 2001). Por tanto, la activación de la ruta del jasmónico en concreto, justifica la utilidad de *Micromonospora* en la defensa de la planta frente a patógenos, independientemente de si se trata de biotrofos o necrotrofos, ampliando su espectro de acción (Pozo *et al.*, 2005).

También sabemos que *Botrytis* induce la respuesta asociada al salicílico, ya que es beneficiosa para él, e inhibe la del jasmónico, que se trata de la ruta que realmente inhibe a este patógeno. El hecho de que en nuestros experimentos la respuesta al salicílico se mantenga tan baja indica que *Botrytis* no es capaz de inhibir esta respuesta bajo las condiciones en las que se encuentra (Oirdi *et al.*, 2011).

Además, que los mecanismos de defensa se activen sólo cuando aparece el patógeno, y no cuando *Micromonospora* es inoculada hace que la planta no malgaste recursos en defenderse de un patógeno que no está presente es una gran ventaja frente a microorganismos beneficiosos que mantienen la respuesta defensiva de la planta en todo momento.

La fase de la infección de las hojas en el momento de la recolección de muestras y su análisis podría estar relacionada con el hecho de que el "priming" afecte a la ruta del jasmónico y no la del salicílico. En etapas iniciales de una infección, la ruta del salicílico está inhibida a favor de la del jasmónico, y en etapas más avanzadas la situación pasa a ser la contraria, la ruta del salicílico toma protagonismo y la del jasmónico queda inhibida. Sin embargo, esto no explicaría el conjunto de los resultados obtenidos ya que en nuestro estudio, la ruta del salicílico se activa en las plantas control, inoculadas sólo con *Botrytis* y la presencia de *Micromonospora* cambia la ruta activada e inhibe la del salicílico.

Mediante este mecanismo, *Micromonospora* provoca la activación por el patógeno de una única ruta de defensa y no se utilizan la otra mitad de los recursos defensivos (en este caso los relacionados con el SAR) lo que pudiera resultar negativo para la planta. Los resultados muestran, sin embargo, que el "priming" producido por *Micromonospora* ayuda a la planta a obtener una mejor defensa frente a hongos patógenos. En estudios previos en los que se midió el halo necrótico en plantas inoculadas con discos (plug) de *Botrytis*, se observó que los diámetros de los halos de necrosis en las plantas que habían sido

inoculadas con *Micromonospora* eran significativamente más pequeños que los que sólo habían sido infectados con *B. cinerea*.

A la luz de estos resultados sería posible utilizar *Micromonospora* como agente de biocontrol, que proporcione protección de los cultivos frente a hongos fitopatógenos, aplicandolo al mismo tiempo de la siembra, ya que el momento de aplicación no parece tener ningún efecto sobre el "priming" que producen estas bacterias y que su efectividad se mantiene, como mínimo, hasta aún pasado un mes desde su aplicación.

También se ha descrito que algunos genes de endofitos, que están relacionados con la síntesis de antibióticos, son muy similares a genes vegetales implicados en defensa (Austin & Noel, 2003), (Bangera & Thomashow, 1999), lo que lleva a pensar que el efecto de "priming" observado pudiera tener que ver con este tipo de genes propios del endofito que tuvieran actividad interespecies, aumentando la respuesta de la planta sólo cuando se expresaran: en la presencia de un patógeno (Compant *et al.*, 2005b).



# Capítulo 6:

CAPACIDAD FIJADORA DE  
NITRÓGENO DE  
*MICROMONOSPORA*



## CAPACIDAD FIJADORA DE NITRÓGENO DE *MICROMONOSPORA*

### Introducción

Durante la última década se han sucedido una serie de aportaciones científicas de enorme importancia en el campo de la fijación simbiótica de nitrógeno y más concretamente en las interacciones mutualistas con leguminosas. Lionel Moulin y colaboradores en el comienzo de este siglo, (Moulin *et al.*, 2001) describen un nuevo microorganismo que pertenece a la clase  $\beta$  *Proteobacteria* capaz de formar nódulos y fijar nitrógeno en simbiosis con la planta. Es la primera publicación en la que se describe, que una bacteria tan alejada de los clásicos Rhizobia, ha adquirido esta capacidad. Hasta este momento la fijación simbiótica de nitrógeno, parecía una característica exclusiva del *Rhizobium* original, que a lo largo de más de un siglo se había ido diversificando por la descripción de nuevas especies y reclasificaciones de los miembros de este grupo en géneros nuevos, son los que denominamos Rhizobia.

En otros laboratorios se estaba trabajando en una dirección similar y de forma muy rápida se publican simbiosis fijadoras de nitrógeno en las que el microsimbionte no pertenecía al grupo de los clásicos Rhizobia.

$\alpha$ Proteobacterias		
<i>Blastobacter denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	van Berkum <i>et al.</i> 2002
<i>Devosia neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas <i>et al.</i> 2002
<i>Methylobacterium nodulans</i>	<i>Crotalaria glaucoides</i> , <i>C. perrottetii</i> , <i>C. podocarpa</i>	Giraud <i>et al.</i> 2004
<i>Ochrobactrum lupini</i>	<i>Lupinus</i> spp	Trujillo <i>et al.</i> 2005
<i>Ochrobactrum cytisi</i>	<i>Cytisus</i> spp	Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> 2007
<i>Phyllobacterium trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp	Valverde <i>et al.</i> 2005
<i>Shinella kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Lin <i>et al.</i> 2008
$\beta$ Proteobacterias		
<i>Burkholderia mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp	Moulin <i>et al.</i> 2001
<i>Burkholderia nodosa</i>	<i>Mimosa bimucronata</i> , <i>M. scrabella</i>	Chen <i>et al.</i> 2007
<i>Burkholderia phymatum</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Vandamme <i>et al.</i> 2002
<i>Burkholderia sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Chen <i>et al.</i> 2008
<i>Burkholderia tuberum</i>	<i>Cyclopia</i> spp.	Vandamme <i>et al.</i> 2002
<i>Cupriavidus (Ralstonia) taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>	Chen <i>et al.</i> 2003

Tabla 1. Fijadores simbióticos de nitrógeno que no pertenecen a los clásicos Rhizobia (van Berkum & Eardly, 2002) (Rivas *et al.*, 2002) (Jourand *et al.*, 2004) (Trujillo *et al.*, 2005b) (Zurdo-Piñeiro *et al.*, 2007) (Valverde *et al.*, 2005) (Lin *et al.*, 2008) (Moulin *et al.*, 2001) (Chen *et al.*, 2007) (Vandamme *et al.*, 2002) (Chen *et al.*, 2008) (Chen *et al.*, 2001).

El segundo hito importante en este campo, es la acumulación de evidencias (Liu *et al.*, 2007), (Deng *et al.*, 2011) de que el nódulo no es un órgano, exclusivamente diseñado para que los Rhizobia fijen nitrógeno para la planta y en consecuencia, no sólo hay Rhizobia dentro de los nódulos. Se comienzan a aislar microorganismos no Rhizobia del interior de nódulos de leguminosas, que en muchos casos no son capaces de inducir la formación de nódulos radiculares ni de fijar nitrógeno atmosférico, de acuerdo con los primeros estudios realizados.

En estudios realizados por Valdés *et al.*, 2005 se describe, en nódulos de casuarina, una actinobacteria distinta de *Frankia*, que fue identificada como perteneciente al género *Micromonospora* y que de acuerdo con sus resultados podría fijar nitrógeno atmosférico. En nuestro laboratorio, datos preliminares también apuntaban en esa dirección, el microorganismo parecía crecer en medios libres de nitrógeno y se logró, en una cepa concreta, la amplificación parcial del gen *nifH* (Cerdeja Castillo, 2008), (Trujillo *et al.*, 2010).

En el capítulo 3 de esta tesis ha quedado establecido que la inoculación de las plantas de alfalfa con *Micromonospora* sola o coinoculada con *Sinorhizobium* mejora la nutrición nitrogenada.

Todas estas consideraciones nos han llevado a plantearnos si una de las funciones de *Micromonospora* en el nódulo es la de fijar nitrógeno para la planta junto con *Sinorhizobium*. Para dar respuesta a esta cuestión nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

(i) Comprobar la capacidad de crecimiento de nuestros aislados en medios sin nitrógeno tanto líquidos como sólidos. (ii) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre mediante la técnica de reducción de acetileno. (iii) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno. (iv) Comprobar la capacidad de fijación plantas inoculadas con *Micromonospora* mediante la técnica de reducción de acetileno. (v) Comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en plantas inoculadas con *Micromonospora* midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno.

Para realizar estos estudios han seleccionado cepas de *Micromonospora* con buena capacidad como PGPR. Las cepas elegidas son: ALFpr18c y ALFb5 para todos los estudios y además ALFb4 y ALF2 para los estudios de fijación de nitrógeno en vida libre.

### **Crecimiento en medio semisólido libre de nitrógeno**

Este experimento se llevó a cabo en medio libre de nitrógeno (material y métodos), para comprobar si *Micromonospora* podía crecer en ausencia de nitrógeno lo que implicaría su capacidad para la síntesis de compuestos

nitrogenados a partir de nitrógeno atmosférico, ya que la supervivencia de una célula es imposible sin nitrógeno.

### Procedimiento

Las cuatro cepas utilizadas en el estudio se cultivaron en medio SA1 durante 10 días, se tomaron varias colonias, poniendo especial énfasis en no arrastrar agar con las células y se prepararon suspensiones de turbidez 5 en la escala de McFarland en agua estéril. Estas suspensiones bacterianas se utilizaron para inocular en picadura dos grupos de tubos de ensayo. El primero con medio semisólido libre de nitrógeno y el segundo con un aporte de extracto de levadura de 0,20 g/L (Figura 1). Se incubaron durante 2 semanas y pasado este tiempo se observaron los resultados.

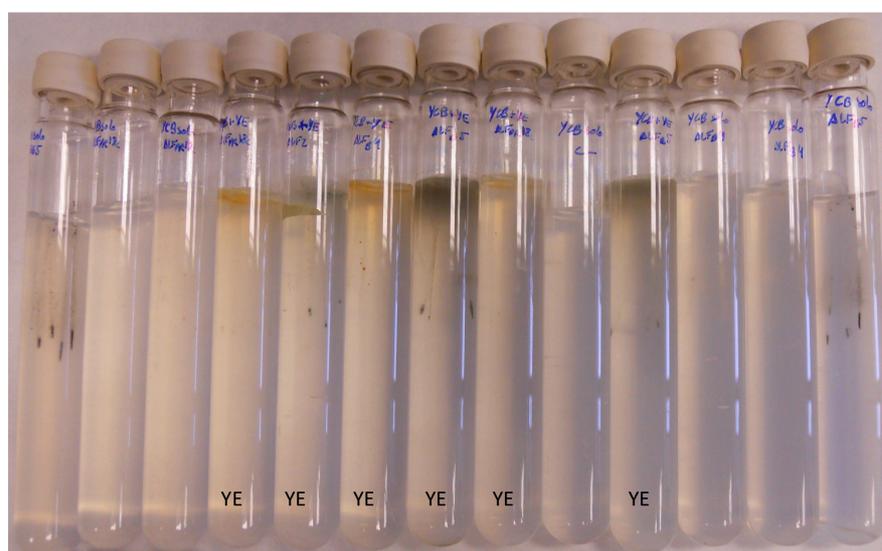


Figura 1. Crecimiento en medio semisólido de las cepas de *Micromonospora* seleccionadas. YE medio con extracto de levadura.

### Resultados

En la figura 1 se pueden observar parte de los cultivos y los resultados de crecimiento en estas condiciones. Las cepas de *Micromonospora* utilizadas son capaces de crecer en este medio de cultivo tanto con aporte de extracto de levadura como en el medio libre de nitrógeno. El crecimiento que se obtuvo fue muy heterogéneo pero todas las cepas crecieron de forma visible en estos medios de cultivo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cerda (Cerda Castillo, 2008) y Trujillo (Trujillo *et al.*, 2010) con aislados de *Lupinus* pertenecientes al mismo género.

