

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA**  
**INSTITUTO HISPANOLUSO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS**



**TESIS DOCTORAL**

---

Estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a nódulos de *Lotus corniculatus* y análisis de los procesos de infección, nodulación y producción vegetal inducidos por cepas del género *Mesorhizobium*.

Memoria presentada por **Marta Marcos García** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Fdo. Marta Marcos García

Salamanca, 2017



**D. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología y D. Pedro F. Mateos González, Catedrático del área de Microbiología del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad De Salamanca,**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a nódulos de *Lotus corniculatus* y análisis de los procesos de infección, nodulación y producción vegetal inducidos por cepas del género *Mesorhizobium*”, elaborada por Doña Marta Marcos García y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctora.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 20 de Febrero de 2017.

Fdo.: Dr. D. Raúl Rivas González

Fdo.: Dr. D. Pedro F. Mateos González



Con el permiso de mis directores de Tesis, quiero y debo empezar a agradecer y dedicar esta Tesis a la persona que me lo ha dado absolutamente todo en esta vida, sin pedir nunca nada a cambio. Ejemplo de fortaleza y de seguridad, has sabido plantar cara a cada uno de los golpes que te ha ido dando la vida, sin un mal gesto, sin una lágrima de derrota, sin llamar la atención, sin queja alguna. Con la cabeza bien erguida y hasta una sonrisa en la cara; sin perder tu característico y particular humor. Eres digna de admiración, mi ejemplo a seguir. Con que solamente me parezca a ti en una décima parte, ya me doy por satisfecha. En estos momentos no puedo por menos que decir a los cuatro vientos lo muchísimo que te quiero y que te agradezco que seas mi madre. Espero que tanto tú como papa estéis orgullosos de mí. Soy lo que soy gracias a vosotros.

Ahora ya sí. Quiero agradecer a mi director el Dr. D. Raúl Rivas González, una vez más, la confianza que depositó en mí hace más de seis años. Gracias por dejarme formar parte de este maravilloso grupo de trabajo y por haber dejado que creciera y aprendiera en él. Gracias por haberme enseñado tanto y por dejar que aprendiera tanto de ti.

A mi co-director el Catedrático D. Pedro F. Mateos González, por estar siempre dispuesto a ayudarme cuando lo he necesitado. ¡Y en estos últimos meses ha sido en muchas ocasiones! Gracias por aclarar mis dudas y por ayudarme a encontrar las palabras adecuadas para expresarme mejor. Gracias por hacerme tantos huecos en tu apretada agenda (casi tanta como la de la cosí!) mientras me ofrecías un cafetito rico de esos tuyos. Gracias, sencillamente por haberme hecho ver las cosas de una manera mucho más clara.

Quiero agradecer a la Dra. D<sup>a</sup> Encarna Velázquez por haberme hecho un poco más visible el complicado mundo de la taxonomía. Gracias por tanto como me has ayudado. Y gracias también por esos seminarios tan interesantes. ¡Habrás que repetir otro pronto para despejar dudas!

Al catedrático D. Eustoquio Martínez Molina también quiero agradecer sus buenas palabras y consejos durante toda mi estancia en el laboratorio.

Y es que han pasado más de seis años desde que entré por primera vez por la puerta del laboratorio 209 y son muchos los recuerdos que tengo y que han dejado huella. Y muchas las personas que he conocido y que han pasado por el labo desde entonces. Y volviendo a los recuerdos... ¡pero qué de cantidad de cosas nos ha dado tiempo a hacer en estos seis años! Ir de congresos para viajar, digo viajar para ir de congresos; comer (porque mira que nos gusta!) comidas, cenas, desayunos, meriendas, aperitivos, picoteos, ¡si es que todo nos viene bien!; excursiones al campo, ¡que en el último año han sido muchas!. Hemos sacado hasta nuestra faceta de actores y actrices; aunque desde que llego Alex dejásemos de grabar... (¡que no! ¡Con la de alegría que repartes cada día!). Bromitas de fresa a parte, me llevo un montón de recuerdos de mi paso por el Departamental, y todos y cada uno de ellos han sido gracias a vosotros (por orden alfabético) Ale, Alex, Esther, Lore, Paula, Pepe, Pepin,

Pi, Rebe y Xavier. Rebe, acertaste de pleno: “lo que parece imposible, a veces solo tarda un poco más”. Xavier, gracias infinito por aguantar mis eternos monólogos y haberme ayudado y escuchado tanto. Lore, ¡te paso el relevo! Porque creo que serás la siguiente. A ti y a todos los que venís detrás: ¡paciencia y ánimo! Tendréis momentos malos, pero al final se acaban superando. ¡Mucha suerte! En fin... que poco más puedo deciros. Que aunque esta fase está llegando a su fin, espero seguir viviendo muchas más con vosotros, aunque sea fuera del labo.

Quiero acordarme también de toda la gente que de un modo u otro se han cruzado en mi camino y me han ayudado: Lina, Elena, Inma, los técnicos Sandra, David, Marta (¡no recuerdo si me dejo alguno más!).

A todos y cada uno de mis amigos, por haberme apoyado y haber estado tan pendientes; por haber estado tan cerca aunque nos separaran, en algunos casos, tantos kilómetros: Sory, Juanjo, Marta, Berna, María, Natalia, Bea, Paula, Crispis y Sergio. Gracias.

A mi familia. Por haceros una piña en las adversidades y los duros momentos que nos ha ido dando la vida. Por hacerme sentir querida y protegida a vuestro lado, por escucharme cuando más lo he necesitado y por reprenderme cuando ha sido necesario. Por hacerme creer que esta vida es mejor si vosotros camináis a mi lado. Por entender, comprender y apoyar cada paso y decisión que he tomado. Por hacerme reír tantísimo, porque no se si sabéis que tengo millones de recuerdos grabados en mi mente con una enooooorme sonrisa y lágrimas en los ojos (de tanto reír). Mama, Papa, Sara, Tata, Ama, Begoña, Vita (mi rubia bonita), David y Luisi (¡qué poquito queda para verte la carita!) simplemente por estar ahí siempre e incondicionalmente, GRACIAS.

También quiero agradecer a la familia Dominguez-Prada por haberme hecho un hueco en sus corazones y sus vidas y tratarme desde el primer momento que puse un pie en la familia, como a una más. Gracias por estar ahí.

Y, ¡cómo no! Tengo que agradecer a la persona por la que he llegado realmente a este punto, a estar escribiendo estas palabras que marcan casi el término de una etapa. Porque me agarraste de la mano hace más de siete años y desde entonces no me has soltado ni una sola vez. Porque contigo a mi lado es mucho más fácil andar y escoger los caminos que me va poniendo la vida delante. Porque has sabido estar en todos y cada uno de los momentos de mi vida, mejores y peores, con una palabra de aliento y un abrazo constante. Por complementarme y saber sacar lo mejor de mí. Por hacerme reír cada día. Alfredo gracias por quererme cada minuto, de cada hora, de cada día; gracias por tu apoyo incondicional. No me sueltes nunca de la mano, que yo no lo haré.

Y creo que eso es todo... Gracias en general a todos los que de un modo u otro habéis estado en esta etapa de mi vida.

## *Agradecimientos*

Espero haber estado a la altura de lo que se esperaba de mí. Al menos tengo la seguridad y la certeza de haberlo intentado, dándolo todo de mí. Se cierra una etapa, y se abre otra (un poco incierta) pero espero que, lleve donde me lleve la vida, siempre tenga a gente como vosotros cerca.



“Solo es capaz de realizar sus sueños el que,  
cuando llega la hora, sabe estar despierto”.

León Daudí

“Dime y lo olvido, enséñame y lo recuerdo,  
involúcrame y lo aprendo”.

Benjamin Franklin



A las chicas García  
y allegados.  
A Alfredo.





# ÍNDICE



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

### **INTRODUCCIÓN.**

1. Situación actual y legislativa de la política agraria (horizonte 2020).	3
2. Papel de las bacterias en los procesos agrícolas.	4
2.1. Biodiversidad bacteriana en la rizosfera (hablar de rizosfera).	7
2.2. Potencial de las bacterias endófitas y endosimbiontes.	8
2.3. Inoculantes microbianos: importancia y beneficios .	10
3. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .	11
3.1. Desarrollo radicular y nodulación.	12
3.2. Interacción molecular <i>Rhizobium</i> -leguminosa.	13
3.2.1. Diálogo y señalización molecular.	13
3.2.2. Adhesión y colonización bacteriana.	14
3.2.3. Infección primaria.	15
3.2.4. Infección secundaria.	16
3.2.5. Tipos de nódulos en leguminosa.	17
3.3. Especificidad de bacterias asociadas a nódulos.	20
4. Familia <i>Fabaceae</i> .	31
4.1. Taxonomía y distribución geográfica del género <i>Lotus</i> .	34
4.2. Importancia agronómica de especies del género <i>Lotus</i> .	37
4.3. Género <i>Lotus</i> : un sistema modelo.	39
4.4. <i>Lotus corniculatus</i> .	41
4.4.1. Diversidad de bacterias endofíticas de <i>Lotus corniculatus</i> .	43
5. Potencial biotecnológico de la utilización de bacterias.	44
5.1. Celulosa bacteriana.	44
5.1.1. Importancia y propiedades del biopolímero.	46
5.1.2. Aplicaciones industriales y biotecnológicas .	47
5.2. Ácidos polihidroxicarboxílicos (PHAs).	48

### **OBJETIVOS.**

Objetivos.	53
------------	----

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

1. Microorganismos utilizados en el estudio.	57
1.1. Aislamiento de cepas.	57
1.2. Mantenimiento y conservación de cepas.	57
2. Caracterización genotípica.	58
2.1. Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos.	58
2.1.1. Extracción de DNA total con kit comercial REExtract-N-Amp Plant PCR kit de Sigma®.	58
2.1.2. Extracción de DNA total por lisado bacteriano.	58
2.2. Amplificación y electroforesis de ácidos nucleicos .	59
2.2.1. Perfiles RAPD.	59
2.2.2. Perfiles TP-RAPD.	60
2.2.3. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S.	61
2.2.4. Amplificación y secuenciación de los genes <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>glnII</i> y <i>nodC</i> .	62
2.3. Electroforesis en gel de agarosa.	63
2.4. Recuperación de fragmentos a partir de geles de agarosa.	64
2.5. Secuenciación.	65
2.5.1. Análisis de las secuencias de ADN.	65
2.6. Análisis de escalado multidimensional.	66
2.7. Determinación del contenido en G+C.	66
3. Técnicas de Biología molecular .	67
3.1. Transformación de <i>Mesorhizobium</i> .	67
3.1.1. Transformación mediante transferencia de ADN por conjugación biparental.	67
3.1.2. Transformación mediante transferencia de ADN por conjugación triparental.	67
4. Caracterización fenotípica	68
4.1. Morfología.	68
4.2. Producción de sideróforos.	69
4.3. Determinación de la capacidad para producir ácido indol acético.	70
4.3.1. Vía cualitativa.	70

4.3.2. Vía cuantitativa.	73
4.4. Solubilización de fosfato.	74
4.5. Determinación cualitativa de la producción de celulosa.	75
4.6. Detección de la actividad celulolítica.	75
4.7. Determinación de la formación de biofilms in vitro.	76
4.7.1. Determinación de la formación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.	76
4.7.2. Determinación de la formación de biofilms en vidrio.	77
4.8. Quimiotaxonomía.	78
4.9. Fisiología.	78
4.9.1. Crecimiento en Diferentes Condiciones de pH, Temperatura y Salinidad.	78
4.9.2. Resistencia Natural a Antibióticos.	79
4.9.3. Producción de Actividades Enzimáticas.	79
4.9.4. Test fisiológicos y bioquímicos utilizando sistemas comerciales.	80
5. Determinación y caracterización de biopolímeros.	80
5.1. Determinación cualitativa de la producción de celulosa a partir de células bacterianas, ensayos de floculación y tratamiento con celulasas de los agregados.	80
5.2. Purificación de celulosa.	81
5.3. Determinación física mediante Rayos X.	82
5.4. Ensayos de espectroscopia infrarroja (FTIR).	83
5.5. Promoción de la producción de PHAs.	83
5.6. Extracción e identificación bioquímica de PHAs producidos por bacterias.	84
6. Técnicas histológicas y microscópicas.	85
6.1. Cortes histológicos de nódulos. Azul de Toluidina.	85
6.2. Microscopía óptica.	85
6.3. Microscopía de fluorescencia.	86
7. Ensayos en plantas.	86
7.1. Material vegetal.	86
7.2. Ensayos de nodulación en sistema hidropónico.	86
7.3. Ensayos de colonización e infección en placa cuadrada.	88
7.4. Ensayos de invernadero.	89

7.5. Ensayos de campo.	89
8. Análisis del suelo.	90

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **Capítulo I. Estudio de la biodiversidad bacteriana en *Lotus corniculatus*.**

1. Aislamiento de microorganismos.	95
2. Caracterización genotípica.	97
2.1. Análisis de la biodiversidad mediante perfiles de RAPD.	97
2.2. Análisis de los perfiles de TP-RAPD.	101
2.3. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S.	105
2.4. Análisis filogenético de los genes <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>glnII</i> .	122
2.5. Análisis filogenético del gen <i>nodC</i> .	128
3. <i>Mesorhizobium helmanticense</i> sp. nov. aislada de nódulos de <i>Lotus corniculatus</i> .	132
3.1. Caracterización genotípica.	132
3.2. Quimiotaxonomía: ácidos grasos.	134
3.3. Caracterización fenotípica de la especie <i>M. helmanticense</i> .	136
3.4. Descripción de <i>Mesorhizobium helmanticense</i> sp. nov.	136

### **Capítulo II. Estudio de la capacidad para promover el crecimiento vegetal de los aislados.**

1. Solubilización de fosfato.	142
2. Producción de sideróforos.	145
3. Producción de ácido indol-acético.	149
4. Determinación cualitativa de la producción de celulosa.	155
5. Determinación de la formación de biofilms in vitro.	161
5.1. Determinación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.	161
5.2. Determinación de la formación de biofilms sobre soporte de vidrio.	166
6. Detección de la actividad celulolítica.	172

**Capítulo III. Potencial biotecnológico del genero *Mesorhizobium*.**

1. Determinación y caracterización de biopolímeros.	181
1.1. Ensayos de floculación.	182
1.2. Tinción con Blanco de Calcoflúor.	186
1.3. Purificación de los biopolímeros.	189
1.4. Determinación física de la celulosa (Difracción de rayos X).	191
1.5. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).	193
1.6. Tratamiento de los agregados con celulasas.	195
2. Determinación y caracterización de Ácidos Polihidroxicarboxílicos.	198
2.1. Selección de bacterias productoras de PHAs.	198
2.2. Identificación de ácidos polihidroxicarboxílicos (PHAs).	200

**Capítulo IV. Estudio de la capacidad para formar nódulos en las raíces de *Lotus corniculatus*.**

1. Ensayos de nodulación con <i>M. jarvisii</i> ATTC 33669 <sup>T</sup> <i>M. erdmanii</i> USDA 3471 <sup>T</sup> y <i>M. loti</i> NZP 2213 <sup>T</sup> .	205
1.1. Cinética de nodulación.	205
1.2. Morfología nodular.	207
1.3. Histología nodular.	208
2. <i>Mesorhizobium jarvisii</i> CSLC01N, CSLC02N, CSLC03N, CSLC11N, CSLC12N, CSLC13N, CSLC28N, CSLC29N, CSLC33N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N y CS116N.	212
2.1. Cinética de nodulación.	212
2.2. Morfología nodular.	214
2.3. Histología nodular.	215
3. <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC22N, CSLC26N, CSLC35N y CSLC42N.	223
3.1. Cinética de nodulación.	223
3.2. Morfología nodular.	225
3.3. Histología nodular.	225
4. <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC30N.	228
4.1. Cinética de nodulación.	228
4.2. Morfología nodular.	229
4.3. Histología nodular.	229

## Índice de contenidos

5. <i>Mesorhizobium caraganae</i> CSLC04N y CSLC10N.	230
5.1. Cinética de nodulación.	230
5.2. Morfología nodular.	231
5.3. Histología nodular.	232
6. <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N.	233
6.1. Cinética de nodulación.	233
6.2. Morfología nodular.	234
6.3. Histología nodular.	235
7. <i>Mesorhizobium helmanticense</i> CSLC19N, CSLC37N Y CSLC115N.	238
7.1. Cinética de nodulación.	238
7.2. Morfología nodular.	239
7.3. Histología nodular.	240
8. <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC05N, CSLC06N, CSLC07N, CSLC15N, CSLC17N, CSLC18N, CSLC24N, CSLC31N Y CSLC40N.	242
8.2. Cinética de nodulación.	242
8.3. Morfología nodular.	243
8.4. Histología nodular.	244
9. <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC08N y CSLC23N.	250
9.1. Cinética de nodulación.	250
9.2. Morfología nodular.	251
9.3. Histología nodular.	251
10. Ensayos de coinoculación en cultivo hidropónico.	253
10.1. Cinética de nodulación.	254
10.2. Morfología e histología nodular.	258
10.3. Histología nodular.	261
10.4. Aislamiento a partir de nódulo.	269
11. Ensayos de coinoculación en invernadero (microcosmos).	270
11.1. Histología nodular.	270

## Capítulo V. Análisis de los procesos de colonización e infección de raíces en *Lotus corniculatus*.

1. Interacción <i>M. jarvisii</i> CSLC28N- <i>Lotus corniculatus</i> .	281
2. Interacción <i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC35N- <i>Lotus corniculatus</i> .	284
3. Interacción conjunta de <i>M. jarvisii</i> CSLC28N y	

<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC35N sobre raíces de <i>L. corniculatus</i> .	286
<b>Capítulo VI. Evaluación del efecto de inoculantes bacterianos seleccionados en la producción vegetal de <i>Lotus corniculatus</i>.</b>	
1. Ensayos en Invernadero (Microcosmos).	291
1.1. Fenotipo simbiótico en invernadero.	292
1.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.	296
2. Ensayos en campo.	304
2.1. Primer corte	305
2.1.1. Fenotipo simbiótico.	305
2.1.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.	306
2.2. Segundo corte.	310
2.2.1. Fenotipo simbiótico.	310
2.2.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.	312
3. Análisis del suelo.	317
<b>DISCUSIÓN GENERAL.</b>	
Discusión general.	323
<b>CONCLUSIONES.</b>	
Conclusiones.	343
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	
Bibliografía.	347







# INTRODUCCIÓN



## **1. Aspectos generales de la situación actual y legislativa de la política agraria española.**

La intensificación agrícola, incluyendo la labranza del suelo, el aumento de la fertilización mineral y la reducción de la diversidad de los cultivos, afecta la diversidad biológica del suelo a diferentes niveles dentro de la red alimentaria del mismo, que van desde la diversidad genética de las bacterias, a la diversidad de especies de ácaros depredadores (Wardle 1995; Behan-Pelletier 2003; van Diepeningen et al. 2006). La comprensión de estos efectos puede ser útil a fin de preservar y restaurar la biodiversidad en los suelos agrícolas (Firbank et al. 2008) y reforzar el papel de la biota del suelo en el agro-funcionamiento de los ecosistemas (Mulder et al. 2001; Brussaard et al. 2010).

La intensificación agrícola se refleja en la aplicación excesiva de fertilizantes químicos y da lugar a efectos negativos para el medio ambiente y la salud humana y animal tales como la lixiviación, la contaminación de los recursos hídricos, la destrucción de microorganismos e insectos beneficiosos, la susceptibilidad del cultivo a posibles enfermedades, la acidificación o alcalinización de la tierra o la reducción de la fertilización del suelo, lo cual constituye un daño irreparable en el sistema general (Chen 2006).

Por otra parte, el empleo excesivo de nitrógeno en la fertilización conduce al debilitamiento de los tejidos vegetales dando lugar a una sensibilización frente a enfermedades y plagas. Además, debido a la alta fertilización nitrogenada, se reduce la colonización de las raíces de las plantas por micorrizas y se inhibe la fijación simbiótica de nitrógeno por las bacterias del género *Rhizobium*. Estas bacterias, mejoran la descomposición de la materia orgánica del suelo, por lo que su ausencia conduce a una degradación de la estructura del suelo. Asimismo, la eficiencia del fertilizante se puede ver reducida debido a la pérdida de los nutrientes de los suelos a través de la desnitrificación, lixiviación o emisión de gases (Chen 2006), que deriva en graves problemas medioambientales derivados de la eutrofización de las aguas, aumento de nitratos en el agua potable y aparición de nitrosaminas en el ambiente lo que se traduce en un incremento en la incidencia de diversos tipos de neoplasias.

El sector agrario y la industria agroalimentaria en España constituyen un sector decisivo dentro de la economía nacional y europea por lo que demanda la consolidación de líneas de investigación que proporcionen un sólido desarrollo tecnológico. De hecho, Europa apuesta firmemente por este aspecto, y así lo refleja en el Horizonte 2020, el mayor programa público de inversiones en el mundo para impulsar la investigación, la innovación y la competitividad y dónde la seguridad alimentaria y la agricultura sostenible son una de sus líneas prioritarias. En esta línea, a principios del año 2016 se publicó un documento titulado “A strategic approach to EU agricultural research &

innovation” (Un enfoque estratégico de la investigación e innovación agrícola de la UE), enfocado dentro del Horizonte 2020 y en el cual se pretende dar respuesta a tres cuestiones principales: por qué necesitamos una estrategia para la investigación agrícola y la innovación para hacer frente a los retos de la agricultura, las comunidades rurales y nuestra sociedad en general; cuales son las áreas principales de investigación e innovación y cómo implementar la estrategia. Para dar respuesta a todas estas preguntas la investigación desempeña un papel crucial para poder contribuir al diseño y aplicación de la política de la Unión Europea proporcionando una base sólida de conocimientos para la toma de decisiones a largo plazo y la planificación, que es necesaria y fundamental para hacer frente a los desafíos enfrentados.

Por otro lado, 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. Además, en la Ley de Sanidad Vegetal (43/2002) ya se incluye en el capítulo 4 a los microorganismos como agentes biológicos útiles para los cultivos. En este contexto, una de las metas que persigue la sociedad actual, es conseguir un sistema agrícola sostenible, manteniendo y mejorando la salud humana, de tal forma que se beneficien tanto productores como consumidores y, produciendo suficientes alimentos para abastecer a la creciente población mundial, pero sin repercutir en la calidad ambiental y manteniendo la conservación de los recursos naturales, como el suelo y el agua.

Posterior a esta Directiva, el Real Decreto 1311/2012 aprobó el marco de actuación para el uso sostenible de productos fitosanitarios, cuyo objetivo principal es garantizar el menor impacto posible por el uso de agroquímicos fomentando el principio de gestión integrado de plagas. Además contempló medidas para el sector de la distribución, los agricultores y otros usuarios, todo ello utilizando sistemas de control biológico junto con los tradicionales de control químico, pero sin afectar a la rentabilidad económica. Para el cumplimiento de este Real Decreto, se elaboró el “Plan de acción nacional para el uso sostenible de los productos fitosanitarios”, conocido como PAN cuyos objetivos y medidas introducen criterios de sostenibilidad en el uso de estos productos fitosanitarios para el periodo comprendido entre los años 2013 a 2017.

## **2. Papel de las bacterias en los procesos agrícolas.**

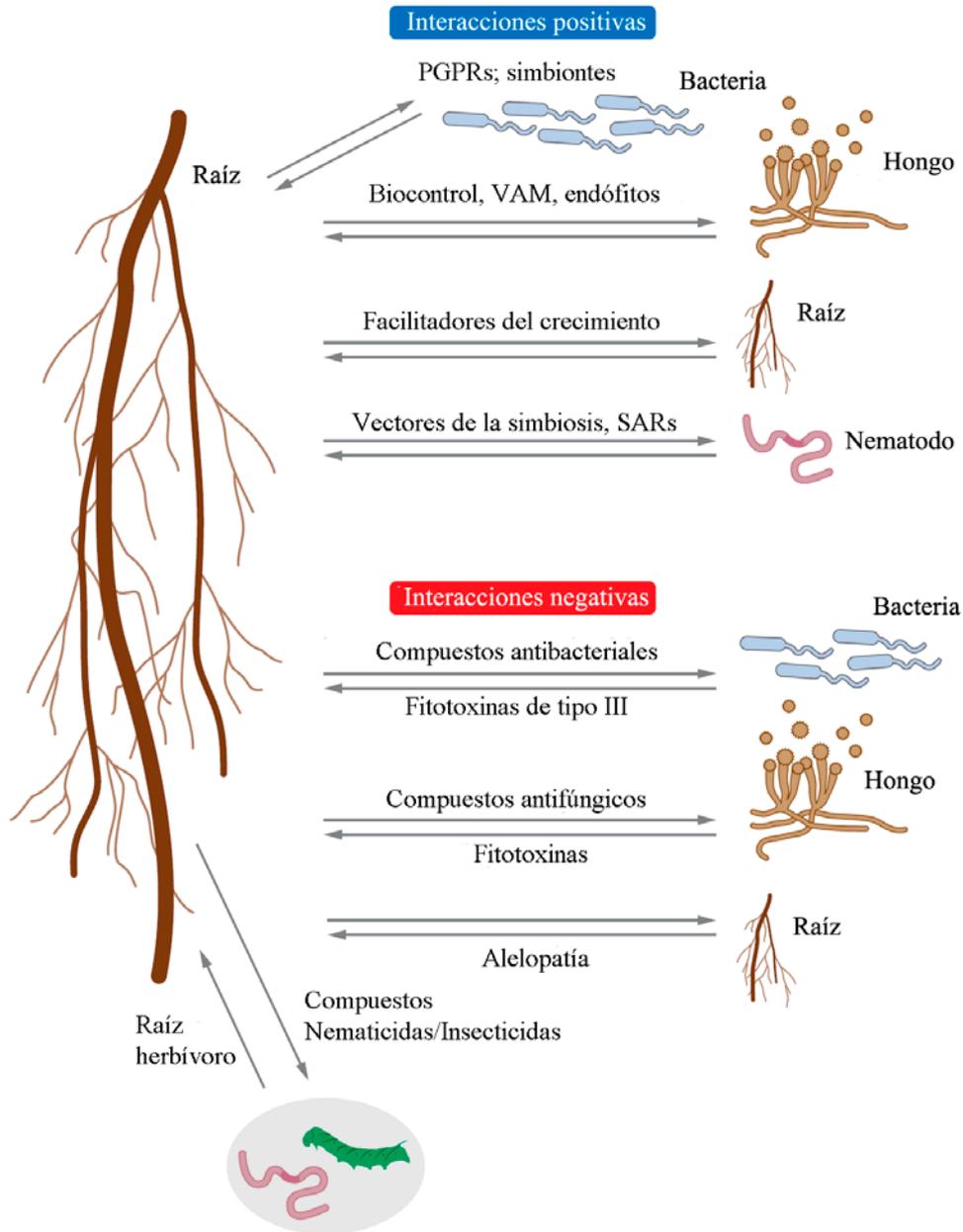
Frente a las indudables desventajas ambientales y de salud pública que presentan los fertilizantes químicos, podemos contraponer los beneficios de los biofertilizantes. Los biofertilizantes son sustancias que contienen microorganismos vivos que ayudan, entre otros aspectos, a la expansión del sistema radicular y a una mejor germinación de la semilla. La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos en agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sostenibilidad y productividad de este sector tan importante para las economías y las sociedades de todos

los países. Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la regulación de la dinámica de la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para las plantas, tales como N, P y S. Al mismo tiempo, los inoculantes microbianos constituyen un componente importante de la gestión integrada de los nutrientes, que conduce a una agricultura sostenible.

Los microorganismos asociados a las plantas, cumplen importantes funciones sobre el crecimiento de las mismas y su salud. La promoción directa del crecimiento de la planta por los microorganismos, se basa en la mejora de la adquisición de nutrientes y la estimulación hormonal.

La competencia por los recursos, la interferencia química y el parasitismo, conducen a interacciones negativas (Figura 1) entre las plantas. Los exudados de las raíces tienen potencial para influir en los tres mecanismos de interferencia. Para un número determinado de especies de plantas, los exudados de las raíces juegan un papel directo como fitotoxinas en la mediación de la interferencia química (alelopatía). Además, los exudados de las raíces son fundamentales para el desarrollo de las asociaciones entre algunas plantas parásitas y sus anfitriones. Por último, los exudados también pueden desempeñar un papel importante en la competencia por los recursos indirectos, mediante la alteración química del suelo, los procesos del suelo y las poblaciones microbianas (Bais et al. 2006).

En ocasiones, las interacciones positivas (Figura 1) entre las plantas, también son controladas por los exudados de las raíces; pudiendo inducir, incluso, respuestas de defensa en las plantas vecinas.



**Figura 1.** Representación esquemática de las posibles interacciones rizosféricas, mediadas por los exudados de las raíces, que se clasifican en dos categorías: interacciones positivas y negativas. Las interacciones positivas implican interacciones mediadas por los exudados de las raíces con rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Las raíces producen señales químicas que atraen a las bacterias e inducen la quimiotaxis. Además, incluyen los facilitadores de crecimiento o imitadores de los reguladores del crecimiento que apoyan el crecimiento de otras plantas y también llevan a cabo la señalización del cruce de especies con invertebrados rizosféricos. En contraste, las interacciones negativas implican la secreción de antimicrobianos, fitotoxinas, nematicidas y compuestos insecticidas. Los intercambios químicos están representados en el esquema por flechas. VAM, Micorrizas arbusculares vesiculares; SARs, Resistencia sistémica adquirida. Imagen adaptada de (Bais et al. 2006).

Entre las principales interacciones positivas microorganismo-planta que actualmente están en estudio, nos encontramos las siguientes:

- La estabilización bacteriana, a través de la producción de exopolisacáridos (Alami et al. 2000).
- La promoción de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) a través del aumento de la disponibilidad de nutrientes. Esto puede ocurrir de muchas maneras diferentes, como por ejemplo a través de la fijación asociativa de N<sub>2</sub>, la solubilización de P, la producción de sideróforos y el aumento de la disponibilidad de Fe (Andrews et al. 2003). Además, estos microorganismos pueden influir en el equilibrio hormonal de la planta, produciendo compuestos tales como la fitohormona ácido indol acético o la enzima ACC desaminasa (Bhattacharjee et al. 2008).
- La promoción de bacterias endofíticas, que producen metabolitos secundarios inusuales de importancia para la planta, los cuales activan el sistema de respuesta al estrés en plantas conduciendo a una mayor resistencia contra los agentes patógenos. Así mismo, los endófitos también pueden ayudar a eliminar los contaminantes, solubilizar fosfato o aportar nitrógeno asimilable para las plantas. Por todo ello, los tejidos de las plantas y las plantas se benefician ampliamente de los microorganismos endófitos (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006), afectando directamente al crecimiento de las plantas y su función (Humphry et al. 2007).
- La producción de antibióticos, la inducción de la resistencia sistémica y la exclusión competitiva de patógenos para suprimir las enfermedades de las plantas. El equilibrio entre la población de posibles patógenos y de microorganismos beneficiosos presentes en la rizosfera y filosfera, conduce a nuevos enfoques en la protección de cultivos que mejoran la sostenibilidad del sistema ecológico (Lugtenberg y Kamilova 2009). De esta manera, el requerimiento para eliminar o suprimir microorganismos patógenos debe ser reemplazar estos en beneficio de los no patógenos, manteniendo a los patógenos en un estado asintomático o estable en el sistema de la planta.

Una planta sana tiene, por lo general, una rizosfera saludable, que debe ser dominada por microorganismos beneficiosos para la misma. Por el contrario, en suelos insalubres, dominada por microorganismos patógenos, el crecimiento óptimo de la planta no sería posible.

## **2.1. Biodiversidad bacteriana en la rizosfera.**

La rizosfera es la interfase entre el suelo y la raíz de la planta. Las raíces de las plantas segregan una gran cantidad de carbono orgánico que permite a las poblaciones microbianas colonizar el interior de la planta y gran parte del suelo, interactuando entre sí e incidiendo en el medio ambiente. Dentro de este proceso continuo, la rizosfera forma una zona de transición entre el suelo y la superficie de la raíz de la planta.

Las raíces de las plantas ejercen importantes efectos en la rizosfera a través de la rizodeposición; esto es: exudación procedente de las raíces, producción de mucílagos y

liberación de células desprendidas de la raíz, proporcionando nichos ecológicos adecuados para el crecimiento microbiano (Bais et al. 2006). Lo más común es que las bacterias que viven en la rizosfera procedan, en su mayor parte, del suelo circundante y prosperan en las condiciones imperantes en las cercanías de las raíces de las plantas. Por tanto, la rizosfera es un área importante de interacción entre las plantas y los microorganismos en el suelo.

Además de jugar un papel esencial en varios ciclos biogeoquímicos, las comunidades microbianas del suelo también son responsables de los ciclos de los compuestos orgánicos y, además, contribuyen a la nutrición vegetal, sanidad vegetal, y a la estructura y fertilidad del suelo (Kirk et al. 2004). Los microorganismos representan la columna vertebral funcional de prácticamente cualquier ecosistema y es esencial entender su respuesta ante los cambios de las condiciones abióticas y bióticas.

Aunque las investigaciones taxonómicas, bioquímicas, genéticas y moleculares han proporcionado abundante información sobre algunas especies microbianas (Priest et al. 2012), todavía existe cierta escasez de conocimientos sobre los aspectos espaciales y temporales, aunque las bacterias se encuentran prácticamente en todas partes. Esta ubicuidad se puede atribuir a la capacidad de las bacterias para obtener la energía y los nutrientes necesarios de diversas fuentes (Hodgson 1989).

Los estudios basados en el uso de medios de crecimiento constante han mostrado que las poblaciones bacterianas que residen en la rizosfera, son de uno a dos órdenes de magnitud mayor que los que residen en el suelo y están constituidos por una fracción más grande de bacterias Gram negativas, simbioses y estrategas de la “r” (Curl y Truelove 1986).

## **2.2. Potencial de las bacterias endófitas y endosimbiontes.**

Las bacterias endófitas se pueden definir como aquellos microorganismos que se encuentran en la superficie o en el interior de las plantas y que no tienen efectos visiblemente perjudiciales para la planta. En esta definición también se pueden incluir los simbioses y aquellas bacterias que migran entre la superficie y el interior de la planta durante su fase endofítica (Hallmann et al. 1997; Mano y Morisaki 2008).

Los tejidos de las plantas y las plantas se benefician ampliamente de los microorganismos endófitos, que promueven el crecimiento y el rendimiento de las plantas y confieren una mayor resistencia a varios patógenos. Los endófitos también producen metabolitos secundarios inusuales de importancia para la planta y activan el sistema de respuesta al estrés en plantas que conducen a una mayor resistencia contra los agentes patógenos. Los endófitos también pueden ayudar a eliminar los contaminantes, solubilizar fosfato o aportan nitrógeno asimilable para las plantas. Además, las bacterias endofíticas suministran de vitaminas esenciales a las plantas. La producción de compuestos similares a la auxina incrementa la producción y la

germinación de semillas, junto con un mayor crecimiento de brotes y ahijamientos (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

Las bacterias con la capacidad para sintetizar hormonas vegetales, tales como ácido indol acético (AIA), giberelinas (Gas) y citoquininas (CK), puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Saleh-Lakha y Glick 2006).

El AIA se ha demostrado que tienen un importante papel no sólo en el desarrollo de la planta, sino también en la activación del sistema de defensa de la planta. Además, también podría intervenir como molécula de señalización en la comunicación bacteriana. Esta sustancia tiene la capacidad de inducir la producción de raíces adventicias, produciendo el entorno necesario para el desarrollo de las bacterias de la rizosfera, por lo que numerosas rizobacterias han adquirido la capacidad de producir ácido indolacético. Entre ellas encontramos la mayoría de la especies del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, algunas especies de los géneros *Azorhizobium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, así como otros géneros de bacterias que habitan en la rizosfera (Taiz et al. 2006).

Las giberelinas pueden actuar en diferentes momentos del desarrollo, desde iniciar la germinación de la semilla, pasando por el cambio de etapa juvenil a adulta, hasta la promoción del desarrollo de los frutos (Taiz et al. 2006).

El efecto de las citoquininas sobre las plantas es regular la división celular en tallos y raíces, siendo capaces de regular las distintas fases en el ciclo vegetativo y reproductor de una célula, así como en la mitosis. Reducen también la senescencia de las hojas, favorecen el movimiento de nutrientes y el desarrollo de cloroplastos (Taiz et al. 2006).

Por otro lado, las bacterias que solubilizan fosfato se conocen comúnmente como bacterias solubilizadoras de fosfato o PSB (Phosphate Solubilizing Bacteria). La mayoría de los suelos son deficientes en formas solubles de fósforo, siendo el segundo nutriente más utilizado por las plantas, por detrás del nitrógeno. Incluso en suelos ricos en fósforo, la porción utilizable por las plantas es sumamente baja (0,1%) (Stevenson y Cole 1999). Los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Bacillus* contienen las cepas con una mayor capacidad para solubilizar fosfato cuando se inoculan con semillas o como inoculantes en suelo, pues solubilizan tanto el fósforo presente en el suelo, como aquel añadido artificialmente incrementando considerablemente la productividad de los cultivos (Abd-Alla 1994).

Respecto a la producción de sideróforos, el hierro es un elemento requerido por las plantas en la síntesis de clorofila, forma parte también de los citocromos, que participan en la respiración celular, siendo un importante co-factor en múltiples reacciones enzimáticas. Su deficiencia causa zonas amarillentas o blanquecinas entre los nervios foliares que conducen a la muerte de los tejidos foliares, así su exceso causa el

bronceado de las hojas, caracterizado por la aparición de pequeñas hoja marrones (Epstein y Bloom 2005). El hierro es un elemento requerido por las plantas en la síntesis de clorofila, forma parte también de los citocromos, que participan en la respiración celular, siendo un importante co-factor en múltiples reacciones enzimáticas. Su deficiencia causa zonas amarillentas o blanquecinas entre los nervios foliares que conducen a la muerte de los tejidos foliares, así su exceso causa el bronceado de las hojas, caracterizado por la aparición de pequeñas hoja marrones (Epstein y Bloom 2005).

Otros efectos que la infección del microorganismo endófito origina en la planta huésped incluyen el ajuste osmótico, la regulación estomática o la modificación de la morfología radicular, mejorando la absorción de minerales y modificando la acumulación y el metabolismo del nitrógeno (Rosenblueth y Martínez-Romero 2006).

### **2.3. Inoculantes bacterianos: importancia y beneficios.**

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son aplicadas como inoculantes microbianos o biofertilizantes en agricultura y silvicultura, con el objetivo de aumentar el rendimiento de los cultivos sobre los que son aplicados. Está ampliamente constatado el beneficio que estos microorganismos aportan a los cultivos, encontrando muchos ejemplos de su aplicación y sus beneficios en la literatura.

Se ha demostrado la capacidad que presentan distintas cepas identificadas dentro del género *Rhizobium* para promover el crecimiento de plantas hortícolas como por ejemplo el tomate y el pimiento (García-Fraile et al. 2012), de la lechuga y la zanahoria (Flores-Félix et al. 2013), o de la espinaca (Jiménez-Gómez et al. 2016) incrementando el rendimiento de dichas plantas a través de diferentes mecanismos PGPR que en cada caso presentan.

Pero no solamente encontramos ejemplos de bacterias rizobianas aplicadas sobre cultivos con buenos rendimientos. También se ha estudiado el efecto que *Phyllobacterium endophyticum* presenta sobre plantones de fresa, sobre los que incrementó el número y longitud de estolones producidos (Flores-Félix et al. 2013), así como el contenido de vitamina C en los frutos cuyas plantas fueron inoculadas con dicha bacteria (Flores-Félix et al. 2015). Por otro lado, la producción de azafrán también se ha visto aumentada, tras la inoculación de sus plantas con una cepa del género *Curtobacterium* (Díez-Méndez et al. 2016). Otros ejemplos de aumento de producción los encontramos en la inoculación de *Bacillus* sp. en la patata a través de la síntesis de auxina (Ahmed y Hasnain 2010), o en el pimiento por la síntesis de citoquininas (Joo et al. 2004).

Las bacterias no solamente son capaces de aumentar el rendimiento y la producción de los cultivos por medio de la síntesis de distintas sustancias que pueden

ser asimiladas directamente por la planta, o mediante la movilización de nutrientes, sino que también pueden inducir la resistencia al estrés en las plantas. Por ejemplo, una cepa de *Pseudomonas putida* es capaz de proteger a la planta de algodón de una situación de estrés salino, absorbiendo  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$  y  $Ca^{2+}$  perjudicial para la planta (Wei et al. 2002). Diferentes cepas de los géneros *Paenibacillus*, *Bacillus* y *Mycobacterium* son a su vez capaces de aumentar el crecimiento del maíz, así como absorber nutrientes para la planta en suelos con déficit de nutrientes (Egamberdiyeva 2007).

Los beneficios que las bacterias pueden ocasionar a la planta llegan hasta el punto de ser capaces de prevenirlas frente a enfermedades o agentes patógenos, por medio de sustancias antibióticas que dichas bacterias son capaces de sintetizar (Arora et al. 2008; Yu et al. 2011; Verma et al. 2011).

### **3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.**

Dentro de las interacciones positivas que acontecen en la rizosfera, las interacciones mutualistas son fundamentales para la ecología y la agricultura. El nitrógeno fijado en la interacción simbiótica entre bacterias del género *Rhizobium* y una leguminosa, proporciona un tercio de la proteína en la dieta humana mundial (Graham y Vance 2003).

La interacción entre los microorganismos del grupo de los rizobia género, con las especies de la familia Fabaceae, es un sistema modelo para entender las bases ecológicas y evolutivas del mutualismo (Kiersi y Denison 2008). La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se establece a través de pasos complejos provocados por el intercambio de señales de inversión y complejos programas de desarrollo, que llevan a la organogénesis de nódulos en las raíces de las leguminosas de acogida y a la diferenciación de los microsimbiontes a bacteroides (van Rhijn y Vanderleyden 1995; Dénarié et al. 1996; Oke y Long 1999).

Esta interacción *Rhizobium*-leguminosa muestra la evidencia de que la inoculación del *Rhizobium* siempre tiene un efecto beneficioso en el crecimiento de la leguminosa (Kaschuk et al. 2010), y de que, el aumento de un huésped compatible, aumenta la abundancia relativa de los rizobios en el suelo (Kuykendall 1989).

El establecimiento de la simbiosis requiere el conocimiento de varios pasos de reciprocidad con intercambio de señales moleculares y complejos programas de desarrollo. Aunque la relación es beneficiosa para ambos participantes, puede parecerse a una interacción patógena, en el cual el organismo eucariota está crónicamente infectado. Sin embargo, la planta huésped puede suprimir sus mecanismos de defensa para mantener una interacción simbiótica con éxito.

Los análisis transcriptómicos han revelado que muchos genes relacionados con las defensas y el estrés, son regulados en la leguminosa hospedadora durante la primera etapa de esta interacción; pero, la mayoría, son posteriormente suprimidos a medida que avanza la simbiosis. Los parámetros de la interacción que maximizan la aptitud para el huésped, no son necesariamente los que maximizan la capacidad simbiote. Un rasgo común de los microorganismos que habitan en la rizosfera, es la capacidad que tienen para sintetizar la hormona vegetal auxina (Patten y Glick 1996), lo cual altera la raíz, pudiendo alterar el fenotipo óptimo de la planta (Friesen et al. 2011).

En el caso de las bacterias, la interacción comienza en la rizosfera con la percepción de señales moleculares de un huésped específico; principalmente flavonoides o isoflavones. Estos, a su vez, interactúan con una proteína reguladora, denominada NodD, que induce un número de genes Nod, seguida por una producción de señales moleculares bacterianas, lipooligosacáridos de quitina, o factores Nod específicos de especies y/o cepas.

### **3.1. Desarrollo radicular y nodulación.**

Las plantas son organismos sésiles, que liberan una serie de señales químicas para interactuar con otros organismos. Tradicionalmente, se pensaba que el sistema de raíces contribuía a anclar la planta al suelo, absorbiendo nutrientes y agua del mismo; pero, además, es una fábrica química que interviene en numerosas interacciones subterráneas. Dentro de estas interacciones, se incluye las asociaciones mutualistas con microorganismos beneficiosos, tales como rizobios, micorrizas, organismos endófitos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR); así como interacciones parasitarias con otras plantas, microbios patógenos e invertebrados herbívoros (Badri et al. 2009).

En general, los nódulos de las leguminosas se forman en las raíces de la planta; si bien, existen casos de formación de nódulos en tallos, como en *Sesbania*. La formación del nódulo fijador depende de un continuo y adecuado intercambio de señales entre los simbioses (Broughton et al. 2000). Este intercambio de señales comienza incluso antes de que los simbioses entren en contacto físico.

Las plantas liberan una enorme cantidad de sustancias químicas, a través de sus raíces, para combatir a los microorganismos patógenos y atraer a los beneficiosos, que pueden formar asociaciones mutualistas en la rizosfera. Estos compuestos incluyen azúcares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos alifáticos, ácidos grasos, esteroides, compuestos fenólicos, enzimas, proteínas, reguladores del crecimiento y metabolitos secundarios. Estos compuestos actúan como quimio-atrayentes y estimulan el crecimiento del *Rhizobium*. Los mutualismos más importantes descritos en la rizosfera son entre plantas, y micorrizas y rizobacterias.

Debido a que los compuestos flavonoides y los factores de nodulación tienen estructuras químicas específicas en función de sus productores, las combinaciones de estas señales moleculares son los principales determinantes de las diferentes combinaciones *Rhizobium*-huésped. Por lo tanto, muchas especies de *Rhizobium* pueden solamente establecer simbiosis con pocas leguminosas hospedadoras.

### **3.2. Interacción molecular *Rhizobium*-leguminosa.**

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se califica como una rizoendosimbiosis mutualista estricta. Es decir, las bacterias por sí solas no son capaces de crear un ambiente anaerobio, porque no disponen de mecanismos propios y es por ello que requieren diferenciarse en bacteroides, rodeados estos por una membrana específica, en el interior de nódulos de las raíces de su leguminosa hospedadora. Aunque tanto la bacteria como el hospedador son capaces de vivir de forma independiente, su interacción beneficia a ambas partes, existiendo con frecuencia una marcada especificidad entre hospedador y hospedante. Es una simbiosis totalmente efectiva en el que se suceden varias etapas, que van desde el reconocimiento y diálogo molecular previo entre la bacteria y el hospedador, hasta finalmente fijar Nitrógeno en el interior celular.

Antes de la formación del nódulo, tanto el macro como el microsimbionte deben reconocerse específicamente entre ellos a través de un complejo mecanismo de intercambio de señales moleculares, desencadenándose el denominado proceso de infección. El siguiente paso es la penetración de la bacteria en el interior del hospedador y para ello puede utilizar diferentes mecanismos de invasión. Puede entrar a nivel intercelular, siendo esta infección independiente de factores de nodulación. O bien puede ser dependiente de factores de nodulación estableciendo la entrada a través de cracks o heridas directamente en la pared celular o bien por medio de canales de infección a través de los pelos radiculares, esta última conocida como infección canónica (Capoen et al. 2010; Madsen et al. 2010).

#### **3.2.1. Diálogo y señalización molecular.**

Las primeras señales que tienen lugar entre la bacteria y la planta, se producen a través de los flavonoides que sintetizan las leguminosas, que son derivados de 2-fenil-1,4-benzopirano y son empleadas por las leguminosas como moléculas señal para iniciar el diálogo con las bacterias circundantes (Perret et al. 2000) (Figura 2). La composición de los flavonoides varía en función de la leguminosa que los sintetiza y desencadena una serie de respuestas específicas en los rizobios circundantes, entre las que se encuentra la quimiotaxis activa hacia la superficie radical (Gulash et al. 1984), así como la inducción de la transcripción de los genes responsables de la nodulación, a través de un regulador transcripcional de la familia LysR, denominado NodD. Este regulador transcripcional activa los genes *nod* que a su vez codifican para una serie de enzimas que forman los Factores de Nodulación (NF) (Gibson et al. 2008).

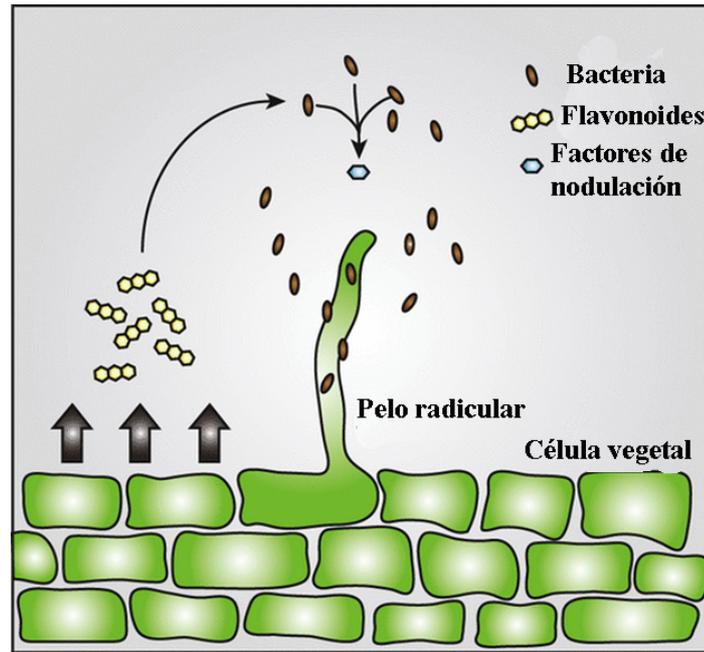


Figura 2. Interacción del rizobio con la leguminosa. La planta secreta flavonoides que inducen a la bacteria a producir factores de nodulación y atraerlos hacia las células de la raíz de la planta y a los pelos radiculares. Imagen adaptada de Haag *et al.* (Haag *et al.* 2013).

Los NF están compuestos por un esqueleto de N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina unido por enlaces  $\beta$ -1,4 y sintetizados por *nodA*, *nodB* y *nodC*, constituyendo el operón *nodABC* (Spaink 2002). La percepción de los NF activa una serie de respuestas en la planta, que se prepara para la invasión del rizobio (Jones *et al.* 2007): se incrementa la diferenciación de células epidérmicas de la raíz de los pelos radiculares, se producen reorganizaciones en los filamentos de actina, oscilaciones nucleares en los niveles de calcio, se produce la deformación de los pelos radicales, la despolarización de la membrana plasmática, se genera una señal oscilatoria de calcio en el ápice y en las proximidades del núcleo, así como el inicio de la división celular en el córtex radical que origina el desarrollo del canal de infección y la diferenciación del primordio nodular (Lerouge *et al.* 1990; Heidstra *et al.* 1994; Ehrhardt *et al.* 1996; Geurts y Bisseling 2002; Gage 2004; Sieberer *et al.* 2009). Pero para que se produzcan todos estos pasos es imprescindible la presencia de la bacteria, con los NF solamente no basta para que finalmente se desarrolle el nódulo.

### 3.2.2. Adhesión y colonización bacteriana.

Los rizobios que se encuentran en la rizosfera son capaces de detectar los flavonoides y otros compuestos que son exudados por las raíces de las leguminosas, que actúan como quimiotácticos atrayendo a la bacteria e iniciando el proceso de colonización de la raíz de la planta (Miller *et al.* 2007).

Una vez que las bacterias entran en contacto con la planta tienen lugar dos procesos. En primer lugar tiene lugar una adhesión reversible de la bacteria, en la que se

han propuesto como factores importantes de su desarrollo diferentes proteínas, entre las que se encuentran las ricadhesinas, las proteínas flagelares y las lectinas (Ausmees et al. 1999; Fujishige et al. 2006; De Hoff et al. 2009). Las ricadhesinas (proteínas bacterianas de unión a calcio o “rhizobial calcium-binding Surface protein”) median la unión polar de células individuales; es decir, esta proteína se une al calcio y a uno de los polos de la bacteria, uniéndose este conjunto a su vez a los pelos radicales de la planta (Smit et al. 1987; Gage 2004). Por otro lado, las lectinas vegetales favorecen la unión de las bacterias al extremo apical de los pelos radicales (Downie 2010). Después de la unión reversible tiene lugar la adhesión irreversible de la bacteria, en la que intervienen diversos polisacáridos, como exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), 1,2- $\beta$ -glucanos y microfibrillas de celulosa (Davey y O’toole 2000). Las microfibrillas de celulosa intervienen en la colonización de la superficie de las raíces, como así se demostró en un estudio realizado con el endosimbionte *Rhizobium leguminosarum* y su planta hospedadora *Trifolium repens* (Mateos et al. 1995). En estudios más recientes se ha demostrado que la celulosa, un polisacárido insoluble, parece jugar un papel clave en la adhesión irreversible de las bacterias a las superficie, constituyendo parte de la matriz en la que se encuentran embebidas las bacterias en los biofilms (Mateos et al. 1995; Robledo et al. 2012).

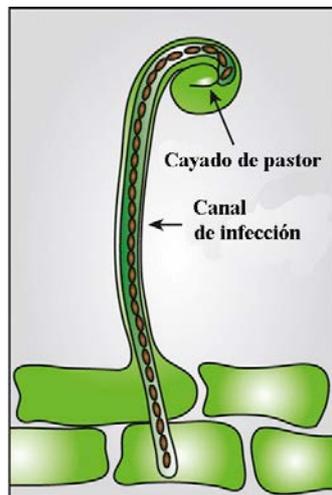
Una vez que el rizobio ha conseguido adherirse con éxito a la superficie radicular de la planta, este debe penetrar en el interior de la misma si quiere conseguir una interacción simbiótica exitosa.

### 3.2.3. Infección primaria.

Tras el contacto con la bacteria, los pelos radicales de la leguminosa comienzan a deformarse primero y a curvarse posteriormente. A esta característica morfológica se la denomina fenotipo Hac (hair curling). Los cambios fisiológicos que se producen durante la fase de adhesión estimulan la deformación del extremo apical del pelo radical (conocido como curling), hasta producirse la completa curvatura del pelo; lo cual se conoce comúnmente como cayado de pastor debido a la similitud morfológica que presenta (Shaw et al. 2000) (Figura 3). Una vez formado el cayado de pastor los rizobios, que están adheridos a la punta del pelo radical, quedan atrapados en una pequeña cavidad. El paso que sigue a continuación es clave, debido a que el rizobio debe penetrar al interior del pelo radical manteniendo la integridad de la célula vegetal; de lo contrario podría abortarse el proceso infeccioso.

Las bacterias van a penetrar al interior del pelo radical por la degradación localizada en el extremo apical del mismo, gracias a la acción de diferentes enzimas como poligalacturonasas, celulasas, hemicelulasas y pectinasas (Robledo et al. 2008; Robledo et al. 2011; Oldroyd et al. 2011). A continuación tiene lugar la formación y desarrollo del canal de infección en el interior del pelo radicular, un compartimento o estructura tubular, creada por la leguminosa, y a través del cual van a discurrir las bacterias en su camino hacia el interior del nódulo (Gage 2004; Brewin 2004) (Figura

3). La estructura de la pared celular del canal de infección está compuesta por pectinas, glucanos y celulosa, es decir, que es similar a la estructura que conforma la pared celular exterior del pelo radical; por lo que técnicamente se dice que el rizobio en su paso por el canal de infección, se encuentra todavía fuera del interior celular vegetal (Rae et al. 1992; Brewin et al. 1994). El ápice del canal de infección es una zona de crecimiento donde se sintetiza nueva pared celular, y es precisamente en esa zona donde los rizobios se dividen. El canal de infección va proliferando a lo largo del pelo radical y a través de las células subyacentes hasta alcanzar el córtex vegetal (Mateos et al. 2011). La proliferación del canal de infección hasta alcanzar el primordio nodular, conlleva la degradación de las paredes vegetales por las que va pasando, para de esta manera poder permitir el paso de las bacterias de una célula a la siguiente. Este proceso de hidrólisis parece que es causado por enzimas hidrolíticas de la planta (Vance 1983), de la bacteria (Mateos et al. 1992; Mateos et al. 2001; Robledo et al. 2008; Robledo et al. 2011) o por ambos, hospedador y rizobio (van Spronsen et al. 1994), pero aún no ha sido esclarecido del todo.