En los medios de cultivo con agar se pueden introducir contaminantes que permitan un crecimiento moderado de estos microorganismos, muchos de los

cuales son oligotróficos. Para contrastar estos resultados se realizó un experimento similar en medio líquido.

### **Crecimiento en medio líquido sin nitrógeno**

Se llevó a cabo en Medio libre de nitrógeno (material y métodos), para comprobar si *Micromonospora* podía crecer realmente en ausencia de nitrógeno. En este tipo de ensayos se realizan tres subcultivos seriados en este medio, y puesto que supervivencia de una célula es imposible sin nitrógeno, el crecimiento en estas condiciones implicaría que fijan nitrógeno atmosférico.

#### Procedimiento

Las cuatro cepas utilizadas en el estudio se cultivaron en medio SA1 durante 10 días, se tomaron varias colonias, evitando arrastrar agar con las células y se prepararon suspensiones en agua estéril, de turbidez 5 en la escala de McFarland. Estas suspensiones bacterianas se utilizaron para inocular, 0,5 ml en matraces con 50 ml de medio líquido sin nitrógeno y se mantuvieron en agitación durante 2 semanas, pasado este tiempo se observaron los resultados de crecimiento y se inocularon de nuevo en matraces con el mismo medio de cultivo. La inoculación se realizó con 1 ml del cultivo precedente. Este tipo de inoculación se repitió 3 veces.

#### Resultados

En la figura 2 se muestran resultados representativos del crecimiento microbiano obtenido en el primer cultivo realizado.

En la mayoría de los casos el crecimiento era mínimo, pero sí se podía ver que, aunque levemente, la cantidad de células había aumentado de forma evidente.



Figura 2. Crecimiento, en medio líquido sin nitrógeno, de cepas de *Micromonospora*.

Este resultado parecía consistente con los obtenidos por Trujillo *et al.* en los que se observaba crecimiento de determinadas cepas en medio líquido y semisólido.

No obstante, para eliminar la posibilidad de falsos positivos, se hicieron resiembras tomando 1ml de este medio e inoculándolo en medio fresco con la misma composición. Se repitió este procedimiento un total de 3 veces y se comprobó que a partir de la segunda resiembra el crecimiento se reducía drásticamente y desaparecía en el tercer subcultivo.

Este hecho nos lleva a pensar que se trata de un organismo oligonitrófilo al que una cantidad muy pequeña de nitrógeno le resulta suficiente para permitir su proliferación lo suficiente para apreciar un crecimiento visible en el medio. En este caso, la fuente de nitrógeno podría proceder del medio sólido y también del reciclado de nitrógeno de los componentes de células muertas que se encuentren en el medio, que se diluyen con los subcultivos subsecuentes y por tanto permiten un crecimiento cada vez más limitado.

### **Medida de la reducción de acetileno**

La enzima nitrogenasa tiene una baja especificidad, tanto de sustrato como para la magnitud de la reducción, ya que además de romper el triple enlace del nitrógeno molecular para reducirlo a amonio, puede reducir otras moléculas, entre ellas, el acetileno, que contiene un triple enlace y es reducido por la nitrogenasa a etileno, con sólo dos enlaces.

La cantidad de etileno de una muestra puede medirse con cromatógrafo de gases, por lo que es posible detectar la existencia de nitrogenasa en un organismo por la producción de etileno cuando el organismo es expuesto a una atmósfera con una determinada cantidad de acetileno y se mantiene en un ambiente aislado del exterior. Sin embargo, esta técnica es sólo cualitativa, en ningún caso puede utilizarse como medida cuantitativa de la capacidad fijadora de nitrógeno de ese organismo, ya que no se ha demostrado que la capacidad de reducción de acetileno de la nitrogenasa tenga relación con su capacidad de fijación de nitrógeno en términos cuantitativos.

#### Ensayos en cultivo puro

Se consideró la posibilidad de que no fuese el nitrógeno el factor limitante para el crecimiento del microorganismo. Para excluir esta posibilidad se analizó la capacidad de fijar nitrógeno mediante la técnica del ARA (Acetylene Reduction Assay) (Hardy *et al.*, 1968).

Los ensayos para determinar la capacidad de reducción de acetileno en cultivos de *Micromonospora* se han realizado tanto en cultivos de este microorganismo

en medio líquido como en cultivos en picadura en medio semisólido. En ambos casos se cultivaron las cepas en medio sin nitrógeno (Figura 1) y medio con un suplemento inicial de extracto de levadura para iniciar el crecimiento.

Los cultivos se sellaron y con una jeringa se reemplazó un décimo de la atmósfera del tubo por acetileno y se mantuvo cerrado durante 60 minutos. Se realizaron dos muestreos, uno a los 30 minutos y el segundo a los 60 minutos.

### Resultados

En ninguno de los casos se observó un pico de etileno superior al control negativo, lo que indica falta de la enzima nitrogenasa y en consecuencia no puede haber fijación de nitrógeno. Se descarta la posibilidad de que fuese otro factor del medio y no el nitrógeno el responsable de la ausencia de crecimiento en medio líquido.

### **Ensayos *in planta***

En este experimento se utilizaron plantas de alfalfa que habían sido inoculadas con *Micromonospora*. Las plantas se extrajeron de las macetas al cabo de dos meses de crecimiento y se seleccionaron aquellas en las que se habían formado nódulos atípicos, blancos, con forma similar a los nódulos actinorrícos, como los que se describen en el capítulo de microscopía. A estas plantas se les cortó la parte aérea y se depositó la raíz en un frasco cerrado con un tapón con septo de silicona.

Con una jeringa se reemplazó un décimo de la atmósfera del frasco por acetileno y se mantuvo cerrado durante 60 minutos. Se realizaron dos muestreos, uno a los 30 minutos y el segundo a los 60 minutos. Las muestras de la atmósfera del interior, se tomaron con una jeringa y se inyectó en un cromatógrafo de gases para detectar la presencia de etileno.

### Resultados

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Evolución del etileno producidos en los experimentos de inoculación de alfalfa con *Micromonospora*. Los resultados se expresan en nanomoles de etileno.

	30 min	60 min
ALFb5+SM1021	0,5017	1,1097
ALFb5	0	0
ALFpr18c+SM1021	0,9756	2,6448
ALFpr18c	0	0

Las raíces de plantas coinoculadas con *Sinorhizobium* y las cepas ALFpr18c y ALFb5 de *Micromonospora* reducen acetileno, produciendo etileno que se acumula a lo largo del tiempo. La inoculación con la cepa ALFpr18c parece ser más eficiente en este proceso, la cantidad de etileno acumulada es más del doble que la que se obtiene con la cepa ALFb5. Esto significa que existe nitrogenasa activa en los nódulos de estas raíces. Sin embargo no podemos concluir que la cepa ALFpr18c sea más eficiente potenciando la fijación de nitrógeno, puesto que como ya se ha comentado, estas medidas sólo son cualitativas.

Las raíces de las plantas que habían sido inoculadas sólo con las cepas ALFpr18c y ALFb5 de *Micromonospora* no reducen acetileno puesto que no se ha detectado etileno en la atmósfera de esas raíces, en consecuencia no hay actividad nitrogenasa. Estos resultados son concluyentes y están de acuerdo con los resultados obtenidos con los cultivos puros de estas cepas bacterianas.

## Incorporación de nitrógeno 15

Los métodos basados en la abundancia natural de isótopos estables presentan bastantes dificultades debido a que las diferencias son pequeñas y, por tanto, requieren una alta precisión analítica y además son difíciles de interpretar, debido a la complejidad de los procesos del ciclo biogeoquímico del nitrógeno. Este tipo de análisis se fundamenta en la medida de las razones isotópicas de un elemento en un determinado compuesto. Los diferentes isótopos de dicho elemento son separados en base a sus diferentes masas mediante un campo magnético en un espectrómetro de masas y cuantificados. En este tipo de análisis no se utilizan los valores absolutos sino las diferencias relativas en las razones isotópicas. Para el caso del nitrógeno se usa como referencia la razón isotópica del nitrógeno atmosférico, a la que por convenio se le ha dado el valor de cero por mil en unidades delta "δ" (material y métodos).

En 1997 en la bacteria *Streptomyces thermoautotrophicus* se describió un sistema nitrogenasa que es funcional y estructuralmente diferente a los sistemas encontrados en el resto de organismos (Ribbe, 1997). El requerimiento energético de esta nitrogenasa es menor (entre un 50 y un 75%) que el de las clásicas y además no se inactiva con el oxígeno. Podemos plantearnos la posibilidad de nuevas nitrogenasas que no son similares a las ya descritas y que no puedan detectarse por reducción de acetileno. Una medida directa de la incorporación del nitrógeno a la materia viva supondría una aportación de gran valor para aclarar esta situación.

Las técnicas basadas en la utilización del  $^{15}\text{N}$  como trazador, nos dan una medida directa de la incorporación de este elemento a la biomasa. Han sido utilizadas para estudiar los distintos procesos implicados en el ciclo del

nitrógeno en la biosfera, tanto en ecosistemas naturales como agrarios y sobre todo en estudios de laboratorio y fue la técnica usada en estos estudios.

### **Ensayos en cultivo puro**

Los ensayos para determinar la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en cultivos puros de *Micromonospora* se han realizado en cultivos de este microorganismo en medio líquido. Las cepas ALFpr18c y ALFb5 se cultivaron medio sin nitrógeno, con un suplemento inicial de extracto de levadura para iniciar el crecimiento.

Tras una semana de incubación, los matraces se taparon herméticamente y un décimo de la atmósfera interna fue reemplazado por el isótopo 15 del nitrógeno. Tras incubar durante una semana se recolectaron las células, se lavaron y se utilizaron para analizar la relación isotópica en las células.

### Resultados

Los resultados obtenidos fueron negativos, no hubo incremento, con respecto a los controles, en el nitrógeno 15 incorporado a las células. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos en experimentos anteriores de crecimiento en medio líquido sin nitrógeno y en los de medida indirecta de la actividad nitrogenasa mediante la técnica de reducción de acetileno (ARA).

En nuestras condiciones experimentales, se puede descartar la posibilidad de un proceso de fijación de nitrógeno, en el que la nitrogenasa no pueda detectarse por reducción de acetileno, puesto que una medida directa como la incorporación del nitrógeno a las células del cultivo, también ha dado resultados negativos.

### **Ensayos *in planta***

Este estudio tiene como objetivo dilucidar la capacidad de fijar nitrógeno, en simbiosis con la planta, de las cepas seleccionadas de *Micromonospora* (ALFpr18c y ALFb5).

La estructura del nódulo es esencial para la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas, puesto que ofrece un nicho diseñado para albergar a los microsimbiontes y proteger la nitrogenasa. Puesto que *Micromonospora* no es capaz de inducir nódulos funcionales en las raíces de la alfalfa (capítulo 4) se necesita un microorganismo que sea capaz de desarrollar un nódulo con todas las características del nódulo funcional pero que no fije nitrógeno. Se ha utilizado la cepa de *Sinorhizobium* 1354, con un gen estructural de la

nitrogenasa mutado (*nif A*<sup>-</sup>) y que aunque no fijan nitrógeno, pueden inducir el desarrollo de nódulos normales. De esta forma *Micromonospora* quedaría albergada en una estructura nodular que le permitiría la fijación de nitrógeno si la coinoculamos con la cepa mutante de *S. meliloti* 1354.