**Figura 3.** La señalización de los factores de nodulación desencadena una cascada de cambios en el desarrollo, incluyendo el enrollamiento del pelo radicular que atrapa a las bacterias en el interior de lo que se denomina cayado de pastor. El crecimiento interno de la punta del pelo radicular produce unas estructuras tubulares, conocidas como canales de infección, permitiendo a las bacterias penetrar en las capas celulares del córtex radicular vegetal. . Imagen adaptada de Haag *et al.* (Haag et al. 2013).

#### **3.2.4. Infección secundaria.**

Finalmente el canal de infección llega al primordio nodular, donde las bacterias son liberadas al citoplasma de la célula vegetal (fenotipo Bar: “bacterial release”). En el citoplasma, las bacterias son rodeadas por una membrana peribacteroidea de origen vegetal, diferenciándose en bacteroides y formando un nuevo orgánulo denominado simbiosoma (Brewin 1991). El simbiosoma se encuentra rodeado por la membrana peribacteroidea, manteniendo el límite entre la bacteria y el citoplasma de la célula vegetal, permitiendo el intercambio de nutrientes y señales entre ambos, endosimbionte y hospedador (Robertson y Lyttleton 1984).

La diferenciación de los bacteroides conlleva cambios bioquímicos, morfológicos, así como la inducción del sistema enzimático nitrogenasa fijador de nitrógeno, gracias al cual se llevará a cabo la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, asimilable por la planta. El amonio se asimila mediante la formación de glutamina y es transportado a la planta en forma generalmente de asparaguina o alantoina. Para que la simbiosis se desarrolle con éxito es muy importante el equilibrio entre el intercambio de metabolitos entre el hospedador y el rizobio. Si se produjera alguna alteración, ocasionada por alguno de los dos simbiosomas, se podría producir una acidificación del interior del bacteroide, lo cual conduciría a una activación de las hidrolasas, lo que conduciría a la muerte del simbiosoma y por, ende, a la senescencia del nódulo (Brewin 1991).

El ADN genómico del huésped se replica en las células vegetales invadidas sin la mitosis. Las células infectadas se convierten en grandes células poliploides que albergan miles de simbiosomas. Los nódulos maduros fijan nitrógeno activamente, durante un período de tiempo que depende de las condiciones del medio ambiente y del desarrollo de la planta, para después entrar en senescencia (Saeki, 2011).

La mayoría de los nódulos tienen una vida útil limitada, en la que la terminación de la simbiosis es un proceso gradual controlado. Además, la senescencia de los nódulos y de las hojas tiene un programa genético común, como se muestra en los solapamientos de sus perfiles transcriptómicos (Van de Velde, *et al.*, 2006). La senescencia de los nódulos puede ocurrir en diversas etapas del desarrollo de la leguminosa; pero también hay que destacar que el medio ambiente interviene en su activación.

Por último, el fallo de los rizobios para infectar correctamente a las células en el desarrollo de los nódulos, conduce a su degradación en un proceso que se asemeja a la senescencia. La biliverdina, un producto catabólico de la leg-hemoglobina, es un marcador fiable del curso de la senescencia, que vuelve los nódulos de color verde. Un exámen ultra-estructural de estos nódulos senescentes revela una degeneración de los tejidos. La degradación de las células infectadas libera bacteroides al suelo, donde algunos se presume que vuelven a un estilo de vida saprofítico (Muller, *et al.*, 2001; Timmers, *et al.*, 2000).

### **3.2.5. Tipos de nódulos en leguminosas.**

Dependiendo de si el primordio nodular tiene su origen en el córtex interno o en el córtex externo de la raíz, las células meristemáticas mantendrán o no su actividad mitótica durante el desarrollo del nódulo. Estas diferencias determinan la estructura y la morfología del nódulo maduro, pudiéndose clasificar en dos tipos: nódulos indeterminados y nódulos determinados (Figura 4), (Sanjuán Pinilla 2001).

Los nódulos indeterminados se originan en el primordio nodular formado en la corteza interna de la raíz, próxima al polo xilema. Además, estos nódulos poseen un meristemo persistente y alargado que se convierte en cilíndrico para que las formas meristemáticas de la zona próxima al ápice y las sucesivas zonas formadas para la invasión de los rizobios activen la fijación de nitrógeno y la senescencia. Las células hospedadoras que se encuentran en la zona de fijación de nitrógeno (Figura 2, i'III) contienen simbiosomas maduros, de los cuales uno generalmente se encuentra engrandecido. Es un bacteroide deformado con baja viabilidad reproductiva. En la zona de senescencia (Figura 4, i'IV) tiene lugar la descomposición o desintegración de los simbiosomas (Kijne 1975; Oke y Long 1999; Mergaert et al. 2006).

En consecuencia, un nódulo indeterminado se adapta a una población heterogénea de células rizobiales, en diversos estados de desarrollo, en distintas zonas. En contraste, los nódulos determinados se originan en los primordios formados en la corteza media o externa de la raíz. En comparación con los nódulos indeterminados, los nódulos determinados no tienen un meristemo persistente, convirtiéndose así en globulares, y los simbiosomas maduros contienen múltiples bacteroides de tamaño normal con alta viabilidad reproductiva (Gresshoff y Rolfe 1978; Sutton y Paterson 1980; Sutton y Paterson 1983).

En un nódulo determinado, las etapas de desarrollo del hospedador y de las células rizobiales están relativamente sincronizadas. La senescencia de nódulos determinados comienza en el centro del nódulo y se extiende a la periferia (Puppo et al. 2004). Las células rizobiales liberadas desde la descomposición y la desintegración de los nódulos, entran en un estilo de vida saprofito.

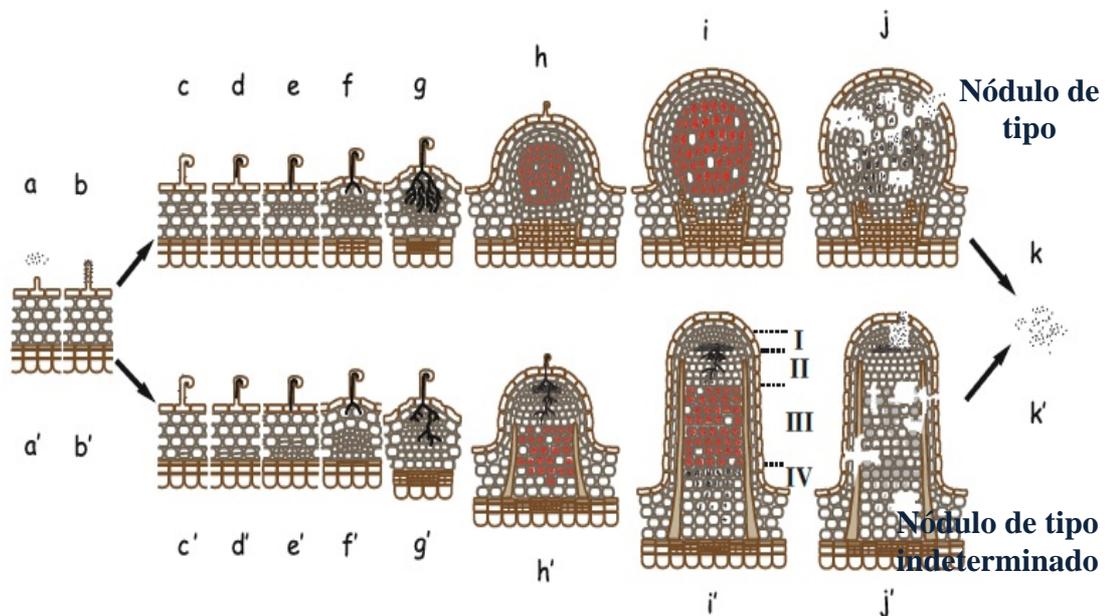


Figura 4. Desarrollo de la nodulación de nódulos determinados e indeterminados. Imagen recogida de Kazuhiko Saeki, 2011. a/a') Los *Rhizobios* pueden existir en la rizosfera como saprófitos que se alimentan de restos y compuestos orgánicos, liberados de las raíces (Morgan, J.A.Q. *et al.*, 2005). b/b') Los *Rhizobios* se adhieren a los pelos radiculares. c/c') Detectan los flavonoides de las leguminosas y secretan factores de nodulación para inducir la deformación del pelo radicular. d/d') El pelo radicular deformado atrapa a los *Rhizobios* y se invagina para formar hilos de infección, en los cuales quedan atrapadas las células rizobiales. e/e') Los hilos de infección se alargan. f/f' y g/g') Los hilos de infección se ramifican y penetran en las capas de la corteza exterior e interior de las células. h/h') Las células rizobiales son entonces envueltas en una membrana de origen vegetal y se liberan como gotas en el citosol de las células vegetales. i/i') Los *Rhizobios* liberados se diferencian en bacteroides y comienzan a fijar nitrógeno. j/j') Después de un periodo de fijación de nitrógeno, cuya duración depende del desarrollo de la planta y de las condiciones ambientales, las células nodulares inician la senescencia. k/k') La mayoría de los bacteroides de nódulos determinados y algunas células rizobiales indiferenciadas en nódulos indeterminados vuelven a un estilo de vida saprofítico. Sin embargo, una fracción de *Rhizobios* indiferenciados permanece dentro de los nódulos, siendo capaces de dividirse y, por lo tanto, volver a un estilo de vida libre en la rizosfera (Paau *et al.* 1980). i' I) Zona meristemática. i' II) Zona de invasión. i' III) Zona de fijación de nitrógeno. i' IV) Zona de senescencia liberada.

En la tabla 1 podemos ver un resumen de las principales diferencias existentes entre los dos tipos de nódulos: determinados e indeterminados.

Tabla 1. Diferencias representativas entre nódulos de tipo determinado e indeterminado. Tabla adaptada de Saeki, 2011.

Propiedad	Nódulos indeterminados	Nódulos determinados
Ejemplos de leguminosas	<i>Medicago sativa</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Astragalus sinicus</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Lotus japonicus</i>
Forma normal del nódulo	Cilíndrica/ramificada	Esférica/globular
Sitio inicial de la división celular	Cortex interno de la raíz	Cortex medio o externo
Tipo de meristemo	Meristemo persistente	Meristemo no persistente
Hilo de infección	Amplio	Estrecho
Células infectadas	Altamente vacuolizadas	Vacuolización mínima
Forma bacteroide mayor	Ampliada, ramificada; uno por simbiosoma	Tamaño de varilla normal, alta viabilidad; varios por simbiosoma
Acumulación de Polihidroxitilato	Presente	Ausente
Reproductividad de los bacteroides	Baja	Alta

### 3.3. Especificidad de bacterias asociadas a nódulos.

Debido a que los rizobios pueden existir como saprófitos en el suelo, el reconocimiento mutuo de dos simbiosomas se inicia cuando las células rizobiales perciben señales moleculares de huéspedes específicos, que son desprendidas a la rizosfera por las raíces de las leguminosas (Saeki 2011).

Como se ha mencionado con anterioridad, los flavonoides juegan un papel clave en los primeros eventos de señalización en las interacciones *Rhizobium*-leguminosa. La rizosfera de las leguminosas químicamente atrae a los *Rhizobios* por secreción de flavonoides y compuestos relacionados. Posteriormente, la proteína NodD de los *Rhizobios*, que percibe flavonoides específicos a través de uno o de dos componentes del sistema regulador, inicia la transcripción de genes Nod que codifican el mecanismo biosintético para una señal bacteriana, el factor Nod (Bradi, *et al.*, 2009).

En proporción, son muchos más los rhizobios que viven en la rizosfera de la planta, que el número de nódulos formados, lo cual origina una competencia por la nodulación y la posibilidad de elección de una pareja y/o mecanismos de selección. La competencia por la nodulación es poco conocida a nivel molecular, en comparación con el conocimiento que se tiene acerca del desarrollo individual de las bases moleculares de los nódulos (Jones *et al.* 2007; Oldroyd y Downie 2008).

Varias propiedades características de los rhizobios, se han relacionado con la competitividad de la nodulación; como son: alteración en los niveles hormonales de las plantas, especialmente los aminoácidos y los ácidos orgánicos (Wielbo et al. 2007), así como los rhizopines (Murphy et al. 1995); la producción de moléculas de antibióticos, por ejemplo trifolitoxin (Robleto et al. 1998) y la motilidad y la adherencia (Malek 1992; Lodeiro et al. 2000).

La interacción *Rhizobium*-leguminosa es altamente específica, lo que significa que en general cada especie bacteriana se establece en simbiosis con uno o pocos géneros o especies vegetales; sin bien, existen ejemplos de bacterias con amplio rango de hospedador, capaces de nodular a un elevado número de géneros de leguminosas. Algunas especies vegetales, por ejemplo *Phaseolus*, pueden ser noduladas por distintas especies de bacterias. Aunque pueda parecer que no existe una aparente correlación entre especie bacteriana y planta hospedadora, la especificidad del hospedador viene determinada por el tipo de moléculas señal producidas por cada pareja bacteria-planta (Dénarié et al. 1996).

A continuación se muestra distintas bacterias pertenecientes a la clase  $\alpha$ -proteobacterias y  $\beta$ -proteobacterias asociadas a plantas de la familia *Fabaceae* (Tablas 2, 3 y 4).

**Tabla2. Taxonomía rhizobiana, parte 1. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Enero 2017.**

Familia Rhizobiaceae, Orden Rhizobiales, $\alpha$ -Proteobacterias			
Género	Especie	Hospedador	Referencias
<i>Rhizobium</i> (Frank, 1889)	<i>R. acidisoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Román-Ponce et al., 2016
	<i>R. aegyptiacum</i>	<i>Trifolium alexandrinum</i>	Shamseldin et al., 2016
	<i>R. altiplani</i>	<i>Mimosa pudica</i>	Baraúna et al., 2016
	<i>R. alamii</i>	rhizosphere of <i>Arabidopsis thaliana</i>	Berge et al., 2009
	<i>R. albus</i>	lake water	Li et al., 2017
	<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu et al., 2009
	<i>R. alvei</i>	freshwater river	Sheu et al., 2015b
	<i>R. anhuiense</i>	<i>Vicia faba</i> , <i>Pisum sativum</i>	Zhang et al., 2015
	<i>R. azibense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mnasri et al., 2014
	<i>R. azooxidifex</i>	soil	Behrendt et al., 2016
	<i>R. bangladeshense</i>	<i>Lens culinaris</i>	Rashid et al., 2015
	<i>R. binae</i>	<i>Lens culinaris</i>	Rashid et al., 2015
	<i>R. calliandrae</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales et al. 2013
	<i>R. capsici</i>	root tumor on <i>Capsicum annum</i> plants	Lin et al., 2015
<i>R. cauense</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Liu et al., 2015	

**Tabla 2 (continuación)**

<b>Rhizobium (Frank, 1889)</b>	<i>R. cellulosityticum</i>	sawdust of <i>Populus alba</i>	García-Fraile <i>et al.</i> , 2007
	<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
	<i>R. daejeonense</i>	cyanide treatment bioreactor	Quan <i>et al.</i> , 2005
	<i>R. ecuadoreense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2015
	<i>R. endolithicum</i>	beach sand	Parag <i>et al.</i> , 2013
	<i>R. endophyticum</i>	seeds of <i>Phaseolus vulgaris</i>	López-López <i>et al.</i> , 2011
	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
	<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian <i>et al.</i> , 2008
	<i>R. favelukesii</i>	<i>Medicago sativa</i>	Torres Tejerizo <i>et al.</i> 2016
	<i>R. flavum</i>	soil	Gu <i>et al.</i> , 2014
	<i>R. freirei</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol <i>et al.</i> , 2013
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>	Lindström, 1989
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. gei</i>	<i>Geum aleppicum stem</i>	Shi <i>et al.</i> , 2016
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. grahamii</i>	<i>Dalea leporina</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Clitoria ternatea</i>	Lopez-Lopez <i>et al.</i> , 2012
	<i>R. halophytocola</i>	seedlings of <i>Anthyllis vulneraria</i>	Grison <i>et al.</i> , 2015
	<i>R. halotolerans</i>	chloroethylenes contaminated soil	Diange and Lee 2013
	<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i> spp., <i>Stylosanthes guyanensis</i> , <i>Centrosema pubescens</i> , <i>Tephrosia candida</i> , <i>Acacia sinuata</i> , <i>Arachis hypogaea</i> , <i>Zornia diphylla</i> , <i>Uraria crinita</i> , <i>Macroptilium lathyroides</i>	Chen <i>et al.</i> , 1997
	<i>R. helanshanense</i>	<i>Spaerophysa salsula</i>	Qin <i>et al.</i> , 2012
	<i>R. helianthi</i>	rhizosphere of sunflower	Wei <i>et al.</i> , 2015
	<i>R. hidalgonense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Yan <i>et al.</i> , 2017
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
	<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i> spp.	Wei <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. ipomoeae</i>	water convolvulus field	Sheu <i>et al.</i> , 2016
	<i>R. jaguaris</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2013
	<i>R. laguerreae</i>	<i>Vicia</i> spp.	Saïdi <i>et al.</i> , 2014
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i>	Frank 1889, Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2008
	<i>R. lemnae</i>	<i>Lemna aequinoctialis</i>	Kittiwongwattana and Thawai 2014
	<i>R. lentis</i>	<i>Lens culinaris</i>	Rashid <i>et al.</i> 2015
<i>R. leucaneae</i>	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro <i>et al.</i> , 2012	
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> spp.	Wei <i>et al.</i> , 2003	
<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus</i>	Eckhardt <i>et al.</i> , 1931	
<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2006	

Tabla 2 (continuación)

<i>Rhizobium</i> (Frank, 1889)	<i>R. marinum</i>	seawater	Liu et al., 2015
	<i>R. mayense</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales et al., 2013
	<i>R. mesoamericanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Mimosa pudica</i>	López-López et al., 2012
	<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia julibrissin</i> , <i>Kummerowia</i> spp., <i>Dalbergia</i> spp.	Lin et al., 2009
	<i>R. metallidurans</i>	seedlings of <i>Anthyllis vulneraria</i>	Grison et al., 2015
	<i>R. miluonense</i>	<i>Lespedeza chinensis</i>	Gu et al., 2008
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum et al., 1998
	<i>R. multihospitium</i>	<i>Lotus</i> spp., <i>Alhagi</i> spp., <i>Astragalus</i> spp., <i>Halimodendron halodendron</i> , <i>Oxytropis</i> spp., <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Sophora alopecuriodes</i> , <i>Caragana jubata</i> , <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Vicia hirsuta</i>	Han et al., 2008
	<i>R. naphthalenivorans</i>	sediment of a polychlorinated-dioxin-transforming microcosm	Kaiya et al., 2012
	<i>R. oryzae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Glycine max</i>	Peng et al., 2008
	<i>R. oryzicola</i>	rice roots	Zhang et al., 2015a
	<i>R. oryziradicis</i>	rice roots	Zhao et al., 2016
	<i>R. pakistanense</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Khalid et al., 2015
	<i>R. paranaense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol et al. 2014
	<i>R. petrolearium</i>	oil-contaminated soil	Zhang et al., 2012
	<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> , <i>Trifolium</i>	Ramirez-Bahena et al., 2008
	<i>R. phenanthrenilyticum</i>	petroleum residue treatment system	Wen et al., 2011
	<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Ramirez-Bahena et al., 2008
	<i>R. pongamiae</i>	<i>Pongamia pinnata</i>	Kesari et al., 2013
	<i>R. populi</i>	<i>Populus euphratica</i>	Rozahon et al., 2014
	<i>R. puerariae</i>	<i>Pueraria candollei</i>	Boonsongcheep et al., 2015
	<i>R. pusense</i>	rhizosphere of <i>Cicer arietinum</i>	Panday et al., 2011
	<i>R. qilianshanense</i>	<i>Oxytropis ochrocephala</i>	Xu et al., 2013
	<i>R. rhizoryzae</i>	<i>Oryza sativa</i> roots	Zhang et al., 2014
	<i>R. rosettiformans</i>	hexachlorocyclohexane dump site	Kaur et al., 2011
	<i>R. selenitireducens</i>	bioreactor	Hunter et al., 2008
	<i>R. smilacinae</i>	<i>Smilacina japonica</i>	Zhang et al., 2014b
	<i>R. soli</i>	soil	Yoon et al., 2010
	<i>R. sophorae</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao et al., 2015
	<i>R. sophoriradicis</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao et al., 2015

**Tabla 2 (continuación)**

<b><i>Rhizobium</i></b> <b>(Frank, 1889)</b>	<i>R. sphaerophysae</i>	<i>Sphaerophysa salsula</i>	Xu <i>et al.</i> , 2012
	<i>R. straminoryzae</i>	rice straw	Lin <i>et al.</i> , 2014
	<i>R. subbaraonis</i>	beach sand	Ramana <i>et al.</i> , 2013
	<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini <i>et al.</i> , 2002
	<i>R. taibaishanense</i>	<i>Kummerowia striata</i>	Yao <i>et al.</i> , 2012
	<i>R. tarimense</i>	soil	Turdahon <i>et al.</i> 2013
	<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou <i>et al.</i> , 2009
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> ,, <i>Leucaena leucocephala</i>	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
	<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2011
	<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia</i>	Young, <i>et al.</i> , 2001
	<i>R. vallis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Indigofera spicata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2011
	<i>R. vignae</i>	<i>Vigna radiata</i> , <i>Desmodium microphyllum</i> , <i>Astragalus spp.</i>	Ren <i>et al.</i> , 2011
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla varia</i> , <i>Gueldenstaedtia multiflora</i> , <i>Amphicarpaea trisperma</i>	Tan <i>et al.</i> , 2001
<b><i>Ensifer</i></b> <b>(Casida 1982)</b>	<i>E. adhaerens</i>	Soil	Young, 2003
	<i>E. alkalisoli</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	Li <i>et al.</i> , 2016
	<i>E. americanus</i>	<i>Acacia spp.</i>	Toledo <i>et al.</i> , 2003, Wang <i>et al.</i> 2013, Oren and Garrity 2015a
	<i>E. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999, Young 2003
	<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla and Elkan 1984, Jarvis <i>et al.</i> 1992, Young 2003
	<i>E. garamanticus</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Argyrolobium uniflorum</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
	<i>E. glycinis</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Astragalus mongholicus</i>	Yan <i>et al.</i> 2016
	<i>E. kostiensis</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>	Nick <i>et al.</i> , 1999, Young 2003
	<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei <i>et al.</i> , 2002, Young 2003
	<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996, Young 2003
	<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	Dangeard (1926), de Lajudie <i>et al.</i> (1994), Young (2003)
	<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. morelensis</i>	associated to nodules <i>Leucaena leucocephala</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002, Wang <i>et al.</i> , 2013, Oren and Garrity 2015

Tabla 2 (continuación)

<i>Ensifer</i> (Casida 1982)	<i>E. numidicus</i>	<i>Argyrolorium uniflorum</i> , <i>Lotus creticus</i>	Merabet <i>et al.</i> , 2010
	<i>E. psoraleae</i>	<i>Psoralea corylifolia</i> , <i>Sesbania cannabina</i>	Wang <i>et al.</i> 2013
	<i>E. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994, Young 2003
	<i>E. sesbaniae</i>	<i>Sesbania cannabina</i> , <i>Medicago lupulina</i>	Wang <i>et al.</i> 2013
	<i>E. sojae</i>	<i>Glycine max</i>	Li <i>et al.</i> , 2011
	<i>E. terangaie</i>	<i>Acacia</i> spp. <i>Sesbania</i> spp.	de Lajudie <i>et al.</i> , 1994, Young 2003
<i>Neorhizobium</i> (Mousavi <i>et al.</i> , 2015)	<i>N. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu <i>et al.</i> 2009, Mousavi <i>et al.</i> , 2014
	<i>N. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i>	Lindstrom 1989, Mousavi <i>et al.</i> , 2014
	<i>N. huautlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>	Wang <i>et al.</i> 1998, Mousavi <i>et al.</i> 2014
<i>Allorhizobium</i> (Lajudie <i>et al.</i> , 1998)	<i>A. borbori</i>	activated sludge	Zhang <i>et al.</i> 2011, Mousavi <i>et al.</i> 2015
	<i>A. oryzae</i>	roots of <i>Oryza alta</i>	Peng <i>et al.</i> 2008, Mousavi <i>et al.</i> 2015
	<i>A. paknamense</i>	<i>Lemna aequinoctialis</i> tissues	Kittiwongwattana and Thawai 2013, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>A. pseudoryzae</i>	rhizosphere of <i>Oryza sativa</i>	Zhang <i>et al.</i> 2011, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>A. taibaishanense</i>	<i>Kummerowia striata</i>	Yao <i>et al.</i> , 2012, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie <i>et al.</i> , 1998, Young <i>et al.</i> , 2001, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>A. vitis</i>	tumours on <i>Vitis vinifera</i>	Ophel and Kerr 1990, Young <i>et al.</i> , 2001, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
<i>Pararhizobium</i> (Mousavi <i>et al.</i> , 2015)	<i>P. capsulatum</i>	surface lake water	Kaur <i>et al.</i> , 2011, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>P. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>P. herbae</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Oxytropis cashemiriana</i>	Ren <i>et al.</i> , 2011, Mousavi <i>et al.</i> , 2015
	<i>P. polonicum</i>	galls of <i>Prunus</i> rootstocks	Puławska <i>et al.</i> , 2016
	<i>P. sphaerophysae</i>	<i>Sphaerophysa salsula</i>	Xu <i>et al.</i> , 2011, Mousavi <i>et al.</i> 2015
<i>Sinorhizobium</i> (Chen <i>et al.</i> , 1988)	<i>S. abri</i>	<i>Abrus precatorius</i>	Ogasawara <i>et al.</i> 2003
	<i>S. chiapanecum</i>	<i>Acaciella angustissima</i>	Rincón-Rosales <i>et al.</i> , 2009
	<i>S. indiaense</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Ogasawara <i>et al.</i> , 2003

**Tabla 3. Taxonomía rhizobiana, parte 2. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Enero 2017.**

Orden Hyphomicrobiales, $\alpha$ -Proteobacterias, distintas familias			
Género	Especie	Hospedador	Referencias
<i>Mesorhizobium</i> (Jarvis et al., 1997)	<i>M. abyssinicae</i>	<i>Acacia abyssinica</i>	Degefu et al. 2013
	<i>M. acaciae</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Zhu et al., 2015
	<i>M. albiziae</i>	<i>Albizia</i>	Wang et al., 2007
	<i>M. alhagi</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., 2010
	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., 2002
	<i>M. australicum</i>	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al., 2009
	<i>M. calcicola</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al., 2015
	<i>M. camelthorni</i>	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al., 2011
	<i>M. cantuariense</i>	<i>Sophora microphylla</i>	De Meyer et al. 2015
	<i>M. caraganae</i>	<i>Caragana</i> sp.	Wang et al., 2007
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>	Velazquez et al., 2001
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis et al., 1997
	<i>M. erdmanii</i>	<i>Lotus</i> spp.	Martínez-Hidalgo et al. 2015
	<i>M. gobiense</i>	<i>Astragalus filicaulis</i> , <i>Lotus</i> spp., <i>Oxytropis glabra</i> ,	Han et al., 2008
	<i>M. hawassense</i>	<i>Sesbania sesban</i>	Degefu et al. 2013
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al., 1991, Jarvis et al., 1997
	<i>M. jarvisii</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al. 2015
	<i>M. kowhaii</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. 2016
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et al., 1997
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Jarvis et al., 1997
	<i>M. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal et al., 2009
	<i>M. muleiense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang et al., 2012
	<i>M. newzealandense</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al., 2016
	<i>M. olivaresii</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Lorite et al., 2016
	<i>M. opportunistum</i>	<i>Biserrula pelecinis</i>	Nandasena et al., 2009
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia</i> spp., <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Chamaecrista ensiformis</i> , <i>Leucaena</i> spp.	de Lajudie et al., 1998
	<i>M. qingshengii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng et al. 2013
	<i>M. robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou et al., 2010
	<i>M. sangaii</i>	<i>Astragalus</i> spp.	Zhou et al. 2013
	<i>M. sediminum</i>	deep-sea sediment	Yuan et al., 2016
<i>M. septentrionale</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004	

Tabla 3 (continuación)

<i>Mesorhizobium</i> (Jarvis et al., 1997)	<i>M. shangrilense</i>	<i>Caragana</i> spp.	Lu et al., 2009
	<i>M. shonense</i>	<i>Acacia abyssinica</i>	Degefu et al. 2013
	<i>M. silamurunense</i>	<i>Astragalus</i> spp	Zhao et al., 2012
	<i>M. soli</i>	rhizosphere of <i>Robinia pseudoacacia</i>	Nguyen et al. 2015
	<i>M. sophorae</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al., 2016
	<i>M. tamadayense</i>	<i>Anagyris latifolia</i> , <i>Lotus berthelotii</i>	Ramírez-Bahena et al., 2012
	<i>M. tarimense</i>	<i>Lotus frondosus</i>	Han et al., 2008
	<i>M. temperatum</i>	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al., 2004
	<i>M. thiogangeticum</i>	rhizosphere of <i>Clitoria ternatea</i>	Ghosh and Roy, 2006
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> spp., <i>Sophora alopecuroides</i> , <i>Halimodendron holodendron</i> , <i>Caragana polourensis</i> , <i>Swainsona salsula</i> , <i>Glycine</i> spp.	Chen et al., 1995, Jarvis et al., 1997
	<i>M. waimense</i>	<i>Sophora longicarinata</i>	De Meyer et al. 2015
	<i>M. waitakense</i>	<i>Sophora</i> spp.	De Meyer et al. 2016
<i>Bradyrhizobium</i> (Jordan, 1982)	<i>B. americanum</i>	<i>Centrosema macrocarpum</i>	Ramírez-Bahena et al., 2016
	<i>B. arachidis</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Wang et al., 2013
	<i>B. betae</i>	root tumours on <i>Beta vulgaris</i>	Rivas et al., 2004
	<i>B. canariense</i>	<i>Genista</i> spp	Vinuesa et al., 2005
	<i>B. centrosemae</i>	<i>Centrosema molle</i>	Ramírez-Bahena et al., 2016
	<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune et al., 2011
	<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang et al., 2013
	<i>B. denitrificans</i>	water	Hirsch and Müller 1985, van Berkum et al., 2006
	<i>B. diazoefficiens</i>	<i>Glycine max</i>	Delamuta et al., 2013
	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1993
	<i>B. embrapense</i>	<i>Neonotonia wightii</i> , <i>Desmodium heterocarpon</i>	Delamuta et al., 2015
	<i>B. erythrophlei</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao et al. 2015
	<i>B. ferriligni</i>	<i>Erythrophleum fordii</i>	Yao et al. 2015
	<i>B. ganzhouense</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Lu et al. 2014
	<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang et al., 2012
<i>B. icense</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Durán et al. 2014	

**Tabla 3 (continuación)**

<b>Bradyrhizobium</b> (Jordan, 1982)	<i>B. ingae</i>	<i>Inga laurina</i>	Da Silva <i>et al.</i> 2014
	<i>B. iriomotense</i>	root tumours on <i>Entada koshunensis</i>	Islam <i>et al.</i> , 2008
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan 1982
	<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
	<i>B. kavangense</i>	<i>Vigna subterranea</i> , <i>Arachis hypogaea</i>	Grönemeyer <i>et al.</i> , 2015
	<i>B. lablabi</i>	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Lablab purpureus</i>	Chang <i>et al.</i> , 2011
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
	<i>B. lupini</i>	<i>Lupinus</i> spp.	Peix <i>et al.</i> 2015
	<i>B. manausense</i>	<i>Vigna unguicula</i>	Silva <i>et al.</i> 2014
	<i>B. neotropiale</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Zilli <i>et al.</i> 2014
	<i>B. oligotrophicum</i>	rice paddy soil	Ohta and Hattori 1985 Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2013
	<i>B. ottawaense</i>	<i>Glycine max</i>	Yu <i>et al.</i> , 2014
	<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena <i>et al.</i> , 2009
	<i>B. paxllaeri</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014
	<i>B. retamae</i>	<i>Retama</i> spp.	Guerrouj <i>et al.</i> , 2014
	<i>B. rifense</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune <i>et al.</i> 2014
	<i>B. subterraneum</i>	<i>Vigna subterranea</i> , <i>Arachis hypogaea</i>	Grönemeyer <i>et al.</i> 2015
	<i>B. stylosanthis</i>	<i>Stylosanthes</i>	Delamuta <i>et al.</i> , 2016
	<i>B. tropiciagri</i>	<i>Neonotonia wightii</i> , <i>Desmodium heterocarpon</i>	Delamuta <i>et al.</i> , 2015
	<i>B. valentinum</i>	<i>Lupinus mariae-josephae</i>	Durán <i>et al.</i> , 2014
<i>B. vignae</i>	<i>Vigna subterranea</i> , <i>Arachis hypogaea</i>	Grönemeyer <i>et al.</i> , 2016	
<i>B. viridifuturi</i>	<i>Centrosema pubescens</i>	Helene <i>et al.</i> , 2015	
<i>B. yuanmingense</i>	<i>Lespedeza</i>	Yao <i>et al.</i> , 2002	
<b>Azorhizobium</b> (Dreyfus <i>et al.</i> , 1988)	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus, <i>et al.</i> , 1988. Especie tipo
	<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Souza-Moreira <i>et al.</i> , 2005
	<i>A. oxalatiphilum</i>	macerated petioles of <i>Rumex</i> sp.	Lang <i>et al.</i> , 2013

**Tabla 4. Taxonomía rhizobiana, parte 3. Modificado de Weir, B.S. (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. Fecha actualización: Enero 2017.**

Otros géneros de $\alpha$ y $\beta$ Proteobacteria			
Género	Especie	Hospedador	Referencias
<i>Burkholderia</i> (Gillis <i>et al.</i> , 1995)	<i>B. acidipaludis</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>	Aizawa <i>et al.</i> 2010
	<i>B. andropogonis</i>	<i>Trifolium repens</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Cicer arietinum</i>	Coenye <i>et al.</i> , 2001
	<i>B. cenocepacia</i>	<i>Dalbergia</i> spp	Vandamme <i>et al.</i> 2003
	<i>B. cepacia</i>	<i>Dalbergia</i> spp	Rasolomampianina <i>et al.</i> , 2005
	<i>B. dipogonis</i>	<i>Dipogon lignosus</i>	Sheu <i>et al.</i> , 2015
	<i>B. heleia</i>	<i>Eleocharis dulcis</i>	Aizawa <i>et al.</i> , 2010
	<i>B. rhynchosiae</i>	<i>Rhynchosia ferulifolia</i>	De Meyer <i>et al.</i> 2013
<i>Paraburkholderia</i> (Sawana <i>et al.</i> , 2015)	<i>P. caballeronis</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Martínez-Aguilar <i>et al.</i> , 2013, Sawana <i>et al.</i> , 2014
	<i>P. caribensis</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Liu <i>et al.</i> , 2011, Sawana <i>et al.</i> , 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. diazotrophica</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Sheu <i>et al.</i> , 2013, Sawana <i>et al.</i> 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. dilworthii</i>	<i>Lebeckia ambigua</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2014
	<i>P. kirstenboschensis</i>	<i>Hypocalyptus</i> spp., <i>Virgilia oroboides</i>	Steenkamp <i>et al.</i> , 2015, Dobritsa and Samadpour 2016
	<i>P. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Chen <i>et al.</i> , 2006, Sawana <i>et al.</i> , 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. nodosa</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Chen <i>et al.</i> (2007), Sawana <i>et al.</i> (2014), Oren and Garrity (2015b)
	<i>P. phymatum</i>	<i>Machaerium lunatum</i> , <i>Mimosa</i> spp., <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> , <i>Acacia</i> , <i>Prosopis</i>	Moulin <i>et al.</i> 2001, Vandamme <i>et al.</i> , 2002, Elliott <i>et al.</i> 2007, Talbi <i>et al.</i> 2010, Sawana <i>et al.</i> 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. piptadeniae</i>	<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Bournaud <i>et al.</i> , 2016
	<i>P. ribeironis</i>	<i>Piptadenia gonoacantha</i>	Bournaud <i>et al.</i> , 2016
	<i>P. sabiae</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	Chen <i>et al.</i> 2008, Sawana <i>et al.</i> 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. rhynchosiae</i>	<i>Rhynchosia ferulifolia</i>	de Meyer <i>et al.</i> 2013, Sawana <i>et al.</i> 2014
	<i>P. sprentiae</i>	<i>Lebeckia ambigua</i>	de Meyer <i>et al.</i> , 2013, Sawana <i>et al.</i> 2014, Oren and Garrity 2015
	<i>P. symbiotica</i>	<i>Mimosa</i> spp.	Sheu <i>et al.</i> , 2012, Sawana <i>et al.</i> 2014, Oren and Garrity 2015
<i>P. tuberosum</i>	<i>Aspalathus</i> spp., <i>Cyclopia</i> spp., <i>Macroptilium</i> <i>atropurpureum</i> , <i>Mimosa</i> spp.	Vandamme <i>et al.</i> , 2002, Elliott <i>et al.</i> , 2007, Barrett and Parker 2006, Sawana <i>et al.</i> , 2014, Oren and Garrity 2015	

**Tabla 4 (continuación)**

<i>Phyllobacterium</i> (ex Knösel 1962)	<i>P. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Flores-Félix <i>et al.</i> , 2013
	<i>P. ifriqiyense</i>	<i>Lathyrus numidicus</i> , <i>Astragalus algerianus</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. leguminum</i>	<i>Astragalus algerianus</i> , <i>Argyrolobium uniflorum</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Sánchez <i>et al.</i> 2014
	<i>P. sophorae</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao <i>et al.</i> 2015
	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2005
<i>Phyllobacterium</i> (ex Knösel 1962)	<i>P. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Flores-Félix <i>et al.</i> , 2013
	<i>P. ifriqiyense</i>	<i>Lathyrus numidicus</i> , <i>Astragalus algerianus</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. leguminum</i>	<i>Astragalus algerianus</i> , <i>Argyrolobium uniflorum</i>	Mantelin <i>et al.</i> , 2006
	<i>P. loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i>	Sánchez <i>et al.</i> 2014
	<i>P. sophorae</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao <i>et al.</i> 2015
	<i>P. trifolii</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Valverde <i>et al.</i> , 2005
<i>Ochrobactrum</i> (Holmes <i>et al.</i> 1988)	<i>O. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Imran <i>et al.</i> , 2010
	<i>O. cytisi</i>	<i>Cytisus scoparius</i>	Zurdo-Piñeiro <i>et al.</i> , 2007
	<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus albus</i>	Trujillo <i>et al.</i> , 2005
<i>Methylobacterium</i> (Patt <i>et al.</i> 1976)	<i>M. nodulans</i>	<i>Crotalaria</i> sp.	Jourand <i>et al.</i> , 2004
<i>Microvirga</i> (Kanso and Patel 2003)	<i>M. lupini</i>	<i>Lupinus texensis</i>	Ardley <i>et al.</i> , 2012
	<i>M. lotononidis</i>	<i>Listia angolensis</i>	Ardley <i>et al.</i> , 2012
	<i>M. vignae</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	Radl <i>et al.</i> 2014
	<i>M. zambiensis</i>	<i>Lupinus angolensis</i>	Ardley <i>et al.</i> , 2012
<i>Cupriavidus</i> (Makkar and Casida 1987)	<i>C. necator</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Mimosa caesalpiniaefolia</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Vigna unguiculata</i>	da Silva <i>et al.</i> , (2012)
	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i> sp.	Vandamme and Coenye, 2004
<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2002
	<i>D. yakushimensis</i>	<i>Pueraria lobata</i>	Bautista <i>et al.</i> , 2010
<i>Aminobacter</i>	<i>A. anthyllidis</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Maynaud <i>et al.</i> 2012
<i>Shinella kummerowiae</i>	<i>K. stipulata</i>	<i>Shinella kummerowiae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2008

#### **4. Familia Fabaceae.**

Las leguminosas son consideradas el tercer grupo más diversificado entre las angiospermas y existen en la actualidad alrededor de 18.000 especies y más de 650 géneros, siendo más frecuentes en las regiones templadas y tropicales de la Tierra. Además, las plantas pertenecientes a esta familia muestran una increíble diversidad biológica (Figura 5) (Mabberley 1997; Wojciechowski 2003).

*Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* y *Papilionoideae*, son consideradas por algunos autores como tres subfamilias incluidas dentro de la familia *Leguminosae* (Polhill 1981). Sin embargo, otros autores consideran a estos tres grupos como tres familias independientes (*Mimosaceae*, *Caesalpiaceae* y *Fabaceae*), pertenecientes al orden Fabales (Cronquist 1988).

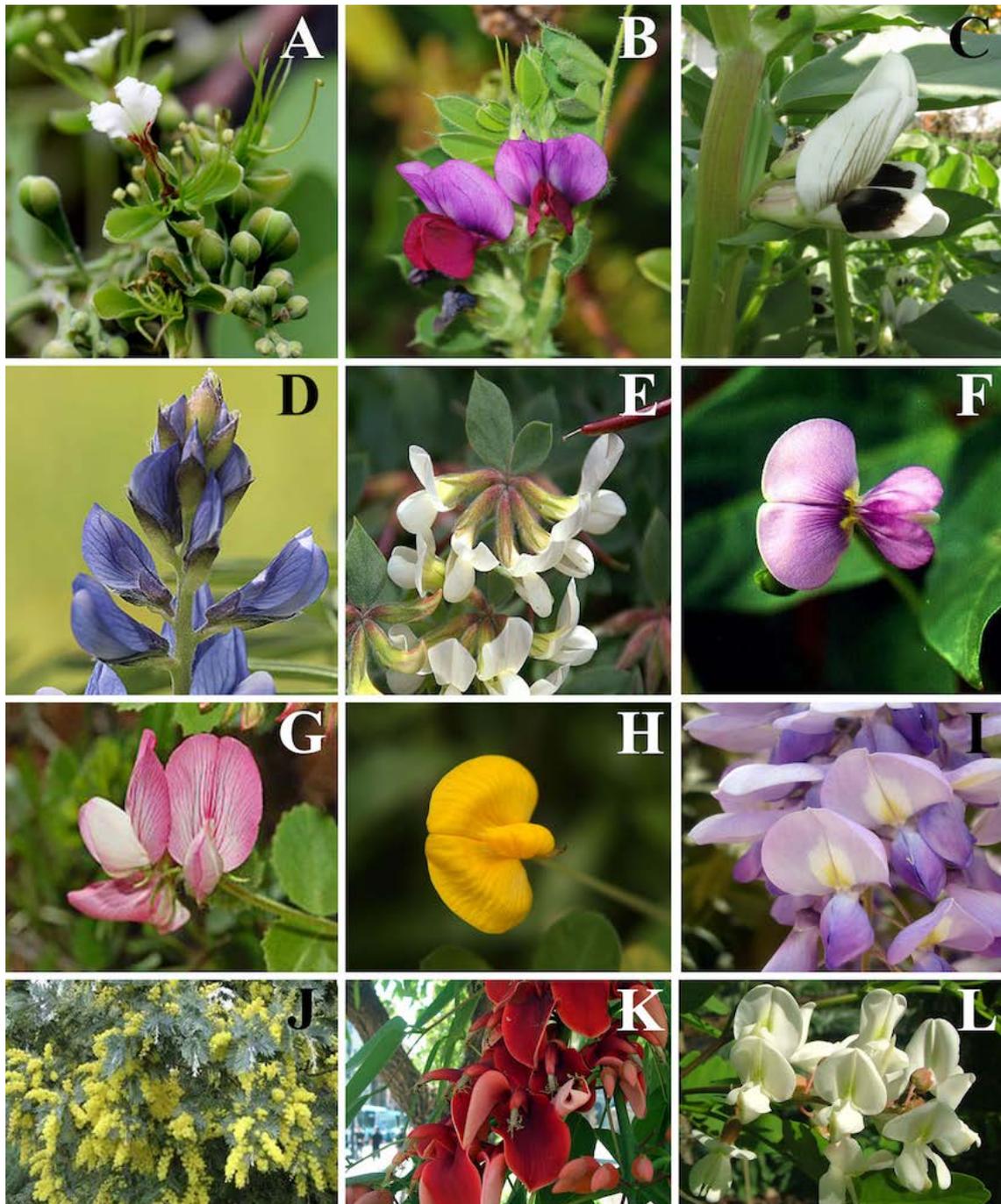


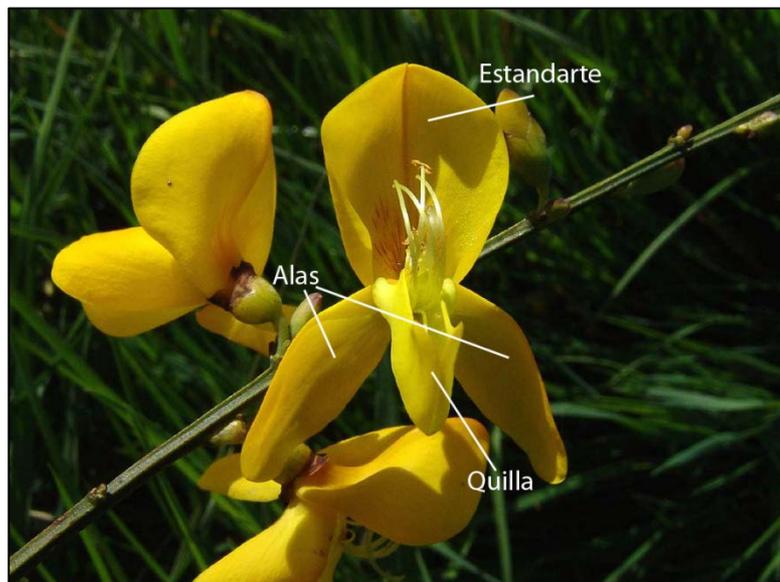
Figura 5. Composición de imágenes. a) *Azfelia africana*. b) *Vicia april*. c) *Vicia faba*. d) *Lupinus angustifolius*. e) *Lotus grandiflorus*. f) *Phaseolus vulgari*. g) *Ononis rotundifolia*. h) *Arachys hipogea*. i) *Wisteria sinensis*. j) *Acacia dealbata* Var. *subalpina*. k) *Erythrina crista-galli*. l) *Robinia pseudacacia*.

Las subfamilias *Mimosoideae* y *Caesalpinoideae* están compuestas, principalmente, por árboles, arbustos y enredaderas, pero de pocas hierbas. Contienen muchas especies que tienen valor como ornamentales o por su madera, tintes, resinas y propiedades medicinales. Estas subfamilias son especialmente abundantes en los bosques lluviosos tropicales, donde fijan grandes cantidades de nitrógeno.

La tercera subfamilia, *Papilionoidae*, contiene muchas especies de importancia agrícola en las regiones templadas y tropicales. Son una fuente de alto valor nutricional para los seres humanos y animales, utilizándose también como cobertura del suelo en las plantaciones y en los suelos erosionados y como abono verde.

En conjunto, la familia *Fabaceae* es la segunda en importancia económica, después de la familia *Poaceae*.

Son plantas con hojas compuestas, raramente simples, con estípulas muy destacadas y muchas veces con zarcillos o filamentos. A veces, están reducidas a espinas. Las flores se agrupan en racimos. Cinco sépalos unidos conforman el cáliz. La corola está formada típicamente por cinco pétalos libres, es decir, es pentámera; también denominada amariposada o papilionada. El pétalo superior envolvente se denomina estandarte o vexilo; dos laterales están libres y constituyen las alas; los dos pétalos inferiores son concrecentes (parcialmente soldados) y forman la quilla o carena (Figura 6).



**Figura 6. Estructura de la corola Papilionácea.**

Generalmente poseen 10 estambres soldados que forman un tubo, envolviendo al carpelo. La parte reproductiva femenina la componen un carpelo y un ovario súpero. El fruto característico de estas plantas es una legumbre dehiscente.

La mayoría de especies de leguminosas sacan provecho de la simbiosis de la raíz con hongos micorrícicos, un rango compartido con casi el 90% de los taxones de plantas. Sin embargo, las especies de leguminosas se caracterizan por su capacidad de establecer interacciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno (Mabberley 1997; Hirsch et al. 2001; Wojciechowski 2003; Doyle y Luckow 2003; Pajuelo et al. 2007). Razón por la cual muchas legumbres forman nódulos en las raíces para fijar el nitrógeno atmosférico y establecer una relación simbiótica con los rizobios. Dependiendo de la especie en simbiosis que exista con la planta, se forman distintas

variedades de nódulos. Independientemente de si forman nódulos en las raíces, las leguminosas juegan un papel importante en el ciclo del nitrógeno terrestre (Sprent 2001). Estas asociaciones las vuelven más competitivas en los suelos pobres en nutrientes, por lo que son consideradas generalmente como plantas pioneras. Estas ventajas de las leguminosas, estimuló su adopción en la agricultura ancestral, convirtiéndose a posteriori en una parte importante de los sistemas agrícolas sostenibles (Singh et al. 2007).

Las leguminosas de grano y forraje se cultivan en unas 180 millones de Ha, equivalentes al 12-15% de la superficie cultivable de la Tierra. Las forrajeras han sido la base para la producción de leche y carne desde hace siglos (Russelle 2001). Además, su inclusión es fundamental en los infértiles suelos de sabana de los trópicos y subtrópicos.

Las leguminosas se han cultivado por sus semillas o legumbres comestibles, para utilizarlas en forrajes e incluso también como ornamentales. Además se pueden extraer a partir de ellas aceites, tinturas o principios activos medicinales (Talavera y Castroviejo 1991).

Industrialmente, las legumbres tienen muchos usos en la fabricación de plásticos biodegradables, aceites, tintes, y el combustible biodiesel. Las legumbres se utilizan tradicionalmente en la medicina popular, pero también demuestran su importancia en la medicina moderna. Las isoflavonas que se encuentran comúnmente en las leguminosas, se cree que reducen el riesgo de cáncer y el colesterol; y los fitoestrógenos de la soja, están siendo estudiados para su uso en la terapia de reemplazo hormonal postmenopáusica (Graham y Vance 2003). Las legumbres también producen un efecto hipoglucémico cuando se comen, por lo que es un alimento recomendado para los diabéticos (Gepts et al. 2005).

### **4.1. Taxonomía y distribución geográfica del género *Lotus*.**

El nombre (*Lotus*) fue introducido por Linnaeus en 1753 y desde entonces, ha habido varios cambios en las especies delimitadas por este nombre (Arambarri 2000; Allan y Porter 2000).

La mayoría de las especies de *Lotus* son nativas de Europa, Asia, África, Australia y algunas hasta de las islas del Océano Atlántico y Pacífico (Beuselinck y Kirkbride 1999; Degtjareva et al. 2008). Esta distribución mundial es debida, en parte, a la introducción en áreas no nativas por actividades humanas, y su adaptabilidad a diferentes estreses ambientales (Beuselinck y Belesky 1999; Blumenthal y McGraw 1999). El centro principal de diversidad de *Lotus* se ha situado en la región mediterránea (Beuselinck y Kirkbride 1999; Díaz et al. 2005; Degtjareva et al. 2008). En particular, Macaronesia presenta el mayor número de taxones endémicos, con aproximadamente 17 especies, distribuidos principalmente a lo largo de las Islas Canarias (Figura 7). Seis de estos endemismos están actualmente considerados bajo situación crítica y han sido

incluidos en la lista roja de la flora vascular española (Beuselinck y Kirkbride 1999; Allan et al. 2004; Oliva-Tejera et al. 2005; Acebes Ginovés y Oliva Tejera 2007; Hind 2008; Moreno 2010).

El género *Lotus* es uno de los aproximadamente 10 géneros que conforman la tribu Loteae (Polhill 1981; Sokoloff 1998), y el único dentro de la misma que tiene una distribución intercontinental. Los análisis moleculares filogenéticos indican que la tribu Loteae es monofilética y que el género *Lotus* comprende dos clados que corresponden a dos centros de diversidad de especies (Allan y Porter 2000; Allan et al. 2004). El clado que incluye las especies mediterráneas de *Lotus*, también incluye una especie endémica de las Islas Canarias, *Lotus campylocladus*. Por otro lado, las especies norteamericanas occidentales forman dos grupos monofiléticos separados, dentro de los cuales no se incluye ninguna especie macaronésica de la región mediterránea (Allan et al. 2004).

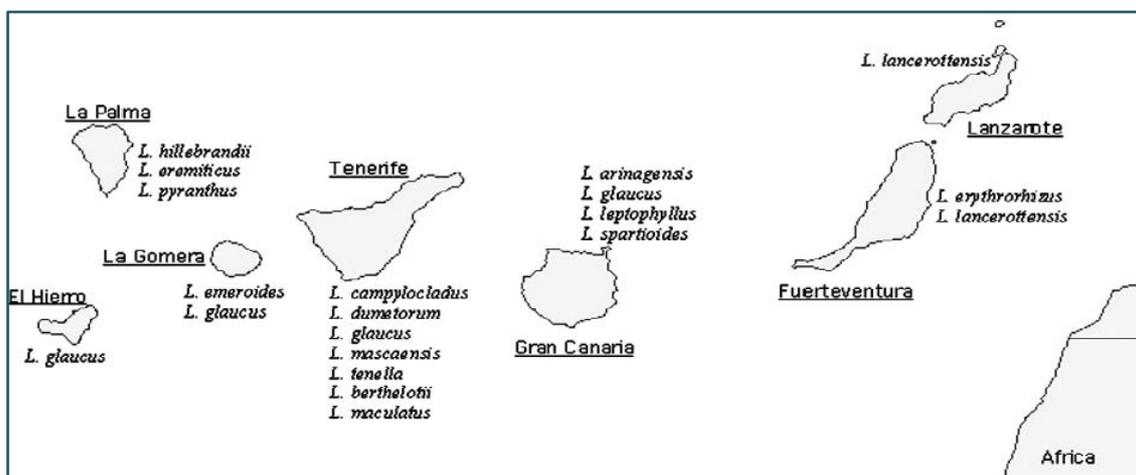


Figura 7. Mapa mostrando la distribución de *Lotus* en las Islas canarias. Imagen recogida de Allan, et al., 2004.

Dentro de la tribu Loteae, el género *Lotus* es el que posee mayor complejidad taxonómica. Esto es en gran parte debido a su alto grado de diversidad morfológica y geográfica, además de ser un género muy grande que, como se ha citado anteriormente, cuenta con dos grandes centros de diversidad situados tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo. Esta diversidad morfológica y biogeográfica ha generado un contencioso debate en lo que se refiere al hecho de si se deben incluir las especies situadas en el Nuevo Mundo dentro del género *Lotus* o, considerarlas en un género distinto, denominado *Hosackia* (Allan y Porter 2000).