### Procedimiento

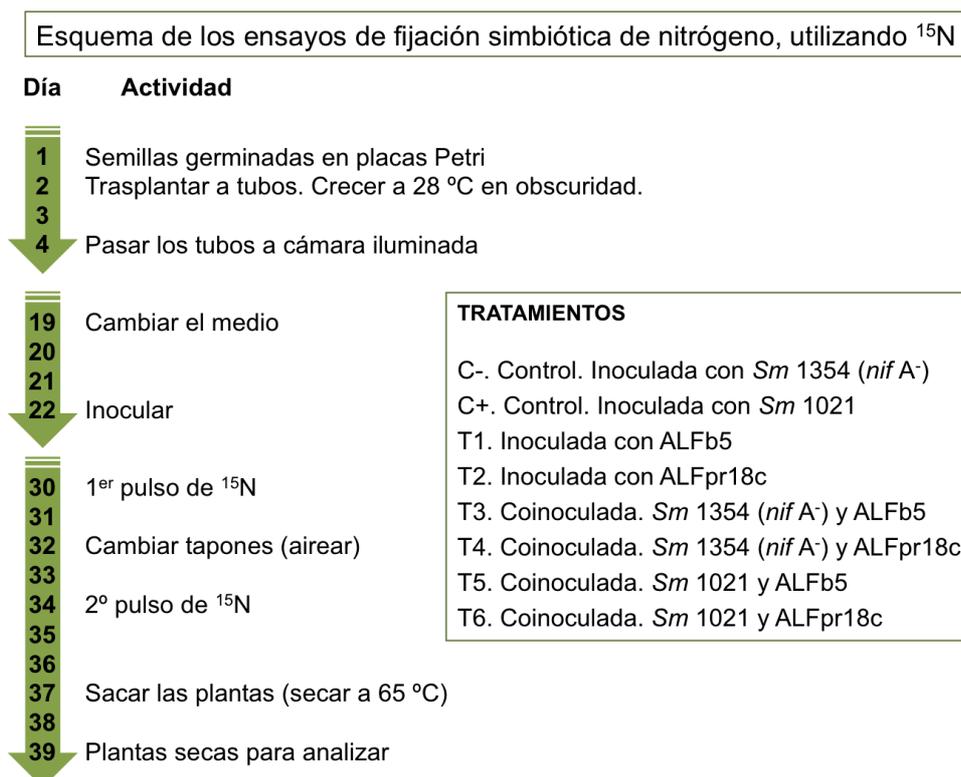


Figura 3. Esquema del protocolo experimental diseñado para determinar el papel de *Micromonospora* en la fijación de nitrógeno en alfalfa.

Este estudio se realizó en condiciones axénicas, en cultivos hidropónicos de plantas de alfalfa en tubos de ensayo de 20 x 200 mm tapados con algodón, para mantener las condiciones axénicas, del mismo modo y usando el mismo medio, que los descritos en el capítulo 1. Estos tapones se sustituyeron por tapones de silicona que impedían el intercambio de gases entre el interior del tubo y el exterior, para mantener la atmósfera enriquecida en <sup>15</sup>N, durante los periodos necesarios.

Los tratamientos, con 12 repeticiones, que se aplicaron a las plantas y el protocolo experimental se describen en el esquema de la figura 3. Las cepas utilizadas en el estudio fueron: *S. meliloti* 1021 (silvestre), *S. meliloti* 1354 (*nif A*<sup>-</sup>) dos cepas de *Micromonospora*, ALFpr18c y ALFb5.

Los tubos con los cultivos hidropónicos, recibieron pulsos de nitrógeno  $^{15}$  como se indica en la figura 3. Al finalizar el experimento se recolectaron las plantas, se secaron en un horno a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas y se molieron en mortero con nitrógeno líquido, para efectuar el estudio de isótopos estables (materiales y métodos).

### Resultados

Los resultados obtenidos en estos estudios se muestran en la figura 4.

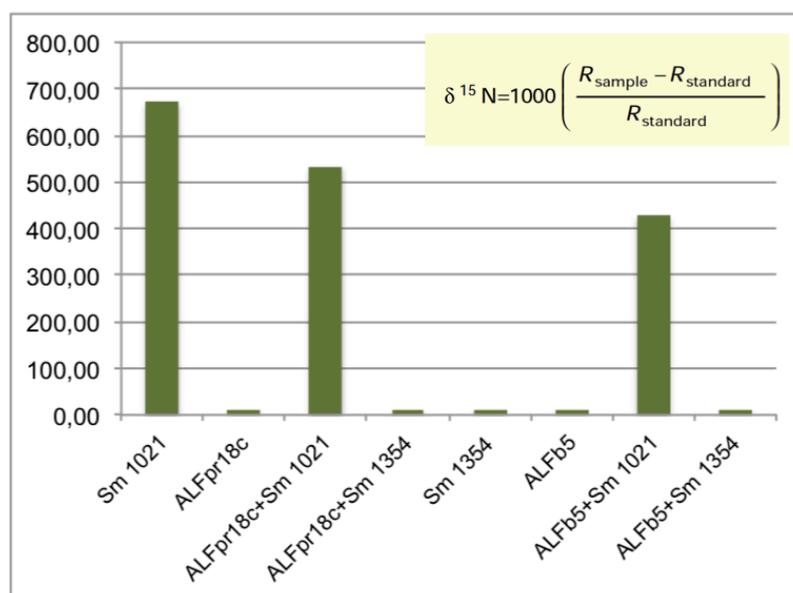


Figura 4. Contenido en  $^{15}\text{N}$ , expresado en unidades "‰", de las plantas de cada tratamiento.

En los tratamientos en los que las plantas fueron inoculadas sólo con *Micromonospora*, los valores de "‰" se mantienen próximos a cero, que es el valor asignado por convenio a la relación isotópica de la atmósfera. Esto nos indica que las dos cepas estudiadas de este microorganismos, no son capaces de fijar nitrógeno para la planta.

Los valores de "‰" en los tratamientos de plantas inoculadas con la cepa mutante *S. meliloti* 1354, son también próximos a cero. Este resultado es el esperado ya que se trata de un mutante *nif A<sup>-</sup>*, que no puede fijar nitrógeno por que tiene mutado un gen estructural de la nitrogenasa.

Lo mismo ocurre con los valores de "‰" en los tratamientos con plantas coinoculadas con *Micromonospora* y la cepa mutante *S. meliloti* 1354 (*nif A<sup>-</sup>*). Estos valores son también próximos a cero lo que significa que no hay incremento en el nitrógeno  $^{15}$  incorporado a la biomasa vegetal que estudiamos y podemos deducir que no hay fijación simbiótica de nitrógeno.

Sin embargo, en los tratamientos inoculados con *S. meliloti* 1021, cepa silvestre que fija nitrógeno normalmente, observamos como el valor medio de " $\delta$ " es 671,24 lo que nos indica que se ha fijado nitrógeno durante todo el ensayo y se ha incorporado a la biomasa el  $^{15}\text{N}$  de la atmósfera enriquecida en dicho isótopo.

También se observa un incremento de los valores de " $\delta$ " en los tratamientos con plantas coinoculadas con *Micromonospora* y la cepa silvestre *S. meliloti*. lo que nos indica que hay un claro incremento en el nitrógeno  $^{15}$  incorporado a la biomasa vegetal y como consecuencia de la fijación simbiótica de nitrógeno.

## Discusión

Pese a que estudios anteriores afirmaban que algunas cepas de *Micromonospora*, aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de plantas, eran capaces de fijar nitrógeno (Trujillo *et al.*, 2010), nuestros estudios reflejan lo contrario.

Al realizar los cultivos de nuestras cepas de *Micromonospora* en medio sin nitrógeno semisólido los resultados no parecían claros, aunque sí se podía apreciar crecimiento en la mayoría de los casos. Sin embargo, no se ha podido demostrar que puedan crecer en medio líquido sin nitrógeno, en nuestras condiciones de ensayo. Nuestros resultados están en oposición a los aportados por (Cerdeja Castillo, 2008).

Los estudios de reducción de acetileno en cultivo puro, también resultaron negativos, no se detectó la presencia de etileno tras la incubación de estos cultivos con un 10% de acetileno en su atmósfera.

Los estudios de incorporación de  $^{15}\text{N}$ , en cultivos de *Micromonospora*, también fueron negativos. No se observó incremento en la proporción de este isótopo del nitrógeno en ninguna de las cepas estudiadas cuando se crecieron en atmósfera enriquecida en este elemento.

Es poco probable que sean necesarias unas características particulares del medio para que estos microorganismos fijen nitrógeno, ya que se han probado tanto medios líquidos como sólidos así como medios con pequeñas cantidades de extracto de levadura para iniciar el crecimiento, sin ningún resultado positivo.

Como conclusión de esta serie de experimentos se puede admitir que las cepas estudiadas de este microorganismo no fijan nitrógeno atmosférico en vida libre bajo nuestras condiciones de ensayo.

Los estudios destinados a poner de manifiesto si es capaz de fijar nitrógeno en interacción con la planta, también dan una respuesta clara respecto a la falta de fijación de nitrógeno, al menos en las condiciones de estudio utilizadas y con las cepas estudiadas.

La técnica de ARA aplicada a las raíces con nódulos atípicos, provocados por la presencia de *Micromonospora*, dio resultados negativos, igual que en cultivo puro.

Los estudios de incorporación de  $^{15}\text{N}$  a las plantas (Figura 4) nos dan una respuesta clara respecto a la ausencia de fijación de nitrógeno, al menos en estas condiciones experimentales y con las cepas estudiadas. Es posible que otras cepas o especies de *Micromonospora* hayan adquirido por transferencia horizontal genes de fijación, pero nuestras cepas, todas aisladas del interior de nódulos de alfalfa no parecen fijar nitrógeno en el interior de estos.

Esto nos indica que *Micromonospora*, aún en nuestras condiciones, en las que se ha desarrollado un nódulo típico para albergarlas con el concurso de *S. meliloti* 1354, no fijan nitrógeno como demuestra el hecho de no incorporar este isótopo en su biomasa. En condiciones de vida libre ya se había comprobado que no fijaban nitrógeno, por lo que queda patente que *Micromonospora* no parece fijar nitrógeno en ningún caso independientemente del hábitat en el que se encuentra.

**Resumen final**



## RESUMEN FINAL

En la segunda mitad del siglo XX, se produce un cambio en la agricultura, que tiene tres pilares básicos, los avances en mejora genética de plantas, la mecanización del campo y la utilización de agroquímicos de síntesis, es la denominada revolución verde. Esta nueva agricultura, se hace cada vez más dependiente de los plaguicidas y abonos químicos, incrementando su uso de forma exponencial y creando graves problemas de contaminación medioambiental, en la atmósfera, suelos y acuíferos y para la salud humana. Se necesita una nueva revolución en la agricultura, que elimine los riesgos para la salud del hombre y los animales, que sea más respetuosa con el medio natural y que mantenga unos niveles de producción adecuados.

Es necesario el estudio y utilización de bacterias beneficiosas, capaces de colonizar las raíces de las plantas mejorando la nutrición, el crecimiento y las respuestas de defensa de las plantas frente a patógenos. La utilización de PGPR puede causar un gran impacto económico y medioambiental, puesto que podrían utilizarse como biofertilizantes, y como agentes de biocontrol para la protección de la planta frente a estrés, tanto biótico como abiótico.

Las interacciones simbióticas mutualistas, de microorganismos con plantas, mejor estudiadas son las Gram negativas y en concreto los microorganismos capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con leguminosas. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que las bacterias Gram positivas, tienen un enorme potencial como PGPRs y su estudio merece mucha más atención de la que se le ha prestado hasta ahora. Dentro de este gran grupo de microorganismos, cepas pertenecientes al género *Micromonospora*, se han aislado de forma constante, en nódulos de plantas sanas, de un amplio número de géneros de plantas y parece que su papel en estos órganos es importante. Sin embargo el descubrimiento de *Micromonospora* como endofito es muy reciente y existen pocas referencias sobre su función en el interior de los nódulos.

El retraso en detectarlos y la escasa información que tenemos, es consecuencia de que sólo se buscaban microorganismos tipo Rhizobia en este tipo de nódulos y se diseñaron medios de aislamiento selectivos con este fin. En el caso de la aparición de colonias con características diferentes a los Rhizobia estas eran tratadas como contaminación.

Estudiar su presencia en los nódulos, su diversidad y su función ha sido el objetivo central de este estudio, puesto que existe muy poca información sobre ellos y su potencial biotecnológico es enorme.