En una revisión de las especies pertenecientes al Nuevo Mundo, Ottley (1923) reunió todas las especies de *Lotus* y designó tres subgéneros: *Hosackia* Bentham, *Syrmatium* Vogel y *Acmispon* (Raf.) a su vez, *Acmispon* se subdividió posteriormente en dos secciones, *Microlotus* Bentham y *Simpeteria* Ottley, con el fin de poder diferenciar estos taxones (Ottley, 1944). Posteriormente, Isley (1981) hizo una revisión de estas especies Norteamericanas y distinguió cuatro grupos, tres de los cuales correspondían y coincidían con los tres subgéneros que Ottley designó, más un cuarto,

*Simpeteria*. Más tarde *Simpeteria* fue designada como el género *Ottleya* D.D. Sokoloff (Sokoloff 1998; Allan y Porter 2000).

En el denominado Viejo Mundo, en cambio, *Lotus* está compuesto por varios grupos de especies bien definidas, algunas de las cuales han sido consideradas como géneros. Uno de ellos, *Dorycnium* Miller, está aceptado a nivel de género (Gillett 1958; Ball 1968; Sokoloff 1998). En cambio algunas especies, como el subgénero *Canaria* Rikli han sido incluidas dentro del género *Lotus* (Gillett 1958). Como se ha identificado, *Dorycnium* incluye diez especies, las cuales se encuentran en la región Mediterránea y las Islas Canarias. Otro género identificado, *Tetragonolobus* Scop., algunas veces se incluye como un subgénero dentro del género *Lotus* (Lassen 1986; Greuter et al. 1989), pero esta opinión no es unánime (Isley, 1981). Cuando se identificó, *Tetragonolobus* incluía cinco especies, que se han generalizado en todo el centro y sur de Europa y del Mediterráneo. Además de *Dorycnium* y *Tetragonolobus*, hay aproximadamente otros seis grupos de especies en el denominado Viejo Mundo que han sido identificadas a nivel de género o bien como subgénero dentro del género *Lotus* (Allan y Porter 2000).

Allan y Mark (2000) utilizaron las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS1, 5.8S e ITS2), del ADNr con el fin de evaluar, entre otras cosas, la delimitación biogeográfica del género *Lotus* a la luz de la evolución de la secuencias de ITS (Tabla 5).

**Tabla 5. Datos de muestras de análisis filogenéticos realizados en las regiones ITS1, 5.8S e ITS2, del ADNr del taxón Loteae.**

Taxón/Subgénero	Distribución	
<b>Tribu Loteae</b>	<i>Anthyllis tetraphylla</i> L.*	Cataluña, España.
	<i>A. vulneraria</i> L.*	Islas Británicas
	<i>Dorycnium graecum</i> (L.) Ser.*	Crimea
	<i>D. herbaceum</i> Vill.*	Krasnodar, Rusia
	<i>D. hirsutum</i> (L.) Ser. in DC.*	Pajaut
	<i>D. rectum</i> (L.) Ser.*	Marruecos
	<i>Hymenocarpos circinatus</i> Savi.*	Eurasia
	<i>Tetragonolobus maritimus</i> (L.) Roth*	Estonia
	<i>T. purpureus</i> Moench*	Creta, Grecia
<b><i>Lotus</i> subgénero <i>Acmispon</i> (Raf.) Ottley</b>	<i>Lotus cedrosensis</i> E. Greene*	México
	<i>L. grandiflorus</i> (Benth.) E. Greene	California

Tabla 5 (continuación)

	<i>L. oroboides</i> Ottery ex Kearney&Peebles	Sonora, México
	<i>L. rigidus</i> (Benth.) E. Greene	California
	<i>L. salsuginosus</i> E. Greene	California
	<i>L. strigosus</i> (Nutt.) Greene var. <i>strigosus</i>	California
	<i>L. wrangelianus</i> Fischer & Meyer	California
<b>Lotus subgénero <i>Syrmatium</i> Vogel</b>	<i>L. argophyllus</i> (A. Gray) E. Greene var. <i>adsurgens</i> Dunkle	California
	<i>L. a.</i> var. <i>fremontii</i> (A. Gray) Ottery	California
	<i>L. a.</i> var. <i>niveus</i> (E. Greene) Ottery	California
	<i>L. dendroideus</i> (E. Greene) E. Greene var. <i>dendroideus</i>	California
	<i>L. heermannii</i> (Durand & Hilg.) E. Greene	California
	<i>L. nuttallianus</i> E. Greene	California
	<i>L. scoparius</i> (Nutt.) Ottery var. <i>scoparius</i>	California
<b>Lotus subgénero <i>Hosackia</i> (Benth.) Ottery</b>	<i>L. aboriginus</i> Jepson	California
	<i>L. crassifolius</i> (Benth.) E. Greene var. <i>crassifolius</i>	California
	<i>L. formosissimus</i> Greene*	California
	<i>L. oblongifolius</i> Bentham (Greene) var. <i>oblongifolius</i> *	México
<b>Lotus subgénero <i>Lotus</i> L.</b>	<i>L. collinus</i> (Boiss.) Heldr.*	Algeria
	<i>L. corniculatus</i> L.	California
<b>Lotus subgénero <i>Pedrosia</i> (Lowe) Brand</b>	<i>L. arenarius</i> Brot.* Africa Podl	Marruecos

#### 4.2. Importancia agronómica de especies del género *Lotus*.

La productividad de las plantas es a menudo limitada por la disponibilidad de nutrientes del suelo y se basa en la interfase, la rizosfera, entre las raíces y los suelos. Las propiedades físico-químicas y estructurales de los suelos, incluyendo su desarrollo, han sido muy afectadas por la acción de la rizosfera. Cualquier cambio en la estructura de la comunidad microbiana puede ser causado por la aplicación de los diversos usos

del suelo y sistemas de gestión que conducen al desarrollo de mejores prácticas de gestión para el agroecosistema (Beerling y Berner 2005).

Los efectos beneficiosos de los forrajes de leguminosas en la producción animal se conocen desde hace tiempo (Graham y Vance 2003). Los pastizales que contienen leguminosas tienen alta digestibilidad y cantidad de proteína cruda, menos fibra de detergente neutro y muestran un mayor rendimiento homogéneo, distribuido a lo largo de la temporada de pastos, que están exclusivamente basados en gramíneas (Buxton 1996; Sleugh et al. 2000; Wen et al. 2002; Zemenchik et al. 2002).

Algunas especies de *Lotus* son económicamente importantes, ya que se utilizan como cultivos altamente productivos en sistemas de pastoreos en una amplia gama de paisajes, incluyendo algunos frecuentemente sometidos a ambientes y condiciones del suelo extremas (Blumenthal y McGraw 1999; Díaz et al. 2005)

Desde el punto de vista agrónomo *Lotus corniculatus* (L.), *Lotus uliginosus* (Schkuhr.), *Lotus tenuis* (Waldst et kit.) y *Lotus subbiflorus* (Lagasca) son las especies más importantes. Por otra parte, *Lotus corniculatus* se considera una de las leguminosas forrajeras más importantes después de la alfalfa (*Medicago Sativa*) y del trébol blanco (*Trifolium repens*) (Singh et al. 2007). Los rendimientos obtenidos en cultivos agrícolas de *L. corniculatus* está en rangos de 8000-10000 kg materia seca por ha y año, lo que supone alrededor del 50-80% del rendimiento obtenido en cultivos de alfalfa.

El valor nutricional de las especies de *Lotus* se considera que es similar o incluso superior a las de la alfalfa y el trébol blanco. La digestibilidad de la materia seca de las especies de *Lotus* fluctúa el 72% y el 78%, mientras que la materia seca de la proteína cruda varía entre el 20% y el 24% y el de la fibra ácido detergente varía entre un 24% y un 30% (Cassida et al. 2000).

Una interesante ventaja de las especies de *Lotus* como fuente de forraje es que las plantas pueden ser pastoreadas por el ganado o utilizadas como heno o ensilaje, en contraste con otras leguminosas que no ofrecen estas posibilidades. Sin embargo, poseen también una desventaja y es que en general las plántulas tienen un pobre vigor que las hace ser menos competitivas con las malezas de hoja ancha y gramíneas agresivas (Díaz et al. 2005; Yanet Ixtaina y Merced Mujica 2010)

Por otro lado, las principales zonas donde las especies de *Lotus* son explotadas con fines agronómicos son América del Sur, América del Norte y Europa, con 1,85, 1,39 y 1,38 millones de hectáreas sembradas, respectivamente. El 90% de la superficie sembrada de *Lotus* se concentra en sólo 10 países, donde *L. corniculatus* ocupa el 90% de esta área (Díaz et al. 2005). Sin embargo, en zonas templadas y subtempladas de Argentina, Chile, Uruguay y EE.UU., *L. tenuis* se está utilizando cada vez más para la producción de forraje en un área que se extiende en más de 160.000 de hectáreas sembradas. Por su parte, *L. uliginosus* se siembra en alrededor de 100.000 hectáreas de

Nueva Zelanda y la costa sudeste de Australia; mientras que *L. subbiflorus*, la única especie de *Lotus* de importancia agrícola anual, se siembra principalmente en Uruguay, donde este cultivo alcanza aproximadamente 50.000 hectáreas.

### 4.3. Género *Lotus*: un sistema modelo.

Se estima que aproximadamente el 15% de la superficie total en el mundo se enfrenta a graves problemas de erosión causadas por factores físicos o químicos, entre ellos la salinización del suelo y la contaminación por metales pesados (Wild 2003). La restauración de las tierras perturbadas, por medio de siembra de especies tolerantes, se ha propuesto como una alternativa para hacer frente a las amenazas ambientales. Las plantas introducidas pueden proteger los suelos de la erosión natural y antrópica, y contribuir a la estabilidad a largo plazo del sitio y la productividad (Beuselinck y Belesky 1999; Kosmas et al. 2000). Las características adaptativas que muestran varias especies de *Lotus*, las hacen buenas candidatas para la restauración y la fitorremediación de ambientes degradados (Beuselinck y Belesky 1999). Entre las especies con los potenciales más altos se encuentran *L. creticus*, *L. tenuis*, *L. uliginosus* y *L. corniculatus* (Figura 8).



Figura 8. Especies de *Lotus* que crecen en ambientes marginales. A) *L. creticus* en las dunas costeras mediterráneas de España. B) *L. tenuis* en suelos inundados de la Cuenca del Río Salado de Argentina. C) *L. uliginosus* en suelos contaminados con metales pesados de Estarreja, en Portugal. D) *L. corniculatus* en los suelos salino-alcálinos de Valencia, España. Imagen recogida de Escaray et al., 2010 (Escaray et al. 2010).

*Lotus corniculatus* es una especie distribuida mundialmente que crece bajo una amplia gama de condiciones ambientales. Esta especie es, con toda probabilidad, la

especie de *Lotus* más comúnmente empleada en restauraciones ecológicas de los suelos afectados por la deficiencia de nutrientes, la salinidad, la sequía o los contaminantes (Banuelos et al. 1992; Beuselinck y Belesky 1999; Frick et al. 1999; Papadopoulos y Kelman 1999; Neunhäuserer et al. 2001; Díaz et al. 2005).

El origen de *L. corniculatus* ha sido un tema de controversia (Campos et al. 1994; Grant 1995; Grant y Small 1996; Beuselinck y Grant 1999; Fjellstrom et al. 2001). Algunas teorías apoyan un escenario en el que *L. corniculatus* se originó a partir de un caso de duplicación cromosómica en un ancestro diploide, o en un caso de hibridación entre dos progenitores diploides altamente relacionados. Esta última es la teoría más aceptada, teniendo en cuenta que *L. corniculatus* es una especie alotetraploide (4n); siendo *L. tenuis* el progenitor femenino y *L. uliginosus*, presumiblemente, el progenitor masculino (Gauthier et al. 1997). La gran diversidad observada en los fenotipos de *L. corniculatus* puede ser debida a un entrecruzamiento frecuente y a la formación de híbridos con un alto potencial de adaptación a una amplia variedad de entornos (Gauthier et al. 1997; de los Santos et al. 2001).

*L. corniculatus* presenta de forma natural un alto grado de diversidad genotípica (Steiner 1999). Se ha propuesto que las diferencias en el fenotipo y la fecundidad entre poblaciones geográficamente separadas de *L. corniculatus*, puede dar lugar a diferencias en la supervivencia y la aptitud cuando las semillas se siembran en un entorno de restauración (Smith et al. 2009).

Además, se ha demostrado que los genotipos silvestres de *L. corniculatus* se pueden cruzar con variedades comerciales, utilizando métodos convencionales de cruce (de los Santos et al. 2001). Este hecho, junto con la aparición de una amplia gama de genotipos silvestres (Steiner 1999) y el elevado número de cultivares comerciales registrados (Grant 2004), sugiere que estos materiales vegetales podrían ser utilizados como fuente genética para el desarrollo de nuevas variedades, destinadas a la restauración y producción de forraje en diversos ambientes marginales (Papadopoulos y Kelman 1999; de los Santos et al. 2001).

Por otro lado, *L. creticus* es una especie perenne que muestra una considerable tolerancia a la sequía, en condiciones de salinidad y de viento abrasivo (Sanchez et al. 2011). Por esta razón, se considera una buena alternativa para la revegetación del suelo de ambientes secos y salinos (Beuselinck y Belesky 1999; Escaray et al. 2010). Esta especie ha sido utilizada para fijar las dunas costeras españolas en el Parque Natural Dehesa de la Albufera, de la Comunidad Valenciana. En estas dunas, *L. creticus* juega un papel importante como una especie pionera mediante la mejora de la estructura del suelo y la disponibilidad de inocular simbiontes para promover la sucesión vegetal. Además, *L. creticus* disminuye los efectos de los intensos vientos del Mediterráneo, cumpliendo así una función primordial en la protección y preservación de los ecosistemas (Escaray et al. 2010). Otro uso de esta especie es como forraje en Túnez,

donde la salinidad impone una seria amenaza para la producción del ganado (Mokhtar et al. 2006; Rejili et al. 2008).

Muy pocas especies de interés agrícola son capaces de crecer bajo condiciones combinadas de anegamiento y salinidad (Barrett-Lennard 2003; Rengasamy et al. 2003; Rengasamy 2006). La supervivencia a largo plazo de *L. tenuis*, en condiciones de inundación y salinidad, es mayor que el de otras leguminosas forrajeras (Beuselinck y Belesky 1999; Real et al. 2008; Teakle y Tyerman 2010), incluyendo la tolerancia a la salinidad de *L. corniculatus* (Teakle y Tyerman 2010). Además, *L. tenuis* crece bien a pH 6-9 (Correa et al. 2001), tiene una eficiente utilización de fósforo, establece una asociación simbiótica con *Rhizobium* y con hongos micorrízicos bajo condiciones de saturación de agua (Mendoza et al. 2005) y posee una alta calidad nutricional, incluso cuando se cultivan bajo condiciones de elevada salinidad (Robinson et al. 2004).

Por otro lado se encuentra otra especie de *Lotus*, *L. uliginosus*, tolerante al aluminio (Al). La desintoxicación de Al en plantas de *L. uliginosus* se logra mediante un mecanismo que implica la formación de complejos de Al-proantocianidinas (Stoutjesdijk et al. 2001). *L. uliginosus* tiene un interesante potencial para usos ecológicos y agrícolas en suelos ácidos (Blumenthal y McGraw 1999) y se siembra en el sur de Australia y Nueva Zelanda (Ayres et al. 2008). Bajo esta situación el Al, que es muy abundante en la corteza terrestre, se vuelve soluble y limita el crecimiento de las plantas que son sensibles al Al. De hecho, se considera que la toxicidad del Al es un importante factor limitante del crecimiento para las plantas en la mayoría de suelos ácidos. Por último, *L. uliginosus* presenta una alta tolerancia al exceso de manganeso (Mn) (Blumenthal y McGraw 1999) y es capaz de crecer y nodular, de manera eficiente, en suelos inundados (James y Crawford 1998) o contaminados con mercurio (Hg) y arsénico (As) (Videira et al. 2007).

#### **4.4. *Lotus corniculatus*.**

*Lotus corniculatus*, también conocida como cuernecillo o trébol corniculado o de cuerno, es una planta perenne iterópara, con una raíz profunda, que crecen principalmente en pastizales y matorrales en Europa, Asia y África del Norte (Jones y Turkington 1986).

La regeneración es principalmente por semillas. Tiene de una a cinco inflorescencias, en ocasiones hasta nueve, con flores amarillas (Figura 9). Los polinizadores pertenecen al género *Bombus* (Proctor et al. 1996). Las flores suelen ser visitadas por especies de la familia Lepidóptera, las cuales no entran en contacto con las partes reproductivas.

En las especies del género *Lotus*, al igual que ocurre en otros géneros como *Hippocrepis*, *Vicia* o *Erythria*, existen también nectarios extra florales, que pueden

localizarse en partes muy diferentes de la planta, como por ejemplo en las estípulas (Rodríguez-Riaño et al. 1999).

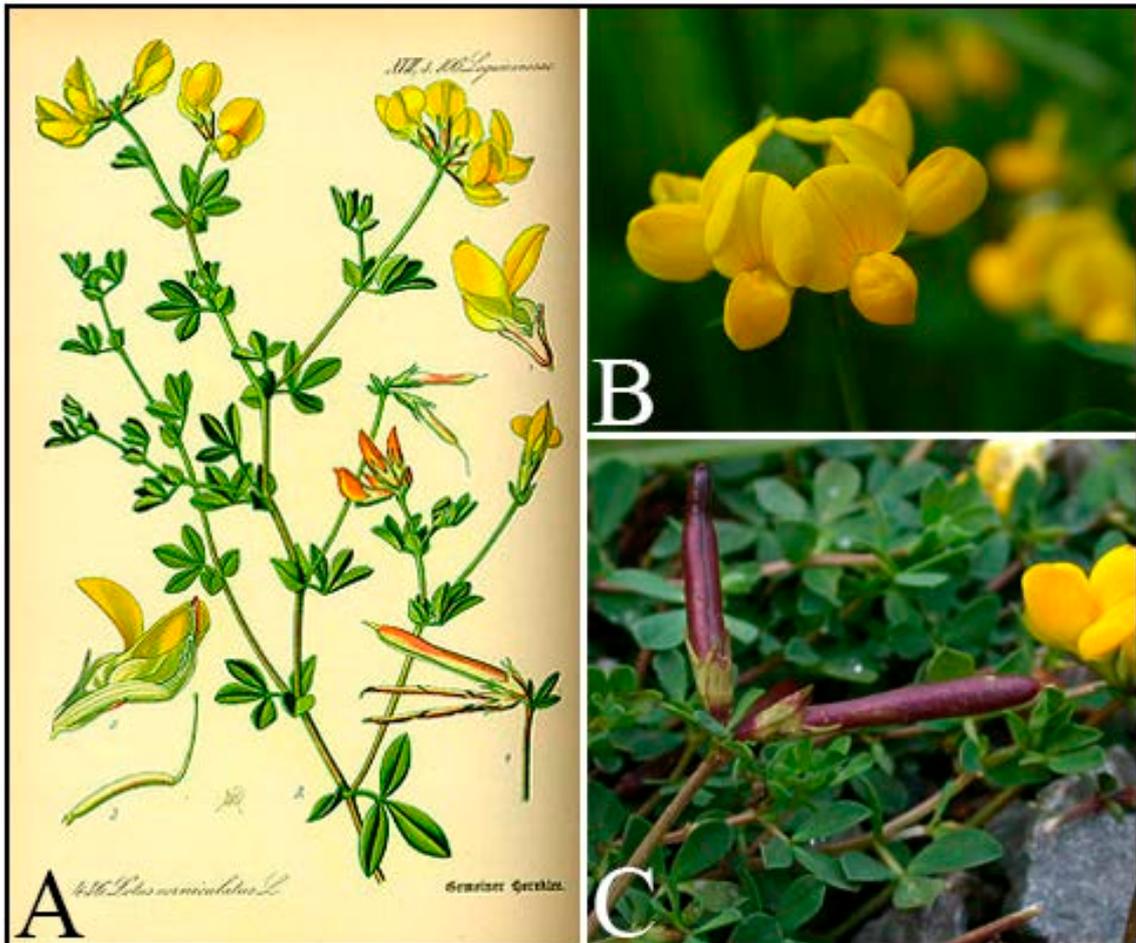


Figura 9. Ilustración de *Lotus corniculatus*. a) Dibujo clásico. b) Detalle flor. c) Semillas.

*L. corniculatus* es una leguminosa originaria de Europa (Williams 1998), sembrada como especie forrajera en la Pampa Deprimida. En esta región, las leguminosas naturales son escasas (Vervoort 1967; León et al. 1979) y la incorporación de esta especie representa una alternativa para incrementar la productividad primaria y la calidad forrajera de los pastizales naturales (Miñón et al. 1990). Esta leguminosa es un importante cultivo forrajero en algunas partes del mundo y se cultiva tanto las variedades primeras de floración, como las tardías (Buzzell y Wilsie 1964).

En las especies del género *Lotus*, el proceso de nodulación ocurre paralelo a la formación de la primera hoja verdadera. Los nódulos miden de 1.5 a 2.0 mm de diámetro y se ubican a lo largo de las raíces principales y secundarias, pudiendo alcanzar 5.0 a 7.0 mm de diámetro (Cerdeira 1996; Williams 1998) La formación de nódulos es óptima a pH 6-6.5. A pH menores este proceso es menos eficiente, formándose pequeños nódulos de corazón blanco (Williams 1998).

*L. corniculatus* posee un hábito de crecimiento erecto y un sistema radicular denso y fibroso en los 30 a 60 cm de suelo (Acuña 1998). Sus nódulos determinados no se regeneran después de un período de stress, requiriendo la planta renodular después que el forraje es cosechado (Ehlke et al. 1996). Mientras que *L. tenuis* y *L. uliginosus* son de hábito de crecimiento postrado; *L. uliginosus* es estolonífera y posee mayor volumen radicular que *L. corniculatus* y *L. tenuis* en los primeros centímetros del perfil de suelo. Se le atribuye una mayor eficiencia en la utilización del P comparado a otras especies de *Lotus*, lo que le permite crecer y formar nódulos aún en condiciones de deficiencia de este elemento (Cerdeira 1996).

#### 4.4.1. Diversidad de bacterias endofíticas de *Lotus corniculatus*.

Entre los microorganismos del suelo con importantes efectos positivos sobre las plantas, las bacterias que nodulan leguminosas son unas de las más estudiadas.

Como se ha mencionado anteriormente, estas bacterias son capaces de fijar nitrógeno atmosférico en estructuras localizadas en raíces específicas, denominadas nódulos. La mayoría de las bacterias que nodulan leguminosas, descritas hasta ahora, conocidas como rizobios, han sido clasificadas dentro del grupo de las Alfa-proteobacterias, dentro del cual se encuentran los géneros: *Rhizobium*, *Ensifer*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Neorhizobium* y *Pararhizobium* (Garrity et al. 2004; Rivas et al. 2009; Mousavi et al. 2015). Algunos autores también incluyen dentro de este grupo los géneros *Devosia* (Rivas et al. 2003) y *Bradyrhizobium* (van Berkum y Eardly 2002).

Conocer la diversidad y la abundancia de los microorganismos que nodulan las especies de *Lotus*, es un enfoque valioso para una mayor selección y aplicación de las cepas como inoculantes. Estas cepas no sólo deben ser eficientes en la fijación del nitrógeno, como ocurre para las especies del género *Rhizobium*, sino que también deben ser capaces de competir favorablemente con los microorganismos nativos de la planta y la rizosfera circundante.

Las especies *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium sp.* son consideradas como los simbiontes típicos de las especies del género *Lotus* (Kaneko et al. 2000). En un estudio realizado por Lorite y sus colaboradores en el año 2010, demostraron que los rizobios nativos de ambientes altamente restrictivos, pueden nodular de manera eficiente cultivos de *Lotus spp.* Entre las distintas cepas aisladas de *Mesorhizobium*, se encuentran las especies *M. tarimense*, *M. tianshanense*, *M. charcoense*, *M. albiziae* y *M. alhagi*.

Una reciente caracterización de rizobios simbiontes de especies de *Lotus* endémicas de las Islas Canarias, han detectado al menos diez especies diferentes de los géneros *Mesorhizobium*, *Ensifer* y *Rhizobium* (Zakhia 2004; Calderón-Vázquez et al. 2009; Lorite et al. 2010).

Por otro lado, estudios realizados en Bélgica, muestran la gran diversidad de rizobios asociados con leguminosas de distintas regiones de dicho País. En este estudio, la especie *Lotus corniculatus* presenta una gran diversidad bacteriana, pero la mayoría se engloba dentro de endosimbiontes clásicos como es el género *Mesorhizobium* (De Meyer et al. 2011).

El endosimbionte natural de *L. corniculatus* fue identificado inicialmente como *Rhizobium loti* (Jarvis et al. 1982), para posteriormente ser reclasificado como *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al. 1997). Un estudio realizado recientemente ha demostrado que la cepa tipo de esta especie estaba guardada en diferentes colecciones de cultivo representando en realidad tres especies diferentes que han sido identificadas como *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015).

## **5. Potencial biotecnológico de la utilización de bacterias.**

En un mundo cada vez más globalizado, con una estimación de 9600 millones de habitantes para el año 2050, hay que buscar alternativas que permitan preservar los recursos naturales de la Tierra y eviten los problemas derivados de su sobreexplotación. En este sentido, la biotecnología ha cobrado fuerza en los últimos años y se plantea como una gran alternativa, debido a que es un área multidisciplinaria que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos, en diferentes áreas como son agricultura, ciencia de los alimentos y forestales, farmacia y medicina entre otras (Convenio sobre la Diversidad Biológica, Artículo 2. Uso de Términos, Naciones Unidas. 1992) (Karl Ereky, 1919).

### **5.1. Celulosa bacteriana.**

La celulosa es uno de los biopolímeros más importantes y más abundantes de la Tierra, constituyendo una parte muy importante del sector económico e industrial por el elevado aprovechamiento tecnológico que presenta. Es un polisacárido estructural de las plantas y como tal, los productores más prolíferos de obtención de celulosa que se conozcan hasta la fecha son los árboles, como diferentes especies de pinos, abetos o álamos, así como diferentes plantas herbáceas, entre las que podemos citar el algodón, el lino, la paja o el bambú. Estas plantas han sido las más utilizadas a lo largo del tiempo desde su descubrimiento hasta la actualidad (Ding y Himmel 2006; Somerville 2006; Fernandes et al. 2011).

La celulosa fue descubierta y aislada inicialmente a partir de materia vegetal en Francia, por el químico Anselme Payen en el año 1838. El compuesto fue utilizado en 1870 por Hyatt Manufacturing Company para crear un material llamado celuloide, que fue utilizado en las técnicas más tempranas de la fotografía. En 1920 la estructura del

polímero fue determinada por Hermann Staudinger y en 1992 se sintetizó con éxito por primera vez en un laboratorio por Kobayashi y Shoda (Le Floch A. et al. 2015). En la actualidad se obtiene principalmente a partir de madera y algodón, o bien se sintetiza en un laboratorio.

En los últimos 30 años, la evolución de la biología molecular y la aplicación de sistemas celulares *in vitro* han dado lugar a una extensa exploración de los mecanismos subyacentes a la biosíntesis de celulosa en la naturaleza (Fu et al. 2013). Uno de estos mecanismos alternativos sería la síntesis de celulosa bacteriana, la cual fue descubierta durante la fermentación del vinagre por A. J. Brown en 1886, pero solo en el pasado reciente su aplicabilidad en campos como la biomedicina se está haciendo realidad (Rajwade et al. 2015).

Aunque la celulosa sea un biopolímero muy abundante en la tierra, es interesante buscar nuevas alternativas en su producción ya que la explotación masiva de los recursos naturales en el siglo pasado, asociado a los problemas de contaminación, ha elevado en un número considerable las preocupaciones ambientales y económicas, y es predecible el agotamiento de estos recursos en un futuro (Carreira et al. 2011).

Como ya hemos señalado, la mayor parte de la celulosa disponible en la tierra es producida por las plantas, pero otros organismos tales como algas, hongos, bacterias y alguna especie animal como los tunicados, son también capaces de producir una forma extra-celular de celulosa (Chavez-Pacheco et al. 2005; Kersters et al. 2006).

En los últimos años la celulosa de origen bacteriano ha ganado importancia debido a sus propiedades mecánicas, pureza, alto grado de cristalinidad y conformación reticulada, que la hacen atractiva en diversas aplicaciones, especialmente en el área de la salud. Aunque su formación fue reportada por primera vez en 1886 por J. Brown, sólo ha sido objeto de atención a partir de la segunda mitad del siglo XX (Jonas y Farah 1998; Bielecki et al. 2005).

La celulosa bacteriana es un polímero producido extracelularmente por bacterias. Los productores más eficientes son las bacterias Gram-negativas del género *Gluconacetobacter*, las cuales se usan como microorganismos modelo en los estudios básicos y aplicados sobre celulosa bacteriana (Hirai et al. 1987; Czaja et al. 2006). Dentro de este género, la especie *Gluconacetobacter xylinus*, anaeróbica, no patógena y en forma de varilla, es por el momento la mejor productora de celulosa que se conoce debido a su capacidad de producir niveles relativamente altos del homopolisacárido a partir de una amplia gama de fuentes de carbono (Shoda y Sugano 2005).

A parte de las bacterias del género *Gluconacetobacter*, hay otros géneros que son también capaces de producirla, como son las bacterias del género *Acanthamoeba*, *Achromobacter*, *Zooglea*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, etc. (Ross et al. 1991; Shoda y Sugano 2005; Jung et al. 2007; Yamada et al. 2012; Lee et al. 2014).

### 5.1.1. Importancia y propiedades del biopolímero.

Los estudios sobre la estructura y las propiedades de la celulosa de origen bacteriano muestran que su composición química es idéntica a la de la celulosa de origen vegetal, aunque difiere significativamente en algunos aspectos como son su conformación estructural y sus propiedades fisicoquímicas (Jung et al. 2007; Keshk 2014), lo que la hace atractiva para diversas aplicaciones, especialmente en las áreas de alimentos, procesos de separación, catálisis y en medicina, gracias a su mayor biocompatibilidad y elevada pureza, lo que la distingue de la celulosa vegetal, que usualmente va asociada a hemicelulosa y lignina (Bielecki et al. 2005).

Otra característica a favor de la celulosa bacteriana, es su alto grado de cristalinidad (mayor al 60 %), que depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, suplementos, temperatura, etc.) (Jonas y Farah 1998; Klemm et al. 2011). Una vez purificada, la celulosa bacteriana es no tóxica, no alergénica, y biodegradable (Dubey et al. 2002). Presenta también mayor grado de polimerización (número de unidades de  $\beta$ -glucosa presentes en una molécula de celulosa) (Klemm et al. 2011), alta resistencia mecánica, y temperaturas de degradación superiores a las de la celulosa vegetal (Keshk 2014). Tiene alta resistencia tensil, mayor resistencia a la tracción, mayor capacidad de retención de agua (material muy hidrófilo) (Chawla et al. 2009), estructura fibrillar ultra-fina, alta estabilidad mecánica y térmica (Klemm et al. 2006), transparencia y moldeabilidad (Klemm et al. 2001; Ishihara et al. 2002; Shezad et al. 2009; Wei et al. 2011) (Weia *et al.*, 2011; Shead *et al.*, 2009; Ishihara *et al.*, 2002; Klemm *et al.*, 2001).

Los hidrogeles formados por celulosa bacteriana y colágeno presentan resistencia a la compresión de varios órdenes de magnitud mayor que la de la estructura de celulosa, y cercana a la del tejido cartilaginoso, lo que hace de este material compuesto un excelente candidato para la sustitución de tejidos (Nakayama et al. 2004).

Los sensores de glucosa convencionales (que usan con frecuencia los pacientes diabéticos) tienen una gran desventaja, que es su corta vida útil. Al recubrir estos sensores con celulosa bacteriana, se ha demostrado que la vida útil aumenta, así como la estabilidad al contacto con la sangre (Ammon et al. 1995), propiedad que constituye otra enorme importancia a este biopolímero.

Pero sin duda, la mayor ventaja que se obtiene de la sustitución de celulosa vegetal por celulosa bacteriana es que se frena la explotación masiva de los recursos naturales y el predecible agotamiento de los recursos en un futuro ya que la celulosa se considera una fuente única de nuevos materiales para un amplio número de aplicaciones en áreas industriales, en biomedicina y en regeneración de piel animal (Huber et al. 2006; Nguyen et al. 2008; Jeong et al. 2010). A diferencia de la celulosa de pulpa de madera, el aislamiento y purificación de la celulosa producida por bacterias son relativamente simples, que no requieren de energía o procesos químicos intensivos. Más

aún, los problemas ambientales debidos a los subproductos de la fabricación de pasta de madera dan un impulso adicional para estudiar las inexploradas fuentes de celulosa (Colvin 1980).

Por otro lado merece la pena resaltar, que la producción a gran escala de la celulosa bacteriana está limitada debido a los bajos rendimientos que presenta, lo que incita al desarrollo de alternativas que permitan disminuir o eliminar las causas de esta limitación (Carreño Pineda et al. 2012).

### **5.1.2. Aplicaciones industriales y biotecnológicas.**

La cantidad de productos que se pueden elaborar a base de este compuesto es muy elevada. La celulosa tiene una gran variedad de aplicaciones en diferentes industrias, principalmente en la del papel, ya que sus propiedades son de gran valor para la elaboración de cartones y papeles de todo tipo; aunque también en otras como la alimentaria, la farmacéutica, la textil o en la obtención de biocombustibles, además de aplicaciones específicas en medicina y biotecnología (Carreño Pineda et al. 2012). También es muy usada en la fabricación de membranas que se utilizan como agentes de separación. Los científicos utilizan regularmente la celulosa como ayuda para separar mezclas de sustancias químicas, así como para filtrar las impurezas del agua u otros líquidos (Vandamme et al. 1998; Carreño Pineda et al. 2012).

La celulosa, constituye un componente importante de la pólvora, en forma de nitrato de celulosa, y se utiliza frecuentemente como un aislante en los proyectos de construcción. Además, se usa en la goma que reviste muchas marcas de papel mural. La celulosa también se puede tratar para producir papel transparente como el celofán que se usa para cubrir los alimentos y evitar su temprano deterioro o fibras naturales procesadas como el rayón, conocido también como seda artificial que se utiliza en prendas de vestir.

Actualmente, las posibles aplicaciones de la celulosa bacteriana se extienden desde las convencionales de la celulosa de origen vegetal, hasta aplicaciones en el campo médico y en tecnologías de separación. De esta manera, en la industria médica se utiliza como apósitos para heridas o piel artificial (Kowalska-Ludwicka et al. 2013), implantes cardiovasculares (Keshk 2014) o implantes de cartílago de menisco (Cherian et al. 2011), entre otras aplicaciones. La celulosa bacteriana también presenta cualidades importantes dentro de la industria farmacéutica para la administración de fármacos. Debido a sus propiedades mecánicas, morfología y permeabilidad, representa un buen soporte para el desarrollo de sistemas de liberación controlada transdérmica y oral, y para la inclusión de fármacos (Grande Cruz y Jaime 2015).

Pero más allá de las industrias médica, farmacéutica y alimentaria (Keshk 2014), y debido a las múltiples y versátiles propiedades que como hemos visto presenta la celulosa bacteriana, sus aplicaciones se extienden a otras categorías. Por citar algunos ejemplos, podemos decir que también se utiliza como embalaje, por ejemplo en el

envasado de alimentos (Stoica-Guzun et al. 2012; Gao et al. 2014); se aplica en el empleo de papeles de alta calidad, proporcionando mayor resistencia a la pulpa de papel (Surma-Ślusarska et al. 2008; Dobre et al. 2011); y se emplea también como componente en aerogeles (Haimer et al. 2010), matrices de inmovilización (Akduman et al. 2013) o electrónica (Barud et al. 2013; Wang et al. 2013).

## 5.2. Ácidos polihidroxiálcanoicos (PHAs).

Los PHAs son poliésteres termoplásticos y elastómeros biodegradables que poseen interesantes propiedades materiales. Estos polímeros lineales son acumulados como granos citoplasmáticos intracelulares (figura 10) en varios microorganismos incluyendo Eubacteria, Archea, levaduras y otros hongos. Son depositados como inclusiones esféricas insolubles, cuya estructura está formada por un núcleo de poliéster rodeado por una bicapa de fosfolípidos unida a proteínas.

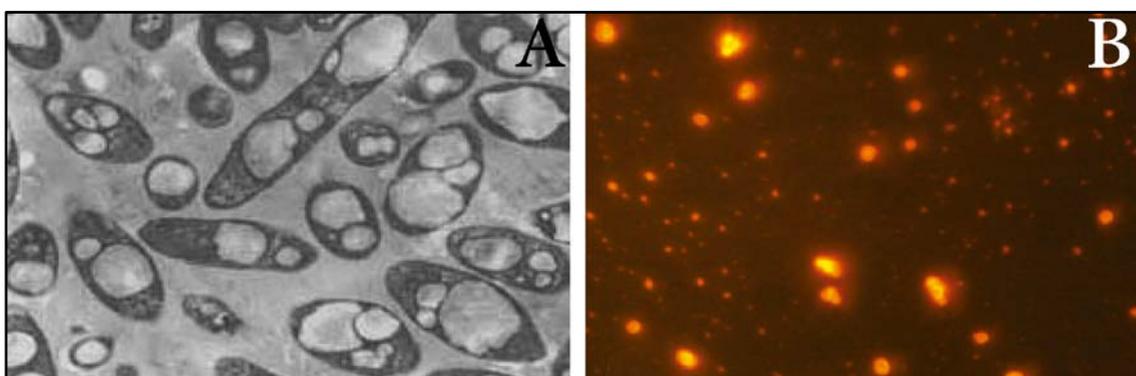


Figura 10. Gránulos citoplasmáticos de ácidos polihidroxiálcanoicos producidos por una cepa recombinante de *Escherichia coli* (imagen realizada con el microscopio electrónico de transmisión) (A) y por bacteria aisladas de productos agroindustriales (imagen realizada con el microscopio de fluorescencia) (B). Imagen adaptada (Lee 1996; Cardona Echavarría et al. 2013).

Los PHAs están compuestos por monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi (3HA). Normalmente se produce un polímero de  $10^3$  a  $10^4$  monómeros. Todos los PHAs que hasta ahora han sido caracterizados varían respecto a la longitud de los mismos, en un rango de 1-14 átomos de carbono (C1-C14). Por tanto, según el tamaño de los monómeros que lo componen, los PHAs pueden ser divididos en tres grupos:

- ❖ PHAs de cadena corta (“short chain length PHAS” o scl-PHAS): contienen 3-5 átomos de carbono. Ejemplos: poli-3-hidroxi valerato o P(3HV); poli-3-hidroxi butirato o P(3HB). Estos biopolímeros se caracterizan por presentar propiedades similares a los plásticos convencionales.
- ❖ PHAs de cadena media (“short chain length PHAS” o mcl-PHAS): contienen 3-14 átomos de carbono y tienen propiedades similares a los elastómeros y las gomas.

- ❖ PHAs de cadena larga (“long chain length PHAs” o lcl-PHA) con más de 14 monómeros de carbono (Steinbüchel 2001; Stubbe y Tian 2003; Chen y Wu 2005; Kathiraser et al. 2007).

Hay aproximadamente 150 ácidos hidroxialcanoicos diferentes que pueden dar lugar a estos poliésteres y también pueden ser combinados para formar un amplio rango de polihidroxialcanoatos con propiedades extremadamente diferentes (Steinbüchel 2001). Uno de los más comunes es el PHA de cadena corta conocido en sus siglas como PHB, es decir, ácido poli-3-hidroxibutírico, uno de los más extensamente estudiados por sus propiedades físico-mecánicas similares los poliésteres derivados de productos petroquímicos, como el polipropileno o el polietileno. Entre sus extensas propiedades destacan su rigidez y fragilidad, características muy importantes para ser utilizados a nivel industrial (Stubbe y Tian 2003). La mayoría de los microorganismos son capaces de generar PHAs de cadena corta compuestos por unidades de 3-hidroxibutirato o de cadena media, conteniendo 2-hidroxi octanoato (3HO) y 3-hidroxidecanoato (3HD) como monómeros principales.

Sin embargo, hay microorganismos capaces de formar un amplio rango de PHAs diferentes a los ya mencionados y que presentan un alto potencial biotecnológico al estar formados por diferentes ácidos grasos *hidroxi* de longitud variable.

Los microorganismos acumulan polihidroxialcanoatos en su interior cuando una fuente de carbono está disponible en exceso y cuando el crecimiento está limitado por la escasez de otros nutrientes importantes como Nitrógeno, fósforo, oxígeno o azufre (Bhuwal et al. 2013). Los polihidroxialcanoatos son poliésteres naturales que se presentan como una alternativa a la síntesis de plásticos (Spiekermann et al. 1999; Shamala et al. 2003).

En las últimas décadas han aumentado los estudios sobre los microorganismos capaces de producir bioplásticos, la mayoría de ellos con la finalidad de obtener un alto rendimiento en la consecución de estas moléculas. Los estudios se marcan tres premisas principales: la búsqueda de nuevas bacterias seguras y productoras de PHAs aisladas de diferentes fuentes; la optimización de las condiciones para producir PHAs, con el objetivo de reducir los altos costes que actualmente generan; y, por último, la obtención de bacterias recombinantes que sean capaces de producir altas cantidades de estos bioplásticos usando para conseguirlo, por ejemplo, cepas recombinantes de *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida* (Lee 1996; Ren y Beard 2005; Centeno-Leija et al. 2014).

Los microorganismos capaces de sintetizar PHAs incluyen especies dentro de las bacterias Gram negativas, como *Azohydromonas lata*, *Cupriavidus necator*, varias especies de *Azotobacter*, como *A. vinelandii*, *A. chroococcum* y *A. beijerinckii* y de *Pseudomonas* como *P. oleovorans*, *P. nitroreducens*, *P. putida*. Pero también encontramos bacterias productoras dentro de las especies de bacterias Gram positivas,

como *Rhodobacter sphaeroides* y dentro del género *Bacillus*, *B. megaterium* o *B. licheniformis* (Sangkharak y Prasertsan 2012; Bhuwal et al. 2013; Anjum et al. 2016).

A pesar de los avances realizados en el estudio de la síntesis de PHAs originados por bacterias, existen muchas fuentes aún inexploradas en la naturaleza, donde encontrar y aislar bacterias con la capacidad para producir estos biopolímeros (Mousavi et al. 2014; Mousavi et al. 2015; Solans et al. 2015).



# OBJETIVOS



En la actualidad, existe en la sociedad una palpable preocupación ante el abuso y exceso de fertilizantes químicos en los cultivos que, con el paso de los años, ha ido originando y agravando considerables daños en el medio ambiente. Una de las líneas prioritarias por las que se aboga desde la Unión Europea es la reducción de la fertilización química. El empleo de biofertilizantes en sustitución de plaguicidas y fertilizantes de origen químico es una de las alternativas más plausibles que existen y, para ello, es necesario un mayor y mejor conocimiento de las interacciones que se establecen entre los microorganismos y las plantas. Es interesante e importante explorar los mecanismos de acción de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que favorezcan el desarrollo y crecimiento de, entre otros, cultivos de elevado interés económico.

Así mismo, y debido al abuso indiscriminado que se tiene de los recursos naturales de los que el planeta Tierra dispone, creemos que es muy interesante indagar entre los numerosos biopolímeros que pueden sintetizar los microorganismos y que pueden ser utilizados por la industria para aplicaciones técnicas de medicina, farmacia y agricultura, entre otras muchas áreas.

Por tanto el objetivo principal de este trabajo se centra en encontrar bacterias con capacidad para promover el crecimiento vegetal y favorecer la resistencia de las plantas de *Lotus corniculatus* al ser aplicadas como biofertilizantes.

Para alcanzar este objetivo concreto se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento de bacterias endofíticas a partir de nichos ecológicos seguros como son los nódulos de *Lotus corniculatus*.
2. Análisis de la biodiversidad de las cepas aisladas empleando técnicas moleculares basadas en perfiles de ADN que permiten el estudio de la biodiversidad infraespecífica.
3. Identificación de la biodiversidad existente mediante el análisis genotípico y la caracterización fenotípica de los aislados.
4. Estudio de la capacidad potencial para promover el crecimiento vegetal de los aislados en plantas de *Lotus corniculatus*.
5. Análisis de los procesos de infección, colonización y nodulación inducidos por aislados seleccionados en plantas de *Lotus corniculatus*.
6. Estudio y análisis de la producción vegetal de aislados seleccionados en plantas de *Lotus corniculatus* en condiciones de invernadero y de campo.
7. Análisis del potencial biotecnológico de los aislados para producir biopolímeros de interés económico y ambiental.





*MATERIALES*  
*y*  
*MÉTODOS*



## 1. Microorganismos utilizados en el estudio.

### 1.1. Aislamiento de cepas.

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron aislados de nódulos de *Lotus corniculatus*, obtenidos de un suelo procedente de la localidad salmantina de Carbajosa de la Sagrada, situada a unos 6 kilómetros al sur de la ciudad de Salamanca (latitud de 40° 55' 59'' y altitud de 5° 39' 05''; a 789 msnm).

A partir de varias plantas recogidas directamente del suelo, se realizó una selección de nódulos efectivos. Los nódulos se lavaron con agua para eliminar los restos de suelo que pudieran quedar, tras lo que se esterilizaron en superficie sumergiéndolos durante dos minutos en una solución de HgCl<sub>2</sub> al 2,5%. Después, y manteniendo las condiciones asépticas, se realizaron cinco lavados con agua estéril para eliminar los restos de HgCl<sub>2</sub>. Posteriormente, se trituraron los nódulos con ayuda de una varilla de cristal estéril, con la cual se sembró el triturado en placas Petri con medio de cultivo YMA (Vincent 1970) (tabla ). Las placas sembradas se cultivaron a 28°C durante siete días, en los que se produjo el crecimiento de bacterias procedentes del interior del nódulo.

Adicionalmente, en varios ensayos, se utilizaron varias cepas tipo pertenecientes al género *Mesorhizobium* que se detallan a continuación:

- ❖ *Mesorhizobium erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium tianshanense* A1BS<sup>T</sup> y USDA 3592<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium metallidurans* STM 2683<sup>T</sup> y LMG 24485<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium jarvisii* ATCC 33669<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium loti* NZP 2213<sup>T</sup>
- ❖ *Mesorhizobium tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup> y LMG 24338<sup>T</sup>

A partir de las colonias formadas por las bacterias, se realizaron aislamientos por agotamiento en estría hasta obtener cultivos puros que se sembraron en el mismo medio y a la misma temperatura.

### 1.2. Mantenimiento y conservación de cepas.

El mantenimiento de las cepas para su uso rutinario se realizó en placas de YMA (Yeast Manitol Agar) (tabla 6) conservándolas a una temperatura de 4°C. Su conservación se realizó por congelación a temperatura de -80°C, utilizando una solución crioprotectora de glicerol al 25%, que se repartió en criotubos (1ml) y se esterilizó en el autoclave. Posteriormente a partir de los cultivos crecidos en medio YMA durante 5 días a 28°C, se prepararon suspensiones celulares de cada una de los aislados en agua

estéril, añadiendo 500µl de la suspensión por criotubo de glicerol. Cada una de las cepas se preservó en 3 criotubos.

**Tabla 6. Preparación del medio YMA.**

YMA	1L (Agua destilada, c.s.p.)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluca®)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,2 g
NaCl (Panreac®)	0,1 g
Manitol (Fluca®)	10,0 g
Extracto de levadura (Difco®)	0,2 g
Agar (Conda®)	20,0 g

## 2. Caracterización genotípica.

### 2.1. Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos.

#### 2.1.1. Extracción de DNA total con kit comercial REDEExtract-N-Amp Plant PCR kit de Sigma®.

Este kit fue utilizado siguiendo las indicaciones dadas por el fabricante, pero con algunas modificaciones. Esta extracción está indicada cuando con posterioridad se utiliza el mix de Taq polimerasa que contiene el kit comercial. Las cepas de las cuales se va a extraer el DNA deben estar frescas, de aproximadamente 24-72 h, según el tiempo de crecimiento de las mismas.

- Se resuspende una colonia en 100 µl de la solución “Extraction Solution” y se agita en vortex de forma suave.
- Se incuban los tubos durante 10 minutos a 95°C para provocar la lisis celular.
- Transcurrido este tiempo se añade 100 µl de la solución “Dilution Solution” y se centrifugan los tubos a 6.000 rpm durante 4 minutos.
- Se recogen los 100 µl de la fase acuosa superior, libres de restos celulares.
- La solución se conserva a -20°C.

#### 2.1.2. Extracción de DNA total por lisado bacteriano.

Este es un protocolo de extracción rápida que se puede utilizar en los casos en que no se requiera un DNA de alta pureza (Rivas et al. 2001).

- Se echan 50 µL de buffer de lisis (tabla 7) en un tubo eppendorf sobre los que se resuspende una colonia (o un asa calibrada de 1 µL). Gracias al NaOH que

contiene el buffer de lisis, este paso va a ayudar a romper la pared celular, destruyendo los puentes de Hidrógeno presentes entre las bases de ADN, convirtiéndose de este modo en ADN de cadena simple. El buffer también está compuesto por SDS que va a ayudar a solubilizar las membranas celulares y desnaturalizar de este modo la mayor parte de las proteínas.

- A continuación la suspensión anterior se re-suspende mediante un vortex durante aproximadamente 60 segundos.
- Se calienta a 95°C en un termoblock durante 15 minutos.
- Centrifugar el lisado a máxima velocidad durante 10 minutos.
- Echar 90 µL de agua destilada estéril en un eppendorf nuevo y resuspender sobre ella 10 µL del sobrenadante recogido del paso anterior.
- Guardar a -20°C hasta su uso.

**Tabla 7. Composición del buffer de lisis.**

Buffer de lisis	Concentración	g/100mL
NaOH (Panreac®)	0.05M	0,2
SDS (Sigma®)	0.25%	0,25

## 2.2. Amplificación y electroforesis de ácidos nucleicos.

La amplificación de ADN se realiza empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR. Los reactivos y la concentración utilizados varían en función de la actividad a desarrollar, en función de si son perfiles de ADN o si lo que se quiere amplificar es un gen.

### 2.2.1. Perfiles RAPD.

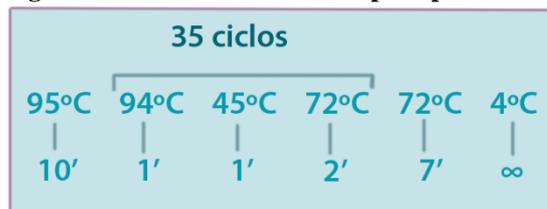
Es una técnica basada en la amplificación al azar de diversas secuencias del ADN distribuidas a lo largo de todo el genoma y que funcionan como marcadores moleculares. Mediante PCR se hace una amplificación del ADN utilizando el primer M13 (5'CAGGGTGGCGTTCT 3') diseñado a partir de la región central del fago del mismo nombre (Rivas et al. 2006; Schönian et al. 2009).

Los reactivos (tabla 8) y condiciones (figura 11) de PCR empleados en la realización de los análisis son los especificados a continuación:

**Tabla 8. Reactivos utilizados para el Mix de reacción Dream Taq Green Master Mix.**

Reactivos	Volumen
Dream Taq Green Master Mix	12,5 µL
Primer M13 (20 µM)	2,5-3 µL
H <sub>2</sub> O (Thermo-Fischer®)	8 µL
DNA	2-1,5 µL

**Figura 11. Condiciones de PCR para perfiles RAPD.**



Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, bajo las condiciones descritas en el apartado 2.3., para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles de RAPD

### 2.2.2. Perfiles TP-RAPD.

Es otra técnica basada también en la PCR, pero menos conocida que los perfiles RAPD, que utiliza dos primers complementarios de regiones altamente conservadas del ADNr 16S para la amplificación (Rivas et al. 2001; Rivas et al. 2002). Estos perfiles TP-RAPD (two primers- RAPD) tienen una serie de ventajas como son su repetitividad y su potencial de agrupamiento de cepas bacterianas a nivel de especie y subespecie.

Los reactivos (tabla 9) y condiciones (figura 12) de PCR empleados en la realización de los análisis son los especificados a continuación:

**Tabla 9. Reactivos utilizados para el Mix de reacción.**

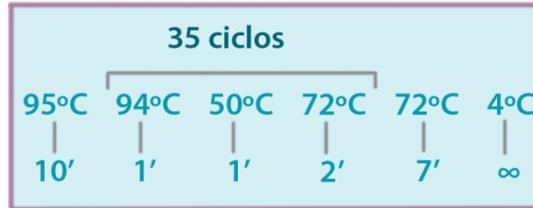
Reactivos	Volumen
REDTaq ADN Polimerasa (5U/μL)	15 μL
Primer 879F (20 μM)	2,5 μL
Primer 1522R (20 μM)	2,5 μL
H <sub>2</sub> O (Thermo-Fischer®)	3 μL
DNA	2 μL

Para la amplificación del ADN se utilizaron los primers 879F y 1522R (Rivas *et al.*, 2002):

**879F:** 5' GCCTGGGGAGTACGGCCGCA 3' (posición 879-898)\*

**1522R:** 5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3' (posición 1503-1522)\*

**Figura 12. Condiciones de PCR para perfiles TP- RAPD.**



(\*)Las posiciones se corresponden con la numeración de la secuencia del ADN ribosómico 16S de *Escherichia coli* ATCC 8739 (NC010468).

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis, bajo las condiciones descritas en el apartado 2.3., para separar las diferentes bandas amplificadas y obtener los perfiles TP-RAPD.

### 2.2.3. Amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S.

Para amplificar este gen se utilizaron los primers 27F y 1522R (Rivas *et al.*, 2002) diseñados a partir del consenso de las secuencias de ADN ribosómico 16S de diferentes microorganismos:

**27F:** 5' AGAGTTTGATCTGGCTCAG 3' (posición 8-27)\*

**1522R:** 5' AAGGAGGTGATCCANCCRCA 3' (posición 1503-1522)\*

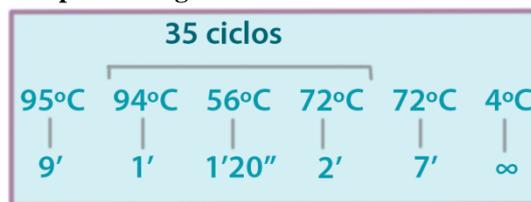
(\*)Las posiciones de los primers empleados tanto para la amplificación como la secuenciación se corresponden con la numeración de la secuencia del ADN ribosómico 16S de *Escherichia coli* ATCC 8739 (NC010468).

Los reactivos (tabla 10) y condiciones (figura 13) de PCR empleados en la amplificación del gen ribosómico 16S son los especificados a continuación:

**Tabla 10. Reactivos utilizados para el Mix de reacción.**

Reactivos	Volumen
REExtract Ready Mix	15 µL
Primer 27F (2 µM)	2 µL
Primer 1522R (2 µM)	2 µL
H <sub>2</sub> O (Thermo-Fischer®)	9 µL
DNA	2 µL

**Figura 13. Condiciones de PCR para amplificar el gen ribosómico 16S.**



Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis según lo indicado en el apartado 3.3.