### Biodiversidad de *Micromonospora*

Los estudios genotípicos realizados nos han permitido profundizar en el conocimiento de la diversidad biológica y la distribución taxonómica de estos aislados. Cabe destacar la gran diversidad encontrada, ya que los aislados aparecen distribuidos a lo largo de todo el árbol construido con las secuencias del gen *rrs* y en el que se han incluido casi todas las especies tipo descritas de este género. Se observa también, que un número importante de aislados tienen como especie más próxima *Micromonospora saelicesensis*, especie aislada de nódulos de *Lupinus angustifolius*. Este hecho se visualiza de forma clara en agrupamientos del árbol construido con las secuencias del gen *rrs* en el que el número de cepas que se sitúan próximas a *M. saelicesensis* es mucho más alto que a ninguna otra, aunque esto no implica que pertenezcan a esta especie, ya que en este género es necesario realizar más estudios, especialmente quimiotaxonómicos e hibridación del ADN total para discernir la especie a la que pertenecen.

Los estudios genotípicos de los aislados en diferentes localizaciones geográficas revelan que todas las cepas se distribuían de forma similar en el árbol filogenético del gen *rrs*, sin destacar ninguna rama que contuviera mayoritariamente aislados de una localización concreta. Este hecho es relevante si tenemos en cuenta la enorme distancia y las diferencias climáticas y edáficas entre los lugares de aislamiento, provincia de Salamanca y sudoeste de Western Australia.

La gran similitud entre cepas de ambos continentes nos indica que no hay micromonosporas endémicas australianas. Las características de los suelos de Western Australia son muy diferentes de las españolas unido a la ausencia de *Sinorhizobium*, debería haber dado lugar a que *Micromonospora* de características muy especiales se asociaran a leguminosas. Sin embargo, la proximidad de las cepas australianas y españolas nos lleva a pensar que estas fueron importadas desde Europa inadvertidamente en restos vegetales, suelo o semillas.

Los estudios taxonómicos llevados a cabo con cepas de *Micromonospora* parecen indicar que, como sucede en la mayoría de los casos, la secuenciación del gen ribosómico del 16S no es suficiente para una identificación inequívoca y es necesario completar esta información para discernir a nivel de especie en este género. La secuenciación del *gyrB* podría ser de ayuda si se generaliza y las bases de datos se supervisan correctamente, pero ni siquiera con la secuenciación de ambos genes existen garantías de que la identificación sea correcta. Es necesario describir un listado con varios genes que cumplan unas características parecidas a las del *rrs* para su secuenciación. Este no es un caso único, en otros grupos microbianos también se camina en este sentido pero no hay acuerdo general sobre el número de genes necesarios, la identidad de dichos genes y la extensión mínima de las zonas secuenciadas en cada una de ellos.

Los estudios fenotípicos nos dibujan una situación completamente diferente. Los aislados de Western Australia crecen en un rango de pH más amplio que los aislados españoles, mientras que estos toleran mejor altas concentraciones de sal, pudiendo llegar a crecer hasta a un 5% en algunos casos. Existen otros ejemplos de diferencias entre las cepas australianas y las españolas como la utilización de ciertas fuentes de carbono. Cuando se realiza un análisis numérico de todos los datos obtenidos en los estudios fenotípicos, las cepas se agrupan en función de su origen geográfico. Estos resultados parecen indicar que existe una evolución adaptativa en la que seguramente jueguen un papel relevante los mecanismos de transferencia horizontal de genes entre *Micromonospora* y otros microorganismos endémicos de cada localización.

### *Sinorhizobium*

La diversidad de los de las cepas de *Sinorhizobium* estudiadas ofrece un escenario totalmente distinto. Los resultados de este estudio pone de manifiesto que plantas de alfalfa son noduladas por *Sinorhizobium meliloti*. Además, la diversidad encontrada es muy baja de acuerdo con los resultados de la secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S.

Los resultados del árbol filogenético obtenido con los resultados de las secuencias del gen *rrs* y los obtenidos por la técnica MALDI-TOF MS son muy similares lo que avala la utilidad de esta técnica para la identificación de cepas ambientales como ya ha sido demostrado en estudios realizados en nuestro laboratorio.

La utilidad de esta técnica depende de la base de datos que utilicemos, y esta debe de incluir inexcusablemente, todas las cepas tipo de las especies del grupo con el que se pretenda trabajar y han de ser elaboradas para cada caso concreto. en nuestro laboratorio se ha elaborado una base de datos de todas las especies de la familia *Rhizobiaceae* que nos ha permitido comprobar que todas ellas se pueden diferenciar de acuerdo con sus perfiles de proteínas mediante MALDI-TOF MS. Las cepas tipo de *S. meliloti* y *S. medicae*, los dos endosimbiontes mayoritarios de la alfalfa, muy próximas filogenéticamente de acuerdo a sus genes ribosómicos 16S, se pueden diferenciar claramente utilizando esta metodología. La secuenciación todavía sigue siendo costosa en medios materiales, tiempo y esfuerzo y no es una técnica adecuada para la identificación de un gran número de aislados, resulta evidente que la técnica MALDI-TOF MS, por sus características, es una excelente alternativa para la identificación de estos microorganismos, como se ha demostrado en este estudio.

En el caso de *Micromonospora*, no existen bases de datos adecuadas que contengan todas las especies descritas de este género, por lo que no es una alternativa para la identificación de estas bacterias hasta que se compilen esas bases de datos.

Si comparamos los resultados de biodiversidad de *Sinorhizobium* y *Micromonospora* las diferencias son muy marcadas, en primer caso la diversidad biológica encontrada es muy baja mientras que en el caso de *Micromonospora* podemos encontrar una gran variedad de especies distintas dentro de una misma planta. La complejidad de la interacción, en el caso de *Sinorhizobium*, ha seleccionado las cepas capaces de establecer simbiosis en esas condiciones, que de acuerdo con nuestros resultados, son todas de características genotípicas muy similares.

Sin embargo, las cepas de *S. meliloti* pueden tener características simbióticas muy diferentes como se ha podido apreciar en este estudio en donde tres de las cepas analizadas presentaron diferencias significativas en la efectividad en alfalfa con respecto a una cepa de referencia, la 1021. Estos resultados nos han permitido seleccionar tres buenos candidatos como inoculantes para la alfalfa, aunque serán necesarios estudios posteriores para determinar si esta utilidad potencial se confirma en condiciones de práctica agronómica real y en consecuencia se pueden usar para la formulación de biofertilizantes.

### Interacción con la planta

Uno de los aspectos centrales en este estudio ha sido el análisis de la función de *Micromonospora* en su interacción con las plantas, su actividad en los nódulos y su capacidad para promover el crecimiento vegetal en alfalfa.

Los resultados obtenidos han sido muy positivos en los diferentes tipos de ensayos realizados y se ha podido demostrar que este microorganismo puede ser un excelente candidato para la elaboración de biofertilizantes.

El primer bloque experimental se realizó en cámara climatizada en cultivos hidropónicos y los resultados nos permitieron llegar a una serie de conclusiones provisionales que en estudios posteriores a escala de invernadero fueron confirmados.

El primer hecho destacable es que *Micromonospora* en estas condiciones experimentales, no induce la formación de nódulos pero coloniza los nódulos producidos por *S. meliloti*. Se comprobó reaislando la cepa de *Micromonospora* que se había inoculado, del interior de los nódulos de estas plantas. La identidad del microorganismo aislado se verificó mediante secuenciación del gen *rrs*.

Este resultado hubo de ser matizado tras los experimentos en condiciones de invernadero, en el que se observó que en un porcentaje importante de las plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* aparecían nódulos radiculares, aunque estos nódulos son muy diferentes, por su aspecto macroscópico y su color y forma, de los nódulos típicos inducidos por *S. meliloti*. En este mismo sentido también se han encontrado nódulos de tipo coraloide de gran tamaño pero de color rosado en las plantas coinoculadas con ambos microorganismos. Por tanto *Micromonospora* es capaz de inducir nódulos de características

claramente diferentes a los clásicos y de modificar, en algunos casos, los inducidos por *Sinorhizobium*.

Estos hallazgos son muy interesantes y nunca se habían descrito en la bibliografía, por lo que se decidió realizar un estudio microscópico extenso para analizar su estructura y los posibles cambios ultraestructurales inducidos por *Micromonospora*.

### Microscopía

La primera observación es que, en un porcentaje variable según la cepa estudiada, *Micromonospora* puede inducir nódulos que tienen una forma que recuerda los nódulos actinorrícos que están formados por actinobacterias también. Este es un hecho que se describe por primera vez y que abre nuevas vías para el estudio y aprovechamiento de las interacciones planta microorganismo.

Los nódulos de plantas inoculadas sólo con *Micromonospora* son muy diferentes a los nódulos fijadores de nitrógeno típicos de las asociaciones entre Rhizobia y leguminosas. Son nódulos de gran tamaño blanquecinos o céreos. Los estudios realizados con microscopía óptica y electrónica muestran sus células repletas de gránulos de almidón. En lugar de órganos para la fijación del nitrógeno atmosférico se han convertido en órganos de reserva. En el interior de los nódulos, no se pudo detectar el microorganismo, por tanto, aunque *Micromonospora* es capaz de inducir dichos nódulos no parece capaz de colonizarlos, o al menos en este estudio a pesar de que se han utilizados diferentes tipos de microscopía de gran resolución, no han sido detectados. La ausencia de *Sinorhizobium* puede ser la causa de que *Micromonospora* sea incapaz de entrar en esos nódulos, se debe suponer que no es capaz de realizar el proceso de infección y aprovecha los canales de infección proporcionados por *Sinorhizobium* para entrar al nódulo.

Los nódulos coraloides de gran tamaño, pero procedentes de plantas que han sido coinoculadas con *S. meliloti* y con *Micromonospora* tienen una estructura diferente. El color rosado indica la presencia de leghemoglobina. Se trata de verdaderos nódulos fijadores de nitrógeno, aunque tienen gran similitud con los nódulos inducidos por *Frankia* en no leguminosas.

Además de la morfología macroscópica del nódulo, también se han encontrado diferencias entre la estructura de estos nódulos y los generados por *Sinorhizobium* y en consecuencia debemos atribuir a la presencia de este microorganismo los cambios observados.

Se han observado células infectadas con estructuras peculiares y claramente diferentes de los bacteroides, sólo en los tratamientos de coinoculación, lo que nos lleva a pensar que se trate de un endosimbionte que no es *Sinorhizobium*. Esta observación no es un hecho puntual sino que se repite de forma consistente en los cortes analizados. Además, este tipo de estructura nueva se

repite en las observaciones realizadas con todas las técnicas de microscopía, óptica, TEM y SEM lo que reduce la posibilidad de que se trate de un artefacto.

### Nodulación

La coinoculación de *Micromonospora* con *Sinorhizobium* afecta la nodulación incrementando el número total de nódulos por planta. Podemos introducir el término de *Rhizobia Helper Bacteria* (RHB) para definir esta característica. La técnica que se ha utilizado, cultivo hidropónico en tubo de ensayo, permite observar las raíces sin alterar la planta y cuantificar la evolución de la nodulación en cada una de las plantas. Estos resultados se confirmaron en los ensayos de microcosmos en invernadero, donde todas las plantas coinoculadas con *S. meliloti* y *Micromonospora* desarrollaron un número de nódulos mucho mayor que los controles inoculados sólo con *Rhizobium*.

### PGPR

*Micromonospora* promueve el crecimiento vegetal. En todos los estudios realizados y bajo todas las condiciones experimentales se ha observado que las plantas que estaban inoculadas con esta bacteria, como las coinoculadas presentaban un mayor porte, con la parte aérea más frondosa que las plantas de sus controles respectivos, plantas sin inocular e inoculadas con *S. meliloti*. Estos resultados son de enorme interés en el contexto en el que se realizó este estudio y justifica la presencia, de forma constante, de este microorganismo en los nódulos de alfalfa. Se trata de una interacción mutualista en la que el microorganismo promueve el crecimiento de la planta y la nodulación y a cambio encuentra un nicho que lo protege frente a condiciones ambientales adversas. Debemos recordar que, aunque este microorganismo no crece a pH inferior a 5.5, se ha aislado de plantas crecidas en suelos ácidos tanto en España como, especialmente, en Australia.

Para estudiar en detalle este efecto sobre el crecimiento se han analizado 22 parámetros diferentes y los estudios estadísticos comparativos se han realizado parámetro a parámetro. Este tipo de análisis de los datos nos puede hacer perder la perspectiva del efecto global, sobre el crecimiento de la planta, de las cepas microbianas utilizadas en cada uno de los tratamientos; por este motivo también se han utilizado métodos de análisis multivariante y representación HJ Biplot, que permiten estudiar las observaciones realizadas de todos los parámetros en todos los ensayos a una escala global. Estos análisis estadísticos se realizaron a tres niveles de complejidad diferentes, en cuanto a los parámetros incluidos. El primero agrupa todas las observaciones en todos los parámetros analizados. El segundo sólo incluye los parámetros que habitualmente se estudian para determinar el crecimiento y productividad vegetal, incluyendo el carbono y nitrógeno. El tercer nivel sólo incluye los datos analíticos de contenido en elementos minerales.

El conjunto de estos estudios nos permitió evaluar de forma exhaustiva las cepas utilizadas y seleccionar las más prometedoras para los estudios posteriores, ALFpr18c y ALFb5 que confirmaron su potencial y que nos han servido para avanzar en el diseño de biofertilizantes.

Con las cepas australianas sólo se ha realizado un estudio comparativo en el que se han incluido, el control inoculado sólo con *Sinorhizobium* y como referencia plantas coinoculadas con ALFpr18c. Las cepas australianas son excelentes PGPRs, muchas de estas cepas superan los resultados obtenidos con ALFpr18c, que es uno de los mejores aislados de España. Si también tenemos en cuenta que su tolerancia a salinidad y pH es mayor que el de las cepas aisladas de España, las convierte en candidatos óptimos para el desarrollo de inoculantes.

### Control biológico

Dentro de este estudio, fue un objetivo prioritario detectar mecanismos de protección de la salud de las plantas en *Micromonospora*, por su interés para el control biológico, que es uno de los fines prioritarios de esa nueva revolución que necesita la agricultura actual.

Las actinobacterias en general y *Micromonospora* en particular se caracterizan por su capacidad para producir sustancias con actividad antibiótica. Dentro de este estudio, detectar este tipo de actividad en *Micromonospora*, era una opción evidente, por su interés para el control biológico. Se ha puesto de manifiesto en ensayos *in vitro*, su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Estos resultados son de gran interés pero debe ser completados en estudios de protección de las plantas. Esta capacidad puede estar ligada a la defensa directa de la planta inhibiendo el crecimiento de forma selectiva de hongos fitopatógenos, lo que puede tener un efecto positivo en la productividad vegetal, evitando las pérdidas ligadas a la infección por patógenos, que en algunos casos puede ser muy alta.

Los resultados obtenidos nos hicieron pensar en un posible efecto negativo en procesos biológicos de gran importancia como la formación de micorrizas. Puesto que producen sustancias con actividad antifúngica, cabe pensar que también podían interferir en el desarrollo de los hongos formadores de micorrizas y afectar negativamente este proceso. Los estudios de micorrización en alfalfa nos demostraron que no existe ese efecto y que *Micromonospora* no afecta negativamente al porcentaje de micorrización de las raíces.

A los sideróforos producidos por la planta se les puede asignar la misma función que a los antibióticos, puesto que al secuestrar hierro, los hongos patógenos no pueden utilizarlo y se convierte en un factor limitante para su crecimiento, lo que protege a la planta. También pueden tener una función, bajo determinadas condiciones, en la nutrición de hierro en la planta.

Esta bacteria tiene una versatilidad metabólica muy alta y una gran capacidad de producción de metabolitos secundarios o exoenzimas y es posible que produzca, además de las descritas en la caracterización fenotípica, otro tipo de enzimas líticas que estén implicadas en la inhibición de la germinación de las esporas de hongos patógenos, la lisis de sus paredes celulares o la supresión del crecimiento.

### Inducción de rutas defensivas

La inducción de respuestas defensivas en la planta es un mecanismo indirecto de protección frente a la acción de patógenos de un gran interés. Los estudios realizados con *Micromonospora* para determinar su eficacia en la defensa de plantas de tomate frente a *Botrytis* han dado unos resultados excelentes tanto en ensayos con plantas enteras como en estudios con hojas escindidas. Parece claro que este microorganismo, inoculado en la raíz de la planta, es capaz de disminuir de forma significativa los síntomas que causa el hongo inoculado en las hojas.

Aunque parecía tratarse de un caso de inducción, en la que *Micromonospora* es responsable de la activación de la respuesta de defensa de la planta cuando entra en contacto con ella, descubrimos por análisis de expresión de genes que la bacteria no tiene un efecto directo en la inducción de los mecanismos de defensa de la planta, ni en la respuesta ISR (ruta del jasmónico) ni en la SAR (ruta del salicílico), pero cuando se analiza la expresión de los genes en las hojas de plantas coinoculadas con *Micromonospora* y *Botrytis* vemos que la respuesta es muchísimo mayor en las hojas coinoculadas, lo que indica que estamos ante un caso de "priming", en el que *Micromonospora* por sí sola no induce respuesta, pero cuando aparece un patógeno, provoca un incremento importante en la expresión de los genes de la ruta de defensa del jasmónico, que no sucede cuando no ha habido un tratamiento previo con *Micromonospora*. También es interesante destacar que se produce una inhibición simultánea de la ruta del salicílico, que es la ruta inducida por el patógeno.

Que *Micromonospora* induzca la ruta del jasmónico no es sorprendente, ya que se han encontrado otros endófitos que actúan activando estas rutas y además, la ruta del jasmónico está asociada a la defensa de patógenos necrotrofos, ya que no promueve la muerte celular programada como ocurre con la ruta del salicílico. Esta muerte celular no sólo no detiene a organismos necrotrofos sino que es posible que incluso los ayude.

En efecto, se conoce que la infección con *Botrytis* induce la respuesta asociada al salicílico, ya que es beneficiosa para él, e inhibe la del jasmónico, que se trata de la ruta que realmente inhibe a este patógeno. El hecho de que en nuestros experimentos de coinoculación suceda justamente lo contrario, indica que *Botrytis* no es capaz de alterar esta respuesta debido a la presencia de *Micromonospora*.

El efecto de "priming" que produce la cepa ALFpr18c de *Micromonospora* es muy ventajoso para la planta, puesto que su inoculación, no induce una respuesta defensiva de forma inmediata, lo que supondría un coste innecesario para la planta y un perjuicio inicial, sino que promueve una respuesta mayor en el momento necesario, con el ataque de un patógeno.

El hecho de que no provoque un efecto directo en rutas defensivas de la planta es interesante desde el punto de vista simbiótico, puesto que, incluso frente a bacterias tan beneficiosas y con un proceso de coevolución tan largo como *Rhizobium*, se observa una respuesta inicial, al contrario de lo que parece ocurrir en *Micromonospora*.

La inhibición de la ruta del salicílico podría ser una de las causas que expliquen el incremento significativo del número de nódulos, en las plantas coinoculadas con *Micromonospora* y *Sinorhizobium*, frente a las que sólo son inoculadas con *Sinorhizobium*.

De acuerdo con estos resultados *Micromonospora* es un buen candidato como agente de biocontrol para la protección de los cultivos, frente a hongos fitopatógenos. Tiene la ventaja de que se podría aplicar al mismo tiempo de la siembra, ya que el momento de aplicación no parece tener ningún efecto sobre el "priming" que producen estas bacterias y que su efectividad se mantiene, como mínimo, hasta aún pasado un mes desde su aplicación.

### Fijación de nitrógeno

Algunos resultados de estudios de otros autores parecían indicar que algunas cepas de esta bacteria eran capaces de fijar nitrógeno atmosférico. Se había logrado amplificar un pequeño fragmento del gen *nifH* y parecía que el microorganismo era capaz de crecer en medios libres de nitrógeno, incluso había aportaciones que indicaban que podía fijar nitrógeno en simbiosis con casuarina. La importancia de dilucidar la capacidad de *Micromonospora* para fijar nitrógeno atmosférico era evidente.

En nuestros estudios intentamos aclarar de forma inequívoca si la fijación de nitrógeno tiene lugar y bajo que condiciones.

### En vida libre

El primer estudio consistió en comprobar la capacidad de crecimiento de nuestros aislados en medios sin nitrógeno tanto semisólidos como líquidos. Aunque los resultados en medios con agar parecían apoyar los resultados publicados, cuando se realizaron subcultivos seriados, en medio líquido sin nitrógeno se pudo comprobar que el crecimiento se detiene a partir del segundo paso de cultivo.

Cabe la posibilidad de que en el medio de cultivo existiera otro factor limitante distinto del nitrógeno y que fuera el responsable de la falta de crecimiento. Por tanto se decidió comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre mediante la técnica de reducción de acetileno. Los resultados fueron igualmente negativos. En ninguna de las cepas estudiadas se pudo detectar la presencia de etileno que indicaría actividad nitrogenasa.

Se han descrito nitrogenasas alternativas y es posible que en el futuro se describan otras enzimas para este proceso y se consideró la posibilidad de que no pudieran ser detectadas por el método del ARA, por tanto se decidió comprobar la capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno a la biomasa celular. Los resultados fueron igualmente negativos, no hubo incremento en el contenido en  $^{15}\text{N}$ , cuando los microorganismos se cultivaron en una atmósfera enriquecida en este isótopo de nitrógeno.

En nuestras condiciones experimentales, por tanto, estos microorganismos no pueden fijar nitrógeno en vida libre.

### En simbiosis

Los microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno necesitan las estructuras nodulares, entre otras funciones, como sistemas de protección de la nitrogenasa. En estas condiciones tan especiales el microorganismo, tras diferenciarse en bacteroide, es capaz de fijar nitrógeno.

Nuestros resultados indican que las plantas inoculadas con *Micromonospora* sola o coinoculadas con *S. meliloti* incrementan su contenido en nitrógeno. Podemos plantear la hipótesis de que igual que *Sinorhizobium* necesite la estructura del nódulo para fijar nitrógeno. Para contrastar esta hipótesis se diseñaron experimentos que permitieran demostrar la capacidad de fijación de nitrógeno en plantas inoculadas con *Micromonospora* mediante la técnica de reducción de acetileno y midiendo la incorporación del isótopo 15 del nitrógeno a la biomasa de la alfalfa.

Los resultados fueron también negativos en todos los experimentos planteados independientemente de la técnica de detección de la fijación de nitrógeno que utilizáramos.

Los estudios de incorporación de  $^{15}\text{N}$  a las plantas son concluyentes respecto a la ausencia de fijación de nitrógeno, al menos en estas condiciones experimentales y con las cepas estudiadas. *Micromonospora*, en condiciones en las que se ha desarrollado un nódulo típico para albergarlas, con el concurso de *S. meliloti* 1354, no fija nitrógeno, como demuestra el hecho de no incorporar este isótopo en su biomasa.

Es posible que otras cepas o especies de *Micromonospora* hayan adquirido por transferencia horizontal genes de fijación, pero nuestras cepas, aislados del interior de nódulos de alfalfa no parecen fijar nitrógeno en el interior de estos.



**Conclusiones**



## CONCLUSIONES

1.- *Micromonospora* reúne las características necesarias para ser considerado un endofito y aparece de forma recurrente en los nódulos de alfalfa.

2.- De acuerdo con los estudios de caracterización genotípica, existe una gran diversidad intragenérica entre las cepas aisladas que es independiente del origen geográfico de las muestras.

2.- Las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos en Western Australia son genotípicamente muy similares a las españolas, lo que indica que no existen micromonosporas endofitas endémicas australianas y que fue importada a ese continente desde Europa.

3.- El análisis numérico de las características fenotípicas estudiadas, separa los aislados de *Micromonospora* por su localización geográfica. Los aislados australianos forman un grupo coherente e independiente del resto de las agrupaciones en el fenograma.

4.- La diversidad es casi nula en los *Sinorhizobia* aislados de nódulos de alfalfa. Todos los aislados pertenecen a la especie *S. melitoti* con un 100% de similitud para gen *rrs* en la mayoría de los casos. Por el contrario, la caracterización simbiótica evidencia diferencias claras entre las cepas, algunas de las cuales son, potencialmente, muy prometedoras.