Para secuenciar los fragmentos de este gen se siguió el procedimiento explicado en el apartado 2.5 y se emplearon los siguientes cebadores:

**800R:** 5' - TACCAGGGTATCTAATCC - 3' (posición 782-800)

**1522R:** 5' - AAGGAGGTGATCCANCCRCA - 3' (posición 1503-1522)

#### 2.2.4. Amplificación y secuenciación de los genes *recA*, *atpD*, *glnII* y *nodC*.

La amplificación de los genes *recA* y *atpD* se llevó a cabo con los cebadores *recA*-Rh-4R y *recA*-Rh-1F, y *atpD*-Rh-3R y *atpD*-Rh-1F, respectivamente, diseñados a partir de regiones conservadas en las secuencias disponibles de estos genes en las bases de datos (Gaunt et al. 2001).

***recA*-Rh-1F:** 5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA-3' (posición 6-32)

***recA*-Rh-4R:** 5'-CGRATCTGGTTGATGAAGATCACCAT-3' (posición 529-555)

***atpD*-Rh-1F:** 5'-SCTGGGSCGYATCMTGAACGT-3' (posición 273-294)

***atpD*-Rh-3R:** 5'-GCCGACACTTCCGAACCGCCTG-3' (posición 748-771)

Las posiciones hacen referencia al primer nucleótido a partir del primer de la secuencia del gen *recA* de *Rhizobium leguminosarum* VF39 (X59956) y del gen *atpD* de *Rhodobacter capsulatus* B100 (X99599).

Las secuencias del gen *glnII* para las cepas del presente estudio fueron llevadas a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Vinuesa et al. (Vinuesa et al., 2005) y Rivas et al. (Rivas et al. 2007) las secuencias de los dos primers utilizados son los siguientes:

***glnII*-12F:** 5'-YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT-3'

***glnII*-689R:** 5'-TGCATGCCSGAGCCGTTCCA-3'

La secuenciación del gen *nodC* fue utilizada para definir los primeros biovares en el género *Bradyrhizobium*, bv. *genistearum* y bv. *glycinearum*, dentro de la especie *B. japonicum* (Vinuesa et al., 2005) y en el género *Mesorhizobium*, el bv. *ciceri*, dentro de *M. amorphae* y *M. tianshanense* (Rivas et al. 2007).

***nodCMesoF***: 5'-CGA(CT)CG(AG)AG(AG)TTCAA(CT)TTC-3'

***nodCMesoR***: 5'-CT(CT)AATGTACACA(AG)(GC)GC-3'

La preparación de cóctel de reacción de PCR para amplificar los genes *recA*, *atpD* y *nodC*, se llevó a cabo según lo indicado en la tabla 11 y en la tabla 12 se muestran los tiempos y temperaturas de amplificación.

Se efectuó una electroforesis siguiendo los pasos señalados en el apartado 2.3 para separar el ADN amplificado, que fue cortado y secuenciado según lo explicado en el apartado 2.5, utilizando los mismos primers que se utilizaron para realizar la amplificación.

**Tabla 11. Reactivos utilizados para la amplificación de los genes *recA*, *atpD* y *nodC* con sus primers correspondientes en cada caso.**

Reactivos	Volumen
REDExtract Ready Mix	15 µL
Primer F (2 µM)	2,5 µL
Primer R (2 µM)	2,5 µL
H <sub>2</sub> O (Thermo-Fischer®)	5 µL
DNA	2,5 µL

**Tabla 12. Condiciones de PCR empleados en la amplificación de los genes *recA*, *atpD* y *nodC*.**

Método	<i>recA</i> , <i>atpD</i>	<i>nodC</i>
Predesnaturalización	95°C - 9'	95°C - 10'
35 ciclos	Desnaturalización	94°C - 1'
	Anillamiento	54°C - 1'10''
	Extensión	48,5°C-1'20''
Extensión final	72°C - 1'	
	72°C - 7'	
	15°C - ∞	

### 2.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% cuando el objetivo fue cortar bandas de ADN, y al 1,5% cuando se analizaron perfiles de ADN.

El tampón utilizado para la preparación de los geles, así como para la electroforesis fue TAE 1X (Tris Acetate-EDTA Buffer, Sigma®). Las fuentes, las cubetas y las planchas de electroforesis son de la casa comercial BioRad®.

- Para preparar los geles, a la concentración requerida en cada caso, se pesa la cantidad correspondiente de agarosa y se disuelve en TAE 1X por calentamiento. Hay que tener la precaución de evitar que hierva.
- Se añade al gel ya disuelto bromuro de etidio (Promega S.L.) a una concentración final de 0.5 µg/mL. Evitar echarlo hasta que la solución no esté atemperada. Colocar el peine adecuado en la plancha y verter en ella la solución para que solidifique. En otros casos, no se añade bromuro de etidio directamente al gel, sino que se tiñe con posterioridad a la electroforesis en un baño de bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml durante 20 minutos y posteriormente se retira el exceso en un baño de agua durante 20 minutos.
- En el caso en que los productos de PCR no lleven ya incorporados frente, mezclar estos con tampón de carga de electroforesis (Thermo®) en proporción 6:1.
- Incluir marcador molecular de la gama GeneRuler (Thermo®). Según el caso, se utilizan marcadores moleculares de 1Kb o 100pb. Para el caso en el que se cuantifican muestras de ADN, utilizar como marcador pGem 100 µM.
- Aplicar un voltaje de 60V durante 120 minutos, tanto en el caso de amplificación de genes como en la obtención de perfiles de ADN, y de 70V durante 70 minutos en el caso en el que se quiera cuantificar muestras.
- Tomar foto de los geles en un transiluminador (GelDoc, Biorad®).

#### **2.4. Recuperación de fragmentos a partir de geles de agarosa.**

Una vez identificada y cortada la banda, se siguió el protocolo de extracción “GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit” de Thermo Scientific®.

- Calentar el termoblock a 55°C antes de ir a cortar la/s banda/s para que este a la temperatura en el momento de su uso.
- La banda se debe cortar lo más próxima posible al ADN para minimizar el volumen de gel de agarosa que posteriormente habrá que eliminar. Se introduce en un eppendorf de 1.5 mL.
- Añadir 200 µL de “*Extraction Buffer*” y mezclar bien con la banda.
- Incubar las bandas a 55°C durante 10-15 minutos, o hasta que la agarosa este completamente disuelta. Durante este periodo, invertir el eppendorf para mezclar bien su contenido cada pocos minutos. De esta manera se facilita la fundición de la banda.
- Añadir a la mezcla anterior 200 µL de etanol al 96% y homogeneizar bien.
- Transferir el volumen total a una columna de purificación de ADN, que estará incorporada en su propio eppendorf.
- Centrifugar la columna a 14000 x g durante 1 minuto.

- Descartar el líquido caído en el eppendorf y volver a colocar la columna en el mismo.
- Añadir 200  $\mu\text{L}$  de “Prewash Buffer” (previamente suplementado con etanol según marca en la etiqueta del Buffer) a la columna y volver a centrifugar a 14000 x g durante 1 minuto.
- Descartar nuevamente el líquido caído en el eppendorf y volver a colocar la columna en el mismo.
- Añadir 700  $\mu\text{L}$  de “Wash Buffer” (previamente suplementado con etanol según marca en la etiqueta del Buffer) a la columna y volver a centrifugar a 14000 x g durante 1 minuto.
- Añadir de nuevo 700  $\mu\text{L}$  de “Wash Buffer” a la columna, volver a centrifugar a 14000 x g durante 1 minuto y descartar el líquido sobrante.
- Centrifugar la columna vacía a 14000 x g durante 1 minuto, para eliminar completamente los restos de “Wash Buffer” que hayan podido quedar. Este paso es muy importante para eliminar los restos de etanol que hayan podido quedar en la solución de DNA pura, ya que la presencia del mismo podría inhibir posteriores reacciones enzimáticas que se vayan a realizar.
- Transferir la columna de purificación a un eppendorf de 1.5 mL esteril. Tener la precaución de tener bien rotulada la columna de purificación en caso de rotura de la tapa del eppendorf, que deberá ir abierta en la centrifugación.
- Añadir 12  $\mu\text{L}$  de “Elution Buffer” asegurándose de echarlo en el centro del filtro del interior de la columna de purificación.
- Centrifugar a 14000 x g durante 1 minuto.
- Descartar la columna de purificación y guardar el DNA purificado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Secuenciación.**

Las secuencias de ADN, se obtuvieron en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando el kit “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” y utilizando un equipo de secuenciación ABI PRISM (Applied Biosystem®, EEUU).

Las muestras se enviaron de la siguiente manera: 3 $\mu\text{l}$  de ADN (aproximadamente 100 ng de ADN), 1,6  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y 5  $\mu\text{l}$  del primer correspondiente (2  $\mu\text{M}$ ).

### **2.5.1. Análisis de las secuencias de ADN.**

El análisis de las secuencias del ADN ribosómico 16S se llevó a cabo con el programa BLASTn, versión 2.0, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquellas que presentan una mayor similitud (Brenner 1995).

Estas secuencias también se compararon con las cepas tipo utilizando el programa Eztaxon 2.0 (Chun et al. 2007)

Para el análisis filogenético, las secuencias de las cepas del estudio junto con las de las cepas de referencia pertinentes en cada análisis, se alinearon mediante el programa Clustal X (Thompson et al. 1997; Jeanmougin et al. 1998) y, utilizando el programa Mega 5 (Tamura et al. 2011), se construyeron los árboles filogenéticos, empleando el método Neighbour-Joining (Saitou and Nei 1987), mediante el coeficiente de Kimura 2 (Kimura 1980) y seleccionando un “bootstrap” de 1000.

\* Los fragmentos generados de una misma secuencia se ensamblaron mediante el programa SeqMan II.

## **2.6. Análisis de escalado multidimensional.**

Esta técnica se realizó empleando el programa Bionumerics (Applied Maths, Nv; EEUU). Para ello primero se evaluaron los perfiles de bandas obtenidos para todas las cepas muestreadas utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

A partir de estos perfiles se desarrolló una matriz de similitud que fue utilizada por el programa para construir un mapa de escalado multidimensional.

## **2.7. Determinación del contenido en G+C.**

El cálculo del porcentaje de G+C de las cepas de este estudio se realizó empleando el método de fusión (Mandel and Marmur 1968).

El fundamento de este método se basa en el fenómeno de hipercromicidad que se observa en el ADN cuando se desnaturaliza y que es fácilmente observable por los cambios en la absorción de luz U.V. a 260 nm. Cuando se eleva la temperatura de la muestra de ADN se produce su desnaturalización, haciendo que se rompan los puentes de hidrógeno que mantienen la doble hélice. Este proceso se conoce como fusión. El punto de máxima absorbancia a 260 nm nos da la temperatura de fusión ( $T_m$ ), la cual es directamente proporcional al porcentaje molar de G+C, puesto que las uniones G-C (guanina-citosina) se mantienen por 3 puentes de hidrógeno, mientras que las de A-T (adenina-timina) están formadas por dobles enlaces y son más fáciles de separar.

La determinación de las absorbancias a 260 nm se llevó a cabo en un espectrofotómetro de luz U.V. modelo Gene Quant, de Pharmacia Biotech® (EEUU).

El ADN de cada cepa se disolvió en tampón SSC 1x (tabla 13), con una relación ADN: SSC de 1:9.

Tabla 13 .Composición del tampón SSC

	Concentración	Cantidades
NaCl (Panreac®)	3,0 M	8,77 g
Na-citrato pH 7,0 (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	0,3 M	4,41 g
Agua c.s.p.		1,00 L

Para tener una referencia, determina la absorbancia del blanco (SSC) a una temperatura de 50 °C. La absorbancia de las muestras a la misma longitud de onda se mide desde 50°C hasta 80°C en intervalos de 5°C y, posteriormente, en intervalos de 1°C hasta los 98°C. La fórmula que relaciona el porcentaje de de G+C y la Tm es la siguiente:

$$\% \text{ G+C} = K * (Tm - 69,3) \times 2,44$$

### 3. Técnicas de Biología molecular.

#### 3.1. Transformación de *Mesorhizobium*.

##### 3.1.1. Transformación mediante transferencia de ADN por conjugación biparental.

La transformación de las cepas obtenidas en este estudio se realizó utilizando la cepa silvestre de *E. coli* S17.1 (Spr/Smr) (Simon *et al.*, 1983) para la replicación y transferencia del plásmido pHC60 (Cheng y Walker, 1998) por medio de conjugación biparental. Este plásmido contiene un fragmento que expresa constitutivamente una proteína fluorescente (GFP) y como marcador tiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tc).

##### 3.1.2. Transformación mediante transferencia de ADN por conjugación triparental.

La transferencia de las cepas obtenidas en este estudio se realizó utilizando una cepa donadora (D) de *E. coli* DH5α con el plásmido de interés, una cepa “helper” o movilizadora (H) (PRK2013/803PrkB08) y la cepa receptora (R) (*Mesorhizobium*). Este plásmido contiene un fragmento que expresa constitutivamente una proteína fluorescente (GFP) y como marcador tiene un gen de resistencia a tetraciclina (Tc).

A continuación y en breves pasos, enumeramos los pasos que se siguieron para la realización de la transformación.

- Las cepas deben crecerse en medio sólido de manera que el día de la transformación estén frescas. 3-4 días en el caso de *Mesorhizobium* y overnight en el caso de las *E. coli*.
- Mezclar con ayuda de un asa de siembra estéril una proporción 2:1:1 (Receptora:Helper:Donadora) en una placa de medio YMA/TY.

- Incubar a 28 °C durante toda la noche.
- Sembrar por agotamiento en estría en Medio Mínimo sólido (O’Gara and Shanmugam 1976) modificado y suplementado con el antibiótico selectivo correspondiente.
- Incubar a 28°C hasta aparición de colonias aisladas.
- Seleccionar y sembrar simultáneamente en medio mínimo sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente que se incubaba a 28°C y en medio sólido VRB, que se incubaba a 37°C.
- A las 48h se seleccionan aquellos transconjugantes que hayan salido positivos medio mínimo y que, por el contrario, sean negativos en el medio VRB, sinónimo de estar libres de *E. coli*.
- Sembrar en su medio habitual suplementado con el antibiótico correspondiente una vez que nuestras cepas estén limpias. YMA en este caso en concreto.
- Comprobar mediante PCR/fluorescencia/otros la presencia del plásmido en nuestra bacteria y guardar en glicerol.

\*No olvidar controles de transformación.

\*En el caso en que se vea crecimiento en Medio Mínimo, suplementado con el antibiótico correspondiente de la cepa de interés a transformar, pero también de *E. coli*, hacer sucesivos aislamientos en estría hasta la completa desaparición de la *E. coli*.

En el caso de una transformación biparental, el procedimiento es igual con la diferencia de que la cepa donadora tiene capacidad movilizadora, por lo que no es necesaria la adición a la mezcla de una cepa “helper”.

## 4. Caracterización fenotípica.

### 4.1. Morfología.

Las características morfológicas, la pigmentación y el crecimiento de las colonias fueron observadas directamente sobre placas de YMA (tabla 14), en el caso de aquellas cepas que presentaron un aspecto morfológico similar a *Mesorhizobium*, y en YED (tabla 7) para el resto de cepas.

**Tabla 14. preparación del medio de cultivo YED-P.**

YED	g/L
Extracto de levadura (Difco®)	20
Glucosa (Panreac®)	20
Agar (Conda®)	20

La morfología de las cepas también fue observada en la lupa estereoscópica (Nikon SM2800).

#### 4.2. Producción de sideróforos.

La capacidad de producir sideróforos fue evaluada utilizando el medio de cultivo M9-CAS-AGAR, que es una modificación del medio utilizado por Schwyn y Neilands (Schwyn and Neilands 1987), donde se pueden observar halos de distintas tonalidades en función de la mayor o menor producción de sideróforos.

La modificación consiste en la adición de un disolvente catiónico, HDTMA, que estabiliza el complejo Fe-CAS y le da un color azul característico (Alexander and Zuberer 1991). El método propuesto es una modificación del medio M9 en el que se incluye un indicador de color (HDTMA) y un agente quelante del hierro (EDTA). Este medio M9 CAS agar modificado se prepara partiendo de cuatro soluciones diferentes, esterilizadas de formas individuales y mezcladas posteriormente.

##### Solución 1

- En esta solución, se mezclan 10 ml de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 1 mM (disueltos en HCl 10 mM), con una solución acuosa de 50 ml de CAS (1.21 mg ml<sup>-1</sup>) obteniendo una solución acuosa de intenso color púrpura, que se mezclará posteriormente con 40 ml de una solución acuosa de HDTMA (1.82 mg ml<sup>-1</sup>).
- La solución resultante tendrá un color azul marino denso, que se autoclava independientemente del resto.
- La solución se mezcla con las restantes cuando su temperatura baja hasta unos 50°C.

##### Solución 2

En primer lugar se obtiene una solución salina mezclando el KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, NH<sub>4</sub>Cl y H<sub>2</sub>O, después se añade la solución PIPES (piperazina-N, N'-bis [ácido 2-ethanesulfónico]) al medio anterior y se ajusta el pH a 6.8 (Tabla 15).

**Tabla 15. Solución 2 de la preparación del medio M9-CAS-Agar.**

Solución 2	750 mL
PIPES (Sigma®)	30,24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,3 g
NaCl (Panreac®)	0,5 g
NH <sub>4</sub> Cl (Panreac®)	1,0 g
Agar (Conda®)	15 g

##### Solución 3

Para obtener esta solución se disuelven en 70 ml de H<sub>2</sub>O destilada los compuestos detallados en la Tabla 16.

**Tabla 16. Solución 5 de la preparación del medio M9-CAS-Agar.**

Solución 3	70 ml H <sub>2</sub> O destilada
Sacarosa (Panreac®)	2,0 g
Manitol (Fluca®)	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	493,0 mg
CaCl <sub>2</sub> (Codex)	11,0 mg
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1,17 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Panreac®)	1,4 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0,04 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1,2 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	1,0 mg

#### Solución 4

- La solución 4 es una disolución de 30 ml de cas-aminoácidos (proveniente de la degradación parcial de caseína) al 10% w/v esterilizada mediante filtración por una membrana de 0,22 µm (Millipore®, Amicon, EEUU).
- Una vez preparadas todas las soluciones, se esterilizan en autoclave, mezclándolas posteriormente cuando adquieran una temperatura de 50°C, siendo la solución 4 la última en ser añadida.
- De esta manera, tenemos el medio M9 CAS agar preparado.
- En las placas preparadas con este medio sembramos las cepas y se incuban durante un mínimo de 3 días a 28°C.
- Las placas pueden observarse a distintos tiempos para ver la evolución en la producción de sideróforos.

### 4.3. Determinación de la capacidad para producir ácido 3-indolacético.

#### 4.3.1. Vía cualitativa.

La determinación de la capacidad para producir ácido indolacético de las diferentes cepas, fue evaluada utilizando el medio JMM (Graham et al. 1989) modificado para determinar qué ruta metabólica utilizan estos microorganismos para la producción de AIA y medirlo de forma cualitativa. Los pasos que se siguieron se detallan a continuación:

- Las cepas se siembran en placas de YMA (o el medio de cultivo más adecuado, según la bacteria con la que se esté trabajando) y se dejan creciendo durante 5 días a 28°C (ajustar al período de crecimiento de la bacteria con la que se esté trabajando).
- Transcurrido este tiempo se realizan soluciones con los cultivos en agua destilada estéril a una densidad de  $1 \cdot 10^6$  UFC/ml.
- Con 100 µl de estas diluciones se inocula el medio JMM modificado.

Preparación del medio JMM:

- Para la preparación del medio JMM modificado, partimos de una solución base o medio JMM base (Tabla 17), la cual se autoclava, con excepción de la solución de vitaminas que se añade con posterioridad.
- Hay que ajustar el pH de la solución base entre 7-7,2 antes de separarlo en viales y autoclavar. La solución estará básica, por lo que se ajusta con ácido cítrico 0,55M. Es conveniente echar gota a gota de dicho ácido para que no se cambie bruscamente el pH. Si el pH baja demasiado (por debajo de 7), ajustar con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para subirlo.
- Para la preparación de la solución de vitaminas (Tabla 18), todos los ingredientes se disuelven en  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,05M (pH 7,0) y se esterilizan por filtración empleando filtros de un tamaño de poro de  $22\mu\text{m}$  (Millipore®, Amicon, EEUU). La marca comercial de todas las vitaminas es Fluka®.

Tabla 17. Composición del medio JMM base.

Medio JMM base	C+ (Con fuente de nitrógeno)	C- (Sin fuente de nitrógeno)
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Panreac®)		0,006g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac®)		0,004g
NaCl (Panreac®)		0,002g
Elementos traza		2 $\mu\text{l}$
Solución de vitaminas (Tabla 11)		8 $\mu\text{l}$
Glucosa (Panreac®)		0,04g
Manitol (Fluca®)		0,08g
Piruvato sódico (Sigma)		0,08g
$\text{H}_2\text{O}$		10ml

Tabla 18. Composición de la solución de vitaminas.

Solución de vitaminas	mg/L
Riboflavina	20,0
Ácido P-amino benzoico	20,0
Ácido nicotínico	20,0
Biotina	20,0
Tiamina-HCl	20,0
Piridoxina-HCl	20,0
Pantotenato cálcico	20,0
Inositol	120,0

\* Todas las vitaminas utilizadas son de la casa comercial Fluka.

- Una vez preparado el medio base, se separa en viales, añadiendo a cada uno 2 mL de la solución y se autoclava. Posterior a la esterilización se echan las vitaminas (1,6 por vial).

- La producción de AIA por las cepas aisladas se evalúa en medio con triptona, que es un inductor de la producción de AIA debido a su alto contenido de triptófano, y es precursor de este metabolito.
- A cada uno de los viales autoclavados y con las vitaminas, se añade 20 µl de triptófano.
- Para la preparación del triptófano es conveniente realizar un stock a 100X, con una concentración final de 0,167 g/L (tabla 19). Al diluirlo en agua el pH es muy básico. Para ajustarlo a un pH 7 se añade, aproximadamente 40 µl de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac®) 2,5M a cada vial. Tanto el triptófano como la solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Panreac®) deben esterilizarse por filtración, con un tamaño de poro de 22µm (Millipore®, Amicon, EEUU). Guarda a 4°C.

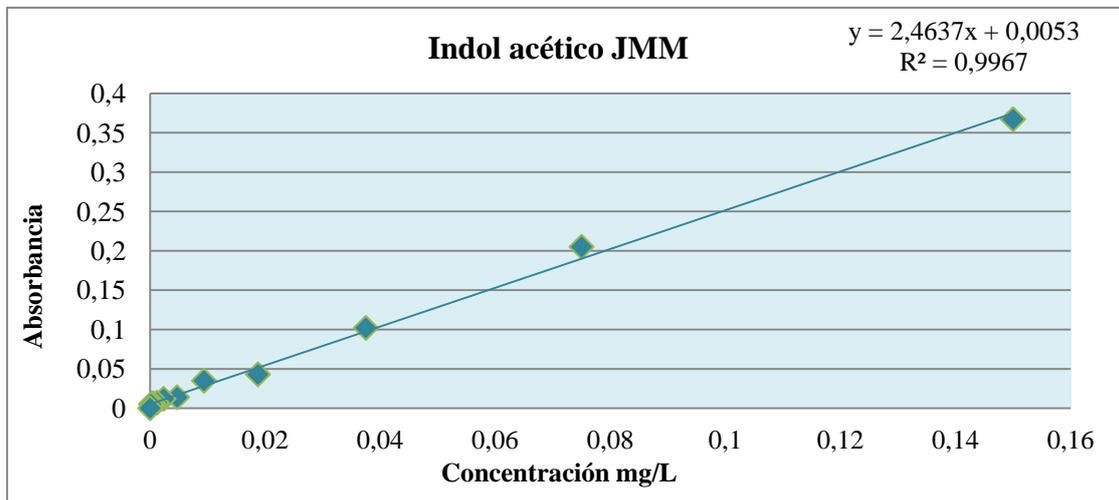
**Tabla 19. Medio final y concentración de triptófano a suplementar al medio JMM base.**

Medio final	Suplemento a solución base	g/L
Medio Triptófano (Sigma®)	L-Triptófano	0,167

- Una vez inoculados los viales con 100 µl de la solución bacteriana, se incuban a 28°C durante 5 días, en completa oscuridad. Es recomendable realizar tres repeticiones por cepa bacteriana, para poder realizar con posterioridad una media de los resultados obtenidos.
- Transcurrido este tiempo, se recoge el sobrenadante separándolo mediante centrifugación.
- Se añade 500 µl de agente Salkowski (2mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5M + 98mL de HClO<sub>4</sub> al 35% (Gordon and Weber 1951)) al sobrenadante, en proporción 2:1 (2 sobrenadante: 1 agente Salkowski). Se esperan 15-20 minutos antes de realizar la medida.
- Los medios donde existe producción de ácido indolacético se tornan de color rosado o rojizo una vez añadido el agente Salkowski, cuya concentración es cuantificada por medio de reacción colorimétrica. La medición de la intensidad de color se realiza utilizando un espectrofotómetro de absorción ATI Unicam 8625 (Mattson®, EEUU) a una longitud de onda de 550 nm.
- La cantidad de producción de indol acético se determina por comparación con una recta patrón estándar (tabla 20) utilizando un gráfico estándar de AIA (gráfico 1).

**Tabla 20. Recta patrón estándar: medida de las concentración en función de la absorbancia.**

Concentración mg/L	Abs 550 nm
0,15	0,367
0,075	0,205
0,0375	0,102
0,01875	0,043
0,009375	0,035
0,004688	0,014
0,002344	0,012
0,001172	0,007
0,000586	0,006
0,000293	0,006
0,000147	0,005
0	0



**Gráfica 1. Gráfico estándar de AIA. Para obtener la concentración de indol acético producida por nuestras cepas, es necesario sustituir la “x” con cada una de las absorbancias medidas.**

#### 4.3.2. Vía cuantitativa.

También se determinó la capacidad para producir ácido indolacético mediante cromatografía líquida de HPLC, empleando como detección espectrometría de masas/masas por ionización de electrospray con detección en modo positivo. El límite de detección se estableció en 2 ng/mL. Este análisis fue realizado en el Servicio de Análisis elemental, Cromatografía y Masas de la Universidad de Salamanca.

Para obtener la muestra que se lleva a analizar se siguen los siguientes pasos:

- El análisis se realiza siguiendo los pasos anteriormente realizados en el apartado 2.3.1 hasta el período de incubación.

- Pasados los 5 días de incubación a 28°C se homogeniza la muestra, tras lo cual se recoge 1,5 mL del medio incubado y se centrifuga durante 1 minuto a 10.000 rpm.
- El sobrenadante obtenido se esteriliza por filtración empleando filtros de un tamaño de poro de 22µm (Millipore®, Amicon, EEUU).
- El filtrado líquido obtenido se guarda en eppendorfs o viales y se lleva a analizar.

\* En ningún momento hay que añadirle el agente Salkowski.

#### 4.4. Solubilización de fosfato.

La capacidad para solubilizar fosfato fue evaluada en el medio YED-P (tabla 21) de acuerdo con Peix *et al.*, (Peix et al. 2004).

- Los aislados se inoculan en placas de YED-P que se incubaron a 28°C durante 3-4 días.
- Transcurrido el tiempo de incubación se observa la presencia o ausencia de halos de solubilización en cada una de las placas.

**Tabla 21. Composición del medio YED-P para determinar la solubilización de fosfato.**

YED-P	g/L
Extracto de levadura (Difco®)	20
Glucosa (Panreac®)	20
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (Panreac®)	20
Agar (Conda®)	20

Del mismo modo se realizó un ensayo de todos los aislados en agar de Pikovskaya (Tabla 22) (Sundara Rao, *et al.*, 1963; Subba Rao, 1977) para contrastar los resultados obtenidos en medio YED-P.

**Tabla 22. Composición del medio agar de Pikovskaya para determinar la solubilización de fosfato.**

Pikovskayas Agar	g/L
Extracto de levadura (Difco®)	0,500
Glucosa (Panreac®)	10,000
Ca <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (Panreac®)	5,000
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,500
KCl (Panreac®)	0,200
MgSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,100
MnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) (Panreac®)	°
FeSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,0001
Agar (Conda®)	15,000

#### 4.5. Determinación cualitativa de la producción de celulosa.

La capacidad para producir celulosa fue evaluada utilizando el medio de cultivo YMA (tabla 6) convencional al que se le agregó 25 mg/l de Rojo Congo. El Rojo Congo es un compuesto capaz de unirse a polímeros de 1,4- $\beta$  glucosa y comúnmente utilizado para la detección de celulosa. Los pasos a seguir son los que se detallan a continuación:

- Sobre la superficie del medio se pone 5 $\mu$ l de suspensión bacteriana, con asa calibrada o con ayuda de una pipeta.
- La suspensión bacteriana se recoge de un cultivo líquido o sólido que no tenga un crecimiento mayor a 4-5 días.
- Las placas se incuban durante un período de 3 días a 28°C.
- Una vez reveladas las placas se fotografían.
- Es conveniente guardar las placas crecidas a 4°C durante 1 o 2 días para intensificar el color de las colonias crecidas y positivas.
- Las colonias que presentan una coloración rojiza, serán positivas. La intensificación del color será más o menos intensa dependiendo de la mayor o menor capacidad que tenga cada cepa de producir dicho biopolímero.

#### 4.6. Detección de la actividad celulolítica.

La actividad celulolítica se determinó utilizando como sustrato carboximetil celulosa sódica, CMC (viscosidad media, Sigma®), un compuesto soluble derivado de la celulosa, utilizado para la valoración de la actividad 1,4- $\beta$ - glucanásica. Los pasos a seguir son los que se detallan a continuación:

- El primer paso de esta determinación es inocular tubos con 5ml de medio YMB (Tabla 23). Estos tubos se inculan a 28°C, a 180 rpm, durante 72 horas.
- Pasado este tiempo, se colocan sobre la superficie de una placa de doble agar, 10  $\mu$ l del cultivo.
- Las placas inoculadas se incuban entre 3, y 5 días a 28°. El período de incubación depende del crecimiento que tengan la cepa o cepas a estudiar.
- Pasado este período de incubación las placas se lavan con agua para eliminar las células. Si las colonias permanecen muy agarradas al agar, se puede utilizar un asa calibrada desechable para terminar de soltarlas.
- Se añade Rojo Congo al 0.1% (p/v) durante 30 minutos. El colorante debe cubrir bien toda la superficie del agar y por consiguiente de las colonias crecidas.
- Se retira el colorante y se añade NaCl 1M. Debe cubrir también toda la superficie del agar.
- Una vez retirado el NaCl, las zonas donde hubo hidrólisis enzimática del sustrato no se habrán teñido con Rojo Congo.

Preparación de placas de doble agar:

- ❖ Capa de abajo: añadir a la placa de petri de 9 cm de diámetro 15 ml de medio YMA, compuesto por: agarosa al 0.7% (p/v). Dentro de la cabina de flujo laminar, se deja solidificar durante 10 minutos.
- ❖ Capa de arriba: sobre la capa de abajo se añaden 5 ml de medio YMA, compuesto por: agarosa al 0.5% (p/v) + CMC al 0.2% (p/v) en PCA 100 mM a pH 5. Se deja solidificar.

Las placas deben prepararse al menos 24 horas antes de su utilización.

**Tabla 23. Composición del medio YMB.**

YMB	1L (Agua destilada, c.s.p.)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Fluca®)	0,5 g.
MgSO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,2 g.
NaCl (Fluca®)	0,1 g.
Manitol (Fluca®)	10,0 g.
Extracto de levadura (Difco®)	0,2 g.

#### **4.7. Determinación de la formación de biofilms *in vitro*.**

Los ensayos relacionados con la formación de biofilms se llevaron a cabo de dos formas diferentes.

##### **4.7.1. Determinación de la formación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.**

La formación de los biofilms en placas de microtitulación de poliestireno se llevaron a cabo según Fujishige *et al.* (Fujishige et al. 2006). Este método se utilizó para determinar la capacidad de adhesión bacteriana a sustratos abióticos permitiendo realizar estimaciones cuantitativas. A continuación se detallan los pasos que se llevaron a cabo.

- Tener las cepas que se vayan a estudiar frescas de 3-4 días, según el período de crecimiento de las mismas.
- El primer paso es preparar un pre-inóculo incubando los cultivos bacterianos en medio YMB a 28°C con agitación orbital a 180 rpm, durante 4 días, hasta alcanzar la fase de latencia.
- La absorbancia del cultivo que se debe alcanzar es de aproximadamente 2,0 medida a una densidad óptica de 600nm.

- Pasados esos días, se centrifuga el pre-inóculo a 3500 rpm durante 20 minutos, tras lo cual se elimina el sobrenadante y se añade sobre el pellet resultante 4 ml de medio YMB, tras lo cual se hace una resuspensión.
- Al final se debe obtener una D.O. de cultivo de 0,2 medida a 600nm de 0.2 (aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml).
- Las placas de PVC se inoculan con 100  $\mu$ l del cultivo con una D.O. de 0,2 de cada cepa correspondiente, dentro de los pocillos individuales de PVC de las placas (Falcon, 3911, Dickinson Becton, Franklin Lakes, Nueva York). Es necesario rellenar pocillos con YMB sin inocular, que serán los control sin inocular. Para inocular las placas podemos ayudarnos de una pipeta multicanal.
- Las placas se incuban a 28°C durante 24 y 72 horas sin agitación. Si se desea, es posible realizar una tercera medición a las 48h.
- Después de cada tiempo, se elimina el medio girando rápidamente la placa hacia abajo, con un golpe seco.
- Se agrega a cada pocillo 100  $\mu$ l de una solución al 0.3% de cristal violeta (Sigma®), incubando durante 10 minutos.
- Se elimina el colorante de la misma forma que en el paso anterior, con un golpe seco.
- Se realizan 3 lavados consecutivos con 200  $\mu$ l de agua destilada, esperando 5 minutos entre cada lavado y posteriormente desechando el agua con un golpe seco de la placa
- Se deja secar durante 1 hora en la campana de extracción a temperatura ambiente.
- Pasado ese tiempo, se agrega 100  $\mu$ l a cada pocillo de una solución de etanol:acetona en una proporción 4:1, homogeneizando muy bien. Se esperan 15-20 minutos.
- Por último, se cuantifica mediante medición de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido).
  
- Es recomendable limpiar la placa, tras cada golpe seco realizado en el cual se descarta el líquido sobrante, especialmente con el colorante cristal violeta. De esta manera se evitan restos que pudieran quedar en las paredes de los pocillos y de la superficie de la placa y que puedan alterar las mediciones posteriores.

#### **4.7.2. Determinación de la formación de biofilms en vidrio.**

Los pasos que se realizaron para la consecución de esta determinación, se detallan a continuación:

- Tener las cepas que se vayan a estudiar frescas de 3-4 días, según el período de crecimiento de las mismas.
- Es importante tener preparado con antelación el material a emplear. Se introduce un portaobjeto previamente lavado, en primer lugar con jabón y posteriormente con etanol 70%, y esterilizado por calor húmedo, dentro de un tubo falcon® de 50 ml.

- A continuación, se prepara un pre-inóculo en tubos con 3 ml de YMB, hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a 600nm.
- Sobre cada falcon® se agrega 25 ml de medio YMB, cuando se tratan de cepas bacterianas, y de YED para el caso de otros géneros bacterianos diferentes a los rizobios (emplear el medio de cultivo más adecuado según las cepas con las que se esté trabajando). Sobre estos 25 ml se añade 1 ml del pre-inóculo anteriormente preparado.
- Se deja una muestra como control negativo, sin inocular.
- A continuación se incuban a 150 rpm, 28°C durante 3 días, pasados los cuales se sacan cuidadosamente (evitando las zonas de crecimiento bacteriano) cada uno de los portaobjetos de su correspondiente falcon®, para poder observarlos con el microscopio de fluorescencia. En nuestro estudio quisimos ver la producción de biofilms a los 3 días post inoculación; pero este tiempo es variable según el microorganismo de estudio.
- Se sumergen los portaobjetos en una solución de naranja de acridina 0.010% durante 5 minutos. Hay que limpiar cuidadosamente la cara del portaobjetos que no va a ser observado, evitando de esta manera que queden excesos de colorante.
- A continuación se observa cada portaobjetos con el microscopio de fluorescencia.

El naranja de acridina (Panreac®) es un fluorocromo que se liga a macromoléculas polianiónicas, como los mucopolisacáridos, exopolisacáridos y los ácidos nucleicos. Se usa como colorante fluorescente espectralmente similar a la fluoresceína, presentando un máximo de excitación y una emisión a 520 nm (en el verde) y 650 nm (en rojo).

#### **4.8. Quimiotaxonomía.**

Los ácidos grasos celulares fueron analizados usando el sistema de identificación microbiana (MIDI) Sherlock 6.1 y la librería RTSBA6 de acuerdo a las instrucciones técnicas proporcionadas por el sistema (Sasser 1990).

#### **4.9. Fisiología.**

##### **4.9.1. Crecimiento en Diferentes Condiciones de pH, Temperatura y Salinidad.**

Para determinar las características fisiológicas de las cepas pertenecientes a la nueva especie identificada, se realizaron los siguientes estudios:

- Se determinó el intervalo de temperaturas de crecimiento incubando cultivos en medio YMA (tabla 6) a 4, 15, 28, 37 y 45°C.
- El intervalo de pH del crecimiento se determinó en YMB con un pH final de 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Para ajustar el pH de 4 a 6 se utilizó el tampón PCA ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4M + ácido cítrico 0,2M), para ajustar el pH a 7 se utilizó el tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,2M y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2M) y finalmente para ajustarlo a pH 8 y 9 se utilizó tampón TE 0,2M

- La tolerancia a la sal se ensayó en el mismo medio (YMA) que contenía 0,5, 1, 1,5, 2 y 2,5% (p / v) de NaCl.

#### **4.9.2. Resistencia Natural a Antibióticos.**

La resistencia a antibióticos fue evaluada sobre placas con medio YMA en el que se redujo la proporción de agar de un 2 a un 1,5% para permitir la difusión de los antibióticos. Sobre estas placas se extendió, con ayuda de un hisopo estéril, cada uno de los aislados y cepas de referencia y encima se colocaron en condiciones asépticas discos conteniendo diferentes tipos y concentraciones de antibióticos (\*).

La sensibilidad de una cepa ante una determinada concentración de un antibiótico se aprecia por la presencia de halos de mayor o menor tamaño rodeando los discos, en los que el microorganismo no crece.

\*Los discos contenían los siguientes antibióticos: ampicilina (2  $\mu\text{g}$ ), eritromicina (2  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacina (5  $\mu\text{g}$ ), penicilina (10 IU), polimixina (300 IU), cloxacilina (1  $\mu\text{g}$ ), oxitetraciclina (30  $\mu\text{g}$ ), gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ), cefuroxima (30  $\mu\text{g}$ ), netilmicina (30  $\mu\text{g}$ ) y neomicina (5  $\mu\text{g}$ ), (Becton Dickinson, BBL).

#### **4.9.3. Producción de Actividades Enzimáticas.**

La producción de exoenzimas en sustratos de PNP se llevó a cabo según Velazquez PNP (Velazquez et al. 2001).

- Para llevar a cabo este estudio se utiliza un conjunto de sustratos enzimáticos compuesto por 32 sustratos comerciales de la casa Sigma® (EEUU) que contienen paranitrofenol como grupo cromogénico (Tabla 24).
- Los sustratos cromogénicos se resuspenden en tampón fosfato 0,2M a pH=7,0, excepto los que requieren pH=8,5 que se resuspenden en tampón Tris-HCl 0,2M y los que requieren pH=5,0 que se resuspenden en tampón acetato 0,2M.
- Los sustratos ya disueltos se conservan congelados a -20° C.
- La detección de los enzimas se realiza sobre placas multipocillo utilizando 25  $\mu\text{L}$  de sustrato y 50  $\mu\text{L}$  de una suspensión de células procedente de un cultivo de 6-7 días a 28 °C en placas con medio Bergensen modificado sin indicador.
- Las placas se incubaron a 28 °C durante 36 horas.
- Al cabo de ese tiempo se añade 100  $\mu\text{L}$  una solución de carbonato sódico al 1%, con el objeto de alcalinizar la mezcla de reacción e intensificar el color amarillo del paranitrofenol, que aparece cuando los sustratos son hidrolizados.

**Tabla 24. Sustratos para la detección de producción de enzimas**

PNP Acetato	PNP – $\alpha$ - D - galactopiranosido
PNP – hidrosuccinimida	PNP – $\beta$ - D - galactopiranosido
PNP – N – acetil - $\beta$ - D - galactosaminido	PNP – $\alpha$ - D - galacturónido
PNP – N – acetil - $\alpha$ - D - galactosaminido	PNP – $\alpha$ - D - glucopiranosido
PNP – $\beta$ - L - arabinosa	PNP – $\beta$ - D - glucopiranosido
PNP – $\alpha$ - L - arabinosa	PNP – $\alpha$ - D - glucurónido
PNP – $\alpha$ - D – celobiosido	PNP – $\beta$ - D - lactopiranosido
PNP – D – fenilalanina	PNP – $\alpha$ - D - maltopiranosido
PNP – fosfato pH 5,0	PNP – $\beta$ - D - maltopiranosido
PNP – fosfato pH 7,0	PNP – $\alpha$ - D - manopiranosido
PNP – fosfato pH 8,5	PNP – $\beta$ - D - manopiranosido
PNP – bis - fosfato pH 7,0	PNP – $\alpha$ - L - ramnopiranosido
PNP – bis - fosfato pH 8,5	PNP – sulfato
PNP – nitrofenil fosforilcolina	PNP – tioglucopiranosido
PNP – $\alpha$ - L - fucopiranosido	PNP – $\alpha$ - D - xilopiranosido
PNP – $\beta$ - D - fucopiranosido	PNP – $\beta$ - D - xilopiranosido

#### 4.9.4. Test fisiológicos y bioquímicos utilizando sistemas comerciales.

Para determinar las características fisiológicas y bioquímicas de las cepas identificadas dentro de la nueva especie, se realizaron los siguientes ensayos.

- La caracterización fenotípica se realizó, tal y como se describió recientemente (Lorite et al. 2016), usando las galerías API 20NE y API ID32GN inoculadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante y añadiendo  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  estéril al medio suministrando hasta una concentración de 0,2g/L con la ayuda de una pipeta Pasteur desechable. Los resultados se leyeron después de 7 días de incubación a 28°C.
- Además de estos tests se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa tal y como previamente se había descrito en otros estudios, así como la producción de ácido a partir de manitol que se estudió en medio líquido de Bergersen (1991).

## 5. Determinación y caracterización de biopolímeros.

### 5.1. Determinación cualitativa de la producción de celulosa a partir de células bacterianas, ensayos de floculación y tratamiento con celulasas de los agregados.

Los ensayos de floculación se utilizan como método indirecto para cuantificar el grado de agregación de las cepas de estudio (Da Re et al. 2007).

- Para la realización de este ensayo partimos de matraces con 30 ml de cultivo

- líquido, en este caso YMB, al tratarse de cepas rizobianas.
- Los matraces se inoculan con 1 µl de cultivo bacteriano fresco (con un asa de siembra desechable de 1 µl).
  - Por cada cepa a analizar se hacen dos ensayos en paralelo: uno que solo llevará los 30 ml de cultivo líquido y otro al que se le añadirá, a los 30 ml de cultivo líquido, 25 mg/L de Rojo Congo.
  - Los matraces inoculados se incuban 3-4 días (dependiendo de la velocidad de crecimiento que tengan las cepas a analizar) a 28°C con agitación orbital a 180 rpm.
  - Pasados estos días se fotografían los matraces y se dejan en reposo durante 24h, pasadas las cuales se fotografiaran de nuevo.
  - A continuación se recogen dos muestras de 5 ml de los flóculos de matraz que no lleva Rojo Congo y se centrifugan a 3500 rpm durante 5 minutos.
  - Desechamos el sobrenadante y echamos sobre el pellet formado 5 ml de PCA 100 mM pH5 con el fin de lavar bien los flóculos.
  - Se centrifuga nuevamente a 3500 rpm durante 5 minutos.
  - Se retira el sobrenadante y se echa sobre el pellet nuevamente 5 ml de PCA 100 mM pH5.
  - Sobre una de las dos muestras recogidas se añade 10 U/ml de celulasa comercial de *Trichoderma viride* (Sigma®) resuspendida (se define 1U como la cantidad de celulasa que libera 1 µg de glucosa por hora a 37°C y pH 5) en PCA 100 mM pH5. Para un volumen de 5 ml hay que añadir 555 µl de enzima.
  - Como control negativo se utiliza la segunda muestra de 5 ml recogida que se resuspende en dicho tampón pero sin la enzima.
  - Ambas muestras se incuban durante 2 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Antes de la incubación ambas deben presentar los flóculos característicos de la cepa de estudio.
  - Tras dicho tiempo se comprueba la ausencia o presencia de flóculos en suspensión.
  - Se fotografían los resultados.

Los matraces que llevan incorporado en el medio YMB los 25 mg/L de Rojo Congo se utilizan para observar la formación de flóculos formados, así como el grado de adhesión de los biopolímeros formados a la pared del matraz. También es conveniente dejar reposar 24 horas, para que se depositen los flóculos y poder tomar mejor las fotografías.

## 5.2. Purificación de celulosa.

El ensayo de purificación de celulosa se llevó a cabo según (Brown and Romanovicz 1976; Chao et al. 2000) con algunas modificaciones.

- Se inoculan 400 ml de medio líquido, en nuestro caso YMB al tratarse de cepas rizobianas, con 40 µl de un cultivo sólido fresco. Nos podemos ayudar de un asa de siembra desechable de 20 µl. utilizar un matraz de 1 L para favorecer la oxigenación del cultivo, favoreciendo su crecimiento.

- Este inóculo se incuba a 28°C a 120 rpm, durante 3-4 días (según la velocidad de crecimiento de la cepa; en términos generales hasta que llegue a fase estacionaria).
- Opcionalmente se puede tomar 1 ml de cultivo y medir la D.O. a 600 nm, con el fin de observar el crecimiento que ha tenido la cepa durante su incubación.
- Después se centrifuga el contenido de todo el inóculo a 3500 rpm durante 20 minutos.
- Se desecha el sobrenadante, quedándonos únicamente con el pellet obtenido, sobre el cual echaremos 30 ml de NaOH (Panreac®) 0.1N.
- Se incuba la muestra a 80°C durante 20 minutos, pasados los cuales agregan 6 ml de CH<sub>3</sub>COONa (amresio) 0.5M en proporción 1:5.
- Se centrifuga nuevamente la muestra a 3500 rpm durante 20 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y añadir sobre el pellet obtenido 30 ml de agua destilada y centrifugar de nuevo a 3500 rpm durante 20 min.
- Este paso se repite 3 veces para lavar bien el pellet.
- Después del tercer lavado se guarda la muestra en frascos pequeños de cristal a -80°C durante 24 horas.
- Pasado dicho tiempo se liofiliza la muestra durante 24 horas, pasadas las cuales se pesará la muestra liofilizada.
- El siguiente paso será resuspender el liofilizado obtenido en 30 ml de C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (ácido trifluoroacético) 0.5N. A partir de este paso trabajaremos con material de vidrio por el peligro que entraña trabajar con C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>.
- Se incuba la muestra a 37°C durante 3 horas, pasadas las cuales se centrifuga la muestra a 3000 rpm durante 30 minutos.
- Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet con 30 ml de C<sub>2</sub>HF<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, 2N.
- Se incuba nuevamente la muestra a 37°C durante 3 horas pasadas las cuales se vuelve a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Desechamos el sobrenadante y lavamos el pellet con 30 ml de agua destilada centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Como anteriormente, repetiremos el lavado tres veces, para lavar bien la muestra.
- Por último se guarda la muestra a -80°C durante 24h para posteriormente volver a liofilizar la muestra durante 24 h, pasadas las cuales pesaremos nuevamente el liofilizado obtenido.

Tras las hidrólisis alcalina y ácida, y sus correspondientes liofilizaciones, obtendremos nuestra muestra limpia de restos e impurezas, para poder realizar las sucesivas determinaciones físicas.

### **5.3. Determinación física mediante Rayos X.**

Una vez realizado el proceso de purificación de celulosa descrito en el apartado 4.2., se envió junto con dos controles positivos Avicel (celulosa insoluble) y CMC (celulosa soluble), 0.1g de cada una de las muestras al servicio general de difracción de rayos X de la Universidad de Salamanca, donde se realizó el análisis con la ayuda de un difractómetro de polvo cristalino (Bruker D8 advance) con un paquete de programas

DIFFRAC Tplus para la adquisición y evaluación de datos de difracción.

#### **5.4. Ensayos de espectroscopia infrarroja (FTIR).**

Otra pequeña muestra de cada una de las muestras, junto con los controles positivos Avicel y CMC, se analizó mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) gracias al departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Salamanca. Las muestras fueron tratadas con sal de bromuro de potasio (KBr) para realizar una fina pastilla. Este compuesto se caracteriza por no presentar absorbancia en el espectro infrarrojo, por lo que las líneas obtenidas del análisis de las muestras de estudio serán exclusivamente de las mismas. Los espectros de FT-IR se registraron utilizando un Bruker espectrómetro (EQUINOX 55, Alemania) en la transmitancia de modo con una resolución de 1 cm<sup>-1</sup> en el intervalo de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup>.

#### **5.5. Promoción de la producción de PHAs.**

El colorante Rojo Nilo fue usado para desarrollar un simple y sensible método de tinción para detectar ácidos polihidroxialcanoatos en colonias bacterianas en crecimiento. Los pasos a seguir son los siguientes:

- El colorante Rojo Nilo se disuelve en DMSO y se adiciona directamente al medio fundido, previo a la inoculación a una concentración final en el medio de 0.5 µg/ml.
- Las cepas, una vez inoculadas, son incubadas durante como mínimo 5 días a 28°C; pero dependerá del tiempo de crecimiento de las bacterias y del tiempo que tarden las que resulten positivas en producir PHAs. Por lo que es aconsejable dejarlas varios días.
- La fluorescencia resultante se visualiza bajo Lámpara UV ( $\lambda$  excit. 312 nm). Las cepas que muestren fluorescencia como resultado de la posible combinación del colorante con material lipofílico, son seleccionadas como cepas positivas para la producción de PHB (Spiekermann et al. 1999; Bello Gil and Brandl 2007)

Los siguientes medios (tabla 25) se pueden utilizar para promover la producción de PHAs en placas:

**Tabla 25. Medios de cultivo utilizados para promover la producción de PHAs en placas.**

\* **Medio 1** (Borah et al. 2002); **Medio 2** (Banziger et al. 2001); **Medio 3** (Gouda et al. 2001); **Medio 4** (Senior et al. 1972); **Medio 5** (Berlanga Herranz et al. 2006); **Medio 6** (Bergey 1994).

Medio 1	g/L	Medio 2	g/L	Medio 3	g/L	Medio 4	g/L
Sacarosa	20	Glucosa	10	Fructosa	20	Glucosa	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2	NH <sub>4</sub> Cl	0,5	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,07	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,3	CaCl <sub>2</sub>	0,11
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,3	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,012
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,02	EDTA	0,01	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5	NaMoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,01
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,01	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6	NaHCO <sub>3</sub>	0,5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Agar	15	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9	Citrato Férrico	0,05	NaCl	0,4
		Extracto de Levadura	1,0	Agar	15	Agar	15
		Agar	15				

Medio 5	g/L	Medio 6	g/L
Glucosa	5	Glucosa	10
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	6,7	Peptona	2,5
NaCl	10	Extracto de levadura	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5	NaCl	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	0,1	Extracto de carne	0,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2	Agar	15
Citrato ferroso de amonio	0,06		
Agar	15		

### 5.6. Extracción e identificación bioquímica de PHAs producidos por bacterias.

Para realizar la extracción e identificación bioquímica de los PHAs producidos por las bacterias, se siguió el método gravimétrico de Saranya *et al.* (Saranya et al. 2012) con algunas modificaciones.

- Primero se lleva a cabo la preparación de la biomasa bacteriana. Para ello se realiza un preinóculo en 400 mL de Medio mínimo líquido (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L; extracto de levadura 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.02 g/L; Sacarosa 30 g/L). Es aconsejable utilizar un matraz de 1L para favorecer la oxigenación del cultivo.
- El medio inoculado se incuba durante aproximadamente 7 días a 28°C y 180 rpm. La temperatura se adecúa según el microorganismo de estudio.
- Para comprobar la presencia de los gránulos citoplasmáticos es aconsejable realizar una preparación microscópica, fijando sobre la superficie de un portaobjetos una gota de la suspensión líquida y a continuación visualizándola

con el microscopio de fluorescencia.

- A continuación se centrifuga el cultivo a 3200 rpm durante 10 minutos.
- El pellet obtenido se lava tres veces con agua destilada, seguido por un lavado alternativo con 0.5M NaCl y agua destilada.

La composición de los monómeros de PHAs de las muestras liofilizadas se llevó a cabo en el instituto de Microbiología de la Academia de las Ciencias de la República Checa, de acuerdo a Brandl (Brandl et al. 1988).

## **6. Técnicas histológicas y microscópicas.**

### **6.1. Cortes histológicos de nódulos. Azul de Toluidina.**

El protocolo de tinción con Azul de Toluidina fue realizado en el Servicio de Patología Diagnóstica / Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca:

- Se procesan los nódulos fijados en formaldehído al 4% durante 18 – 24 horas y embeben en un bloque de parafina\* (procesador Tissue- Tek TEC de Sakura®). En un primer lugar, se sumerge la muestra en formol durante 30 minutos. Inmediatamente después, la muestra se somete a una serie creciente de alcoholes-xiloles de una hora de duración cada pase. Posteriormente se embeben en parafina, cambiándola cada hora y 20 minutos.
- A continuación se realizan cortes de 2 - 3 micras en el microtomo. Se introducen los cortes en la estufa a 60°C.
- El siguiente paso consiste en desparafinar los cortes con una serie decreciente de xiloles-alcoholes-H<sub>2</sub>O.
- Se añade la solución de azul de toluidina (0,01% de Azul de Toluidina en H<sub>2</sub>O destilada) hasta cubrir toda la muestra durante 30 segundos a 1 minuto.
- Se retira el colorante.
- A continuación se lava con H<sub>2</sub>O destilada.
- Se introducen los portas en una serie creciente Alcohol-Xilol 1:1.
- Finalmente se aclaran en Xilol (3 veces) y se montan con DPX.

### **6.2. Microscopía óptica.**

Se utilizó para visualizar colonización e infección temprana así como los cortes de nódulos en azul de toluidina. Se utilizó un microscopio óptico Leica FW400.

Para la visualización de nódulos enteros se utilizó una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800).

### 6.3. Microscopía de fluorescencia.

Las bacterias marcadas con GFP y RFP se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse 80i. También se utilizó para ver los ensayos de colonización e infección con dichas bacterias fluorescentes a tiempos cortos de inoculación.

## 7. Ensayos en plantas.

### 7.1. Material vegetal.

En este trabajo se utilizó la leguminosa *Lotus corniculatus*. Las semillas son de la variedad Leo y las comercializa la casa comercial Batllé.

### 7.2. Ensayos de nodulación en sistema hidropónico.

Estos ensayos se realizaron de acuerdo a protocolos estándar descritos por Vincent (Vincent 1970). En primer lugar se llevó a cabo la escarificación y posterior esterilización de las semillas