5.- El MALDI-TOF es una técnica sencilla y muy rápida para identificar colecciones amplias de aislados ambientales de bacterias. La calidad de la base de datos construida, es la que confiere fiabilidad a esta técnica.

6- *Micromonospora* por sí sola es capaz de inducir nódulos coraloides en casi la mitad de las plantas inoculadas. Estos nódulos no fijan nitrógeno y son estructuralmente muy distintos de los formados en la interacción con *Sinorhizobium*. En un tercio de las plantas coinoculadas, también aparecen nódulos coraloides similares a los de actinorrizas, que en este caso fijan nitrógeno y tienen una estructura interna similar a los inducidos por *Sinorhizobium*.

7.- *Micromonospora* aumenta de forma significativa el número de nódulos típicos en plantas coinoculadas con *Sinorhizobium*. La ultraestructura nodular cambia en los nódulos que contienen *Micromonospora* y *Sinorhizobium* con respecto a los que sólo contienen *Sinorhizobium*. Aparecen estructuras nuevas que se deben a la presencia de la actinobacteria.

8.- *Micromonospora* por sí sola o coinoculada con *Sinorhizobium*, promueve el crecimiento de la alfalfa. Los diferentes tipos de análisis estadísticos realizados, ponen de manifiesto que mejoran los parámetros esenciales relacionados con el crecimiento y la nutrición vegetal, lo que convierte a *Micromonospora* en un buen candidato como PGPR y nos permitió la selección de las cepas más eficientes.

9.- El potencial como PGPR de las cepas *Micromonospora* seleccionadas se confirma en condiciones de cultivo más próximas a la práctica agrícola habitual y su idoneidad para la fabricación de inoculantes comerciales, incrementa su interés para la explotación biotecnológica de estos aislados.

10.- Las cepas aisladas en Australia tienen un potencial como PGPR igual o mayor que los seleccionados españoles.

11.- El porcentaje de micorrización de la alfalfa se incrementa ligeramente en presencia de *Micromonospora*.

12.- *Micromonospora* produce sideróforos y antifúngicos que inhiben el crecimiento de fitopatógenos en cultivo puro. Las dos características son importantes en la protección de la planta frente a patógenos.

13.- Las cepas seleccionadas de *Micromonospora* tienen un efecto de "priming" cuando son inoculadas en tomate. La respuesta defensiva frente a *Botrytis* es diferente y muy potente, pero sólo se manifiesta en presencia del patógeno. Si no está presente no hay reacción.

14.- Las cepas de *Micromonospora* estudiadas, en cultivo puro o en contacto con la planta, solas o coinoculadas con *Sinorhizobium*, no fijan nitrógeno, en las condiciones en las que se realizaron los ensayos y con las técnicas de análisis utilizadas.

# Bibliografía



## BIBLIOGRAFÍA.

- Akane, M., Yohko, O., Sachiko, H. & Tomio, N. (2006).** An Endophytic Actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, That Accelerates Emergence and Elongation of Plant Adventitious Roots. *Actinomycetologica*.
- Alexander, D. B. & Zuberer, D. A. (1991).** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* **12**, 39–45.
- Alonso Vega, P. (2010, June 30).** *Distribución, caracterización e importancia ecológica de Micromonospora en nódulos fijadores de nitrógeno de Lupinus.*
- Ames, R. N. (1989).** Mycorrhiza development in onion in response to inoculation with chitin decomposing actinomycetes. *New Phytologist* **112**, 423–427.
- Amtmann, A. & Armengaud, P. (2009).** Effects of N, P, K and S on metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 275–283.
- Ara, I. (2006).** Three novel species of the genus *Catellatospora*, *Catellatospora chokoriensis* sp. nov., *Catellatospora coxensis* sp. nov. and *Catellatospora bangladeshensis* sp. nov., and transfer of *Catellatospora citrea* subsp. *methionotrophica* Asano and Kawamoto 1988 to *Catellatospora methionotrophica* sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 393–400.
- Asano, K. & Kawamoto, I. (1986).** *Catellatospora*, a New Genus of the Actinomycetales. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 512–517.
- 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* **39**, 309–313.
- Aulakh, M. S. & Dev, G. (1978).** Interaction effect of calcium and sulphur on the growth and nutrient composition of alfalfa (*Medicago sativa* L. pers.), using <sup>35</sup>S. *Plant Soil* **50**, 125–134.
- Austin, M. B. & Noel, J. P. (2003).** The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**, 79–110.
- Bai, Y., D'Aoust, F., Smith, D. L. & Driscoll, B. T. (2002).** Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Can J Microbiol* **48**, 230–238.
- Bakker, P. A. H. M., Ran, L. X., Pieterse, C. M. J. & van Loon, L. C. (2003).** Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology* **25**, 5–9.
- Baldani, J. I. & Baldani, V. L. D. (2005).** History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **77**, 549–579. Academia Brasileira de Ciências.
- Bangera, M. G. & Thomashow, L. S. (1999).** Identification and Characterization of a Gene Cluster for Synthesis of the Polyketide Antibiotic 2,4-Diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology*.
- Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 343–350.
- Bodman, von, S. B., Bauer, W. D. & Coplin, D. L. (2003).** QUORUM SENSING IN PLANT-PATHOGENIC BACTERIA. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 455–482. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.

- Bohlool, B. B., Ladha, J. K., Garrity, D. P. & George, T. (1992).** Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil* **141**, 1–11.
- Bolaños, L., Esteban, E., de Lorenzo, C., Fernández Pascual, M., de Felipe, M. R., Garate, A. & Bonilla, I. (1994).** Essentiality of Boron for Symbiotic Dinitrogen Fixation in Pea (*Pisum sativum*) Rhizobium Nodules. *Plant Physiol.*
- Bouzigarne, B., Lanoot, B., Loqman, S., Spröer, 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.
- Boutton, T. W., Arshad, M. A. & Tieszen, L. L. (1983).** Stable isotope analysis of termite food habits in East African grasslands. *Oecologia* **59**, 1–6.
- Brunel, B., Rome, S., Ziani, R. & Cleyet-Marel, J. C. (2006).** Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual Medicago species. *FEMS Microbiol Ecol* **19**, 71–82.
- Bustin, S. A. S., Benes, V. V., Nolan, T. T. & Pfaffl, M. W. M. (2005).** Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol* **34**, 597–601.
- Camp, den, R. O., Streng, A., De Mita, S. & Cao, Q. (2011).** LysM-type mycorrhizal receptor recruited for rhizobium symbiosis in nonlegume *Parasponia*. *Science*
- Carpena, R. O., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., de Felipe, M. R. & Zornoza, P. (2003).** Cadmium-stress in white lupin: effects on nodule structure and functioning. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 911–919.
- Carro García, L. (2009, November 8).** *Avances en la sistemática del género Micromonospora, estudio de cepas aisladas de la rizosfera y nódulos de Pisum sativum.*
- Carro, L., Rivas, R., Leon-Barrios, M., Gonzalez-Tirante, M., Velazquez, E. & Valverde, A. (2011).** *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., three new species isolated in Tenerife (Canary Islands). *Int J Syst Evol Microbiol.*
- Carro, L., Pukall, R., Spröer, C., Kroppenstedt, R. M. & Trujillo, M. E. (2012).** *Micromonospora cremea* sp. nov. and *Micromonospora zamorensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Pisum sativum*. *Int J Syst Evol Microbiol.*
- Cerda Castillo, M. E. (2008, November 11).** *Aislamiento de Micromonospora de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal.*
- Chabot, S., Bécard, G. & Piché, Y. (1992).** Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. *Mycologia.*
- Chen, W. M. W., Laevens, S. S., Lee, T. M. T., Coenye, T. T., De Vos, P. P., Mergeay, M. M. & Vandamme, P. P. (2001).** *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1729–1735.
- Chen, W.-M. W., de Faria, S. M. S., James, E. K. E., Elliott, G. N. G., Lin, K.-Y. K., Chou, J.-H. J., Sheu, S.-Y. S., Cnockaert, M. M., Sprent, J. I. J. & Vandamme, P. P. (2007).** *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 1055–1059.
- Chen, W.-M., de Faria, S. M., Chou, J.-H., James, E. K., Elliott, G. N., Sprent, J. I., Bontemps, C., Young, J. P. W. & Vandamme, P. (2008).** *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpinifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 2174–2179.
- Choi, H.-K., Mun, J.-H., Kim, D.-J., Zhu, H., Baek, J.-M., Mudge, J., Roe, B., Ellis, N.,**

- Doyle, J., & other authors. (2004).** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15289–15294.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka, E. A. (2005a).** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4951–4959.
- Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C. & Ait Barka, E. (2005b).** Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1685–1693.
- Conn, V. M., Walker, A. R. & Franco, C. M. M. (2008).** Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 208–218.
- Conn, V. M. & Franco, C. M. M. (2004).** Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1787–1794.
- Conrath, U. U., Beckers, G. J. M. G., Flors, V. V., García-Agustín, P. P., Jakab, G. G., Mauch, F. F., Newman, M.-A. M., Pieterse, C. M. J. C., Poinssot, B. B., & other authors. (2006).** Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1062–1071.
- Cordier, C., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil* **185**, 223–232.
- de Bruijn, F. J. (2011).** *Handbook of Molecular Microbial Ecology I*. Wiley-Blackwell.
- de María, N., de Felipe, M. R. & Fernández-Pascual, M. (2005).** Alterations induced by glyphosate on lupin photosynthetic apparatus and nodule ultrastructure and some oxygen diffusion related proteins. *Plant Physiol Biochem* **43**, 985–996.
- de Menezes, A. B., Lockhart, R. J., Cox, M. J., Allison, H. E. & McCarthy, A. J. (2008).** Cellulose Degradation by Micromonosporas Recovered from Freshwater Lakes and Classification of These Actinomycetes by DNA Gyrase B Gene Sequencing. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7080–7084.
- De Meyer, G. & Höfte, M. (1997).** Salicylic Acid Produced by the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis cinerea* on Bean. *Phytopathology* **87**, 588–593.
- De Meyer, G., Audenaert, K. & Höfte, M. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced Systemic Resistance in Tobacco Depends on in planta Salicylic Acid Accumulation but is not Associated with PR1a Expression. *Eur J Plant Pathol* **105**, 513–517.
- Deakin, W. J. & Broughton, W. J. (2009).** Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Micro* **7**, 312–320.
- Deng, Z. S., Zhao, L. F., Kong, Z. Y., Yang, W. Q., Lindström, K., Wang, E. T. & Wei, G. H. (2011).** Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiol Ecol* **76**, 463–475.
- Diouf, D., Samba-Mbaye, R., Lesueur, D., Ba, A. T., Dreyfus, B., Lajudie, P. & Neyra, M. (2007).** Genetic Diversity of *Acacia seyal* Del. Rhizobial Populations Indigenous to Senegalese Soils in Relation to Salinity and pH of the Sampling Sites. *Microb Ecol* **54**, 553–566.
- El-Tarabily, K. A., Nassar, A. H., Hardy, G. E. S. J. & Sivasithamparam, K. (2009).** Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 13–26.

- El-Tarabily, K. A. (2003).** An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root rot of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. *Aust J Bot* **51**, 257.
- El-Tarabily, K. A. & Sivasithamparam, K. (2006).** Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 1505–1520.
- Ellis, C. & Turner, J. G. (2001).** The Arabidopsis Mutant *cev1* Has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signal Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens. *Plant Cell* **13**, 1025–1033.
- Elvira-Recuenco, M. & van Vuurde, J. W. L. (2000).** Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Ezra, D., Castillo, U. F., Strobel, G. A., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Condrón, M. A. M., Teplow, D. B., Sears, J., & other authors. (2004).** Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. *Microbiology* **150**, 785–793.
- Fedorova, E., Redondo, F. J., Koshiba, T., Pueyo, J. J., de Felipe, M. R. & Lucas, M. M. (2005).** Aldehyde oxidase (AO) in the root nodules of *Lupinus albus* and *Medicago truncatula*: identification of AO in meristematic and infection zones. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 405–413.
- Ferreira, L., Sánchez-Juanes, F., García-Fraile, P., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., González-Buitrago, J. M. & Velázquez, E. (2011).** MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. *PLoS ONE* **6**, e20223.
- Ferrie, B. J., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowsher, C. G. & Rothstein, S. J. (1994).** The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiol* **106**, 109–118.
- Finlay, R. D. (2008).** Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1115–1126.
- Fitter, A. H. & Garbaye, J. (1994).** Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant Soil*.
- Flores Félix, J. D. (2011, March 3).** *Identificación de bacterias aisladas de nódulos de Phaseolus vulgaris y análisis de su capacidad promotora del crecimiento en plantas de Lactuca sativa.*
- Francis, I. & Holsters, M. (2010).** The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental ....*
- Franco Correa, M., Quintana, A., Duque, C., Suarez, C., Rodríguez, M. X. & Barea, J.-M. (2010).** Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology* **45**, 209–217.
- Frank, B. (1889).** Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges* **7**, 332–346.
- Frankowski, J. J., Lorito, M. M., Scala, F. F., Schmid, R. R., Berg, G. G. & Bahl, H. H. (2001).** Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Arch Microbiol* **176**, 421–426.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007).** The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* **176**, 22–36.
- Fry, B., Saupe, S., Hullar, M. & Peterson, B. J. (1993).** Platinum-catalyzed combustion of DOC in sealed tubes for stable isotopic analysis. *Marine Chemistry* **41**, 187–193.

- Gabriel, K. R. (1971).** The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika* **58**, 453–467.
- Gadelhak, G. G. & El-Tarabily, K. A. (2005).** Insect control using chitinolytic soil Actinomycetes as biocontrol agents. *International Journal of ...*
- Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., & other authors. (2001).** The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668–672.
- Galindo Villardon, M. P. (2011).** *Una alternativa de representación simultánea: HJ-Biplot. Qüestiió 1986.* Qüestiió.
- Gamborg, O. L. & Eveleigh, D. E. (1968).** Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Biochem Cell Biol* **46**, 417–421.
- Garcia, 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.
- García-Fraile, P., Velázquez, E., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Rivas, R. (2008).** *Cohnella phaseoli* sp. nov., isolated from root nodules of *Phaseolus coccineus* in Spain, and emended description of the genus *Cohnella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1855–1859.
- Gauthier, D., Diem, H. G. & Dommergues, Y. (1981).** In Vitro Nitrogen Fixation by Two Actinomycete Strains Isolated from *Casuarina* Nodules. *Applied and environmental*
- Geo H. Clark, M. Oscar Malte. (1913).** Fodder and pasture plants. *Canada department of Agriculture.*
- George, E., Marschner, H. & Jakobsen, I. (1995).** Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Uptake of Phosphorus and Nitrogen From Soil. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**, 257–270. Informa UK Ltd UK.
- Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980).** AN EVALUATION OF TECHNIQUES FOR MEASURING VESICULAR ARBUSCULAR MYCORRHIZAL INFECTION IN ROOTS. *New Phytologist* **84**, 489–500.
- Glazebrook, J. (2005).** Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**, 205–227.
- Govrin, E. M. E. & Levine, A. A. (2000).** The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol* **10**, 751–757.
- Gr fe, U., Dornberger, K., Fleck, W. F., Bormann, E. J. & Ihn, W. (1988).** Bioconversion of aclacinomycin A to Y and B by an intracellular enzyme of *Streptomyces* spec. AM 33352. *Biotechnol Lett* **10**, 167–170.
- Gruber, N. & Galloway, J. N. (2008).** An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**, 293–296.
- Gupta, R., Saxena, R. K., Chaturvedi, P. & Viridi, J. S. (1995).** Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *J Appl Bacteriol* **78**, 378–383.
- Haas, D. D., Keel, C. C. & Reimann, C. C. (2002).** Signal transduction in plant-beneficial rhizobacteria with biocontrol properties. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 385–395.
- Hardy, R. W. F., Holsten, R. D., Jackson, E. K. & Burns, R. C. (1968).** The Acetylene-Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. *Plant Physiol.*
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T. & Kunoh, H. (2006).** Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetologica* **20**, 72–81. J-STAGE.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Toyoda, K., Nishimura, T. & Kunoh, H. (2005).** Drought

- Tolerance of Tissue-cultured Seedlings of Mountain Laurel (*Kalmia latifolia* L.) Induced by an Endophytic Actinomycete II. Acceleration of Callose Accumulation and Lignification. *Actinomycetologica* **19**, 13–17.
- Hayakawa, M., Sadakata, T. & Kajiura, T. (1991).** New methods for the highly selective isolation of Micromonospora and Microbispora from soil. *Journal of fermentation* ....
- Hänsch, R. & Mendel, R. R. (2009).** Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 259–266.
- Hewitt, E. J. (1966).** Sand and Water Culture Methods Used in the Study of Plant Nutrition. *Commonwealth Agricultural Bureaux* **3**, 104–104. Cambridge University Press.
- Hillel, D., Hatfield, J. L., Powelson, D. S. & Rosenzweig, C. (2004).** *Encyclopedia of Soils in the Environment*.
- Hirsch, A. M. & ValdEs, M. (2010).** Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biology and Biochemistry* **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.
- Hoque, M. S., Broadhurst, L. M. & Thrall, P. H. (2011).** Genetic characterization of root-nodule bacteria associated with *Acacia salicina* and *A. stenophylla* (Mimosaceae) across south-eastern Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 299–309.
- Horan, A. C. & Brodsky, B. C. (1986).** *Micromonospora rosaria* sp. nov., nom. rev., the Rosaramicin Producer. *Int J Syst Bacteriol* **36**, 478–480.
- 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., Martínez-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.
- Jensen, W. A. (1963).** *Botanical histochemistry. Principles and practice, etc.* Freeman WH and Co.
- Joseph, B. & Priya, R. M. (2011).** Bioactive compounds from endophytes and their potential in pharmaceutical effect a review. ... *Journal of biochemistry and Molecular biology*.
- Jourand, P. P., Giraud, E. E., Béna, G. G., Sy, A. A., Willems, A. A., Gillis, M. M., Dreyfus, B. B. & de Lajudie, P. P. (2004).** *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2269–2273.
- Judd, W. S., Campbell, C. S. Kellogg, E. A. Stevens, P.F. Donoghue, M. J. (2002).** Plant systematics: a phylogenetic approach, Sinauer Axxoc, 287-292. ISBN 0-87893-403-0.
- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I. & Chernin, L. (2003).** Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 323–331.
- Kawamoto, I., Okachi, R., Kato, H., Yamamoto, S. & Takahashi, I. (1974).** The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **27**, 492–501.
- Kawamoto, I., Yamamoto, M. & Nara, T. (1983).** *Micromonospora olivasterospora* sp. nov.

- Int J Syst Evol Microbiol* **33**, 107–112. Soc General Microbiol.
- Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J. F. & Lumyong, S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. *EurAsia J Biosci.*
- Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H., & other authors. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 716–721.
- Kimura, M. (1980).** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16**, 111–120.
- Kirby, B. M. & Meyers, P. R. (2010).** *Micromonospora tulbaghia* sp. nov., isolated from the leaves of wild garlic, *Tulbaghia violacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 1328–1333.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 12. Elsevier.
- Lee, J., Postmaster, A., Soon, H. P., Keast, D. & Carson, K. C. (2012).** Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. *Biometals* **25**, 285–296.
- Lee, K., Bai, Y., Smith, D., Han, H. & Supanjani. (2005).** Isolation of Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacteria from Bean Nodules. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **1**, 232–236.
- Lehr, N.-A., Schrey, S. D., Hampp, R. & Tarkka, M. T. (2008).** Root inoculation with a forest soil streptomycete leads to locally and systemically increased resistance against phytopathogens in Norway spruce. *New Phytol* **177**, 965–976.
- Lei, X., Wang, E. T., Chen, W. F., Sui, X. H. & Chen, W. X. (2008).** Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch Microbiol* **190**, 657–671.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. (2005).** Legumes of the world.
- Li, L., Sinkko, H., Montonen, L., Wei, G., Lindström, K. & Räsänen, L. A. (2011).** Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol Ecol* **79**, 46–68.
- Lin, D. X. D., Wang, E. T. E., Tang, H. H., Han, T. X. T., He, Y. R. Y., Guan, S. H. S. & Chen, W. X. W. (2008).** *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1409–1413.
- Liu, X. Y., Wang, E. T., Li, Y. & Chen, W. X. (2007).** Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. *Arch Microbiol* **188**, 1–14.
- Lluch, C., Iribarne, C., Palma, F., Lopez, M. & Tejera, N. (2011).** *Integración de las hormonas vegetales en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium leguminosa* (M. Guijo, R. R. Palma, M. J. Soto, M. J. D. Igueño, E. G. García, P. F. Mateos, M. León-Barrios, B. R. González & E. J. Bedmar, Eds.). SEFIN. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- Lorenzo, C. A., Fernández Pascual, M. & Felipe, M. R. (1998).** Subcellular localization of glycoprotein epitopes during the development of lupin root nodules. *Protoplasma* **201**,

71–84.

- López-Ráez, J. A., Verhage, A., Fernández, I., García, J. M., Azcón-Aguilar, C., Flors, V. & Pozo, M. J. (2010).** Hormonal and transcriptional profiles highlight common and differential host responses to arbuscular mycorrhizal fungi and the regulation of the oxylipin pathway. *Journal of Experimental Botany* **61**, 2589–2601.
- Luedemann, G. M. (1971a).** Designation of Neotype Strains for *Micromonospora coerulea* Jensen 1932 and *Micromonospora chalcea* (Foulerton 1905) Ørskov 1923. *International Journal of Systematic ...*
- Luedemann, G. M. (1971b).** *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) comb. nov. (Subjective Synonym: *Micromonospora fusca* Jensen 1932). *Int J Syst Bacteriol* **21**, 240–247.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. (1964).** Taxonomy of gentamicin-producing *Micromonospora*. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C. (1965).** Name: *Micromonospora carbonacea*. *Antimicrob Agents Chemother.*
- Luedemann, G. M. & Casmer, C. J. (1973).** Electron Microscope Study of Whole Mounts and Thin Sections of *Micromonospora chalcea* ATCC 12452. *Int J Syst Bacteriol* **23**, 243–255.
- Marschner, H. (1995).** *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press.
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M. & Willems, A. (2007).** Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 489–503.
- Martinez, A., Obertello, M., Pardo, A., Ocampo, J. A. & Godeas, A. (2004).** Interactions between *Trichoderma pseudokoningii* strains and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* **14**, 79–84.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. (2009).** Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol* **17**, 458–466.
- McDowell, J. (2000).** Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 79–82.
- McFarland, J. (1907).** THE NEPHELOMETER: AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *Journal of the American Medical Association*.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001).** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. **411**, 3.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., & other authors. (2008).** Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol Ecol* **63**, 383–400.
- Oirdi, El, M. M., Rahman, El, T. A. T., Rigano, L. L., Hadrami, El, A. A., Rodriguez, M. C. M., Daayf, F. F., Vojnov, A. A. & Bouarab, K. K. (2011).** *Botrytis cinerea* manipulates the antagonistic effects between immune pathways to promote disease development in tomato. *Plant Cell* **23**, 2405–2421.
- Okon, Y. & Itzigsohn, R. (1995).** The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances* **13**, 415–424.
- Parke, J. L., Linderman, R. G. & Black, C. H. (1983).** The Role of Ectomycorrhizas in Drought Tolerance of Douglas-Fir Seedlings. *New Phytologist*.
- Pedrosa, F. (2001).** Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Biotechnology* **91**,

- 189–195.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Pérez-Galdona, R., Velázquez, E. & León-Barrios, M. (2011).** Nuevos enfoques metodológicos aplicados al análisis de la biodiversidad e identificación de especies de rizobacterias. In *Integración de las hormonas vegetales en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium leguminosa*. Edited by M. M. Guijo, R. R. Palma, M. J. Soto, M. J. D. Igueño, E. G. García, P. F. Mateos, M. León-Barrios, B. R. González & E. J. Bedmar. SEFIN. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- Pettersson, M. & Bååth, E. (2004).** Effects of the properties of the bacterial community on pH adaptation during recolonisation of a humus soil. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1383–1388.
- Phillips, J. M. & Hayman, D. S. (1970).** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**, 158–161. Rothamsted.
- Pieterse, C. M. C., van Wees, S. C. S., van Pelt, J. A. J., Knoester, M. M., Laan, R. R., Gerrits, H. H., Weisbeek, P. J. P. & van Loon, L. C. L. (1998).** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1571–1580.
- Pijnenborg, J. W. M., Lie, T. A. & Zehnder, A. J. B. (1991).** Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: effects of inoculum size and lime-pelleting.
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M. & Schiavon, M. (2009).** Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 267–274.
- Pozo, M. A. J., Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2005).** Jasmonates - Signals in Plant-Microbe Interactions. *J Plant Growth Regul* **23**, 211–222.
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J.-H., Xu, L.-H. & Li, W.-J. (2010).** Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria **89**, 17.
- Quecine, M. C., Araujo, W. L., Marcon, J., Gai, C. S., Azevedo, J. L. & Pizzirani-Kleiner, A. A. (2008).** Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* **47**, 486–491.
- Reinhold-Hurek, B. & Hurek, T. (1998).** Interactions of Gramineous Plants with *Azoarcus* spp. and Other Diazotrophs: Identification, Localization, and Perspectives to Study their Function. *Critical Reviews in Plant Sciences* **17**, 29–54.
- Reynolds, E. S. (1963).** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208–212.
- Ribbe, M. (1997).** N<sub>2</sub> Fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* Involves a Molybdenum-Dinitrogenase and a Manganese-Superoxide Oxidoreductase That Couple N<sub>2</sub> Reduction to the Oxidation of Superoxide Produced from O<sub>2</sub> by a Molybdenum-CO Dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 26627–26633.
- Rigaud, J. & Puppo, A. (1975).** Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *Journal of General Microbiology* **88**, 223–228.
- Rivas, R., Vizcaíno, N., Buey, R. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. (2001).** An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. *J Microbiol Methods* **47**, 59–63.
- Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N. S., Mateos, P. F., Gillis, M., Dazzo, F. B. & Martínez-Molina, E. (2002).** A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5217–5222.
- Robledo, M., Jimenéz-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Pineiro, J. L.,**

- Ramírez-Bahena, M. H., Ramos, B., Díaz-Mínguez, J. M., Dazzo, F., & other authors. (2008).** Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7064–7069.
- Rodríguez Martínez, R. (2008, October 10).** *Análisis de la población bacteriana endofita presente en nódulos de Lupinus: Interacción y localización in situ.*
- Ruiz-Lozano, J. M. (2003).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis and alleviation of osmotic stress. New perspectives for molecular studies. *Mycorrhiza* **13**, 309–317.
- Sahu, M. K., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. & Kannan, L. (2007).** Phosphate solubilizing actinomycetes in the estuarine environment: an inventory. *J Environ Biol* **28**, 795–798.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
- Sampedro, I., Aranda, E., Scervino, J. M., Fracchia, S., García-Romera, I., Ocampo, J. A. & Godeas, A. (2003).** Improvement by soil yeasts of arbuscular mycorrhizal symbiosis of soybean (*Glycine max*) colonized by *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **14**, 229–234.
- Schrey, S. D. & Tarkka, M. T. (2008).** Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**, 11–19.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**, 1413–1421.
- Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987).** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47–56.
- Seewald, J. S., Seyfried, W. E., Jr. & Shanks, W. C., III. (1994).** Variations in the chemical and stable isotope composition of carbon and sulfur species during organic-rich sediment alteration: An experimental and theoretical study of hydrothermal activity at guaymas basin, gulf of california. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **58**, 5065–5082.
- Shimizu, M. (2011).** *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses* (D. K. Maheshwari, Ed.). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Silva, C., Kan, F. L. & Martínez-Romero, E. (2007).** Population genetic structure of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* isolated from nodules of *Medicago* spp. in Mexico. *FEMS Microbiol Ecol* **60**, 477–489.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (2008).** *Mycorrhizal Symbiosis.*
- Sneath, P. H. A. & Sokal, R. R. (1973).** *Numerical Taxonomy (by) Peter H.A. Sneath (and) Robert R. Sokal.*
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Morgan, D. R., Swensen, S. M., Mullin, B. C., Dowd, J. M. & Martin, P. G. (1995).** Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms.
- Soto, M. J., Sanjuán, J. & Olivares, J. (2006).** Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology (Reading, Engl)* **152**, 3167–3174.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H. J. (2008).** *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.*
- Sprent, J. I. (2007).** Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* **174**, 11–25.
- Sprent, J. I. & Parsons, R. (2000).** Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research* **65**, 183–196.

- Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B., Willems, A. & Deliđ, D. (2009).** Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Botanica serbica* **33**, 107–114.
- Staley, J. T., Brenner, D. J. & Krieg, N. R. (2005).** *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The proteobacteria.*
- Sturz, A., Christie, B., Matheson, B. & Nowak, J. (1997).** Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol Fertil Soils* **25**, 13–19. Springer.
- Sveshnikova, M. A., Maksimova, T. S. & Kudrina, E. S. (1969).** The species of the *Micromonospora* Orskov, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya*. 38: 883-893.
- Talebi, M. B., Bahar, M., Saeidi, G., Mengoni, A. & Bazzicalupo, M. (2008).** Diversity of *Sinorhizobium* strains nodulating *Medicago sativa* from different Iranian regions. *FEMS Microbiol Lett* **288**, 40–46.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007).** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1596–1599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011).** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 2731–2739.
- Tan, H. M., Cao, L. X., He, Z. F., Su, G. J., Lin, B. & Zhou, S. N. (2006).** Isolation of Endophytic Actinomycetes from Different Cultivars of Tomato and their Activities Against *Ralstonia solanacearum* in Vitro. *World J Microbiol Biotechnol* **22**, 1275–1280.
- Tanasupawat, S., Jongrungruangchok, S. & Kudo, T. (2010).** *Micromonospora marina* sp. nov., isolated from sea sand. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 5. Soc General Microbiol.
- Temperton, V. M., Grayston, S. J., Jackson, G., Barton, C. V. M., Millard, P. & Jarvis, P. G. (2003).** Effects of elevated carbon dioxide concentration on growth and nitrogen fixation in *Alnus glutinosa* in a long-term field experiment. *Tree Physiology* **23**, 1051–1059.
- Terpolilli, J. J., O'Hara, G. W., Tiwari, R. P., Dilworth, M. J. & Howieson, J. G. (2008).** The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N<sub>2</sub> fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytologist* **179**, 5. Wiley Online Library.
- Thawai, C. C., Tanasupawat, S. S. & Kudo, T. T. (2008).** *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 1516–1521.
- Thawai, C. C., Tanasupawat, S. S., Suwanborirux, K. K., Itoh, T. T. & Kudo, T. T. (2007).** *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soils. *J Gen Appl Microbiol* **53**, 287–293.
- 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. (2005a).** *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.-I. & Kudo, T. (2005b).** *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from a Thai peat swamp forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 6.
- Thompson, J. (1997).** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876–

4882.

- Tirichine, L., James, E. K., Sandal, N. & Stougaard, J. (2006).** Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 373–382.
- Tisserant, B., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. *Can J Bot* **74**, 1947–1955. NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Tomita, K., Hoshino, Y., Ohkusa, N., Tsuno, T. & Miyaki, T. (1992).** *Micromonospora chersina* sp. nov. *Actinomycetologica* **6**, 21–28.
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Carro García, L., Martínez-Hidalgo, P. & Martínez-Molina, E. (2011).** Actinobacterias endofitas de raíces y nódulos fijadores de nitrógeno: Papel ecológico y potencial biotecnológico. In *Integración de las hormonas vegetales en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium leguminosa*. Edited by M. M. Guijo, R. R. Palma, M. J. Soto, M. J. D. Igueño, E. G. García, P. F. Mateos, M. León-Barrios, B. R. González & E. J. Bedmar. SEFIN. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno.
- Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P. & Martínez-Molina, E. (2010).** The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* **4**, 1265–1281.
- Trujillo, M. E., Fernández-Molinero, C., Velázquez, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Mateos, P. F. & Martínez-Molina, E. (2005a).** *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 877–880.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P. & Martínez-Molina, E. (2007).** *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. & Martínez-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., Ludeña, D., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. (2005b).** Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1318–1327.
- ValdEs, M., Pérez, N.-O., Santos, P. E.-D. L., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J. J., Normand, P. & Hirsch, A. M. (2005).** Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen.
- Vallad, G. E. & Goodman, R. M. (2004).** Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture  
. *Crop Science*.
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Igual, J. M. & Willems, A. (2005).** *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1985–1989.
- Valverde, C. & Wall, L. G. (1999).** Time course of nodule development in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae)–*Frankia* symbiosis. *New Phytologist* **141**, 345–354. Wiley Online Library.
- van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A. & Eardly, B. D. (1998).** *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 1**, 13–22.

- van Berkum, P. P. & Eardly, B. D. B. (2002). The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 1132–1136.
- van Hulst, M. (2006). Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5602–5607.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W.-M., De Vos, P. & Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. *Syst Appl Microbiol* **25**, 507–512.
- Verma, V. C., Singh, S. K. & Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. *J Basic Microbiol* **51**, 550–556.
- Versalovic, J., Koeth, T. & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **19**, 6823–6831.
- Vessey, J. K. (2003). Plant and Soil, Volume 255, Number 2 - SpringerLink. *Plant Soil* **255**, 571–586.
- Villardón, M. P. G. & Cuadras, C. M. (1986). *Una extensión del método Biplot y su relación con otras técnicas*. Universidad de Barcelona.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule* .... IBP Handbk 15 Oxford and Edinburgh: Blackwell Scientific Publications.
- Wagner, S. C. (2011). Biological Nitrogen Fixation. *Nature Education Knowledge* **2**.
- Wall, L. G. (2000). The actinorhizal symbiosis. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 16. Springer.
- Walters, D. & Heil, M. (2007). Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **71**, 3–17.
- Wang, C., Xu, X.-X., Qu, Z., Wang, H.-L., Lin, H.-P., Xie, Q.-Y., Ruan, J.-S. & Hong, K. (2011). *Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 320–324.
- Watanabe, T., Broadley, M. R., Jansen, S., White, P. J., Takada, J., Satake, K., Takamatsu, T., Tuah, S. J. & Osaki, M. (2006). Evolutionary control of leaf element composition in plants. *New Phytol* **174**, 516–523.
- Weinstein, M. J., Luedemann, G. M., Oden, E. M. & Wagman, G. H. (1966). Halomicin, a new *Micromonospora*-produced antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother* **7**, 435–441.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M., Sneath, P. H. & Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology* **129**, 1743–1813.
- Zakhia, F., Jeder, H., Willems, A., Gillis, M., Dreyfus, B. & Lajudie, P. (2006). Diverse Bacteria Associated with Root Nodules of Spontaneous Legumes in Tunisia and First Report for nifH-like Gene within the Genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microb Ecol* **51**, 375–393.
- Zamioudis, C. & Pieterse, C. M. J. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 139–150.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**, 203–214.
- Zhao, K., Penttinen, P., Guan, T., Xiao, J., Chen, Q., Xu, J., Lindström, K., Zhang, L., Zhang, X. & Strobel, G. A. (2010). The Diversity and Anti-Microbial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from Medicinal Plants in Panxi Plateau, China. *Curr*

*Microbiol* **62**, 182–190.

**Zribi, K., Mhamdi, R., Huguet, T. & Aouani, M. E. (2005).** Diversity of Sinorhizobium Meliloti and S. medicae Nodulating Medicago Truncatula According to Host and Soil Origins. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 1009–1015.

**Zurdo-Piñeiro, J. L., Rivas, R., Trujillo, M. E., Vizcaíno, N., Carrasco, J. A., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. (2007).** Ochrobactrum cytisi sp. nov., isolated from nodules of Cytisus scoparius in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 784–788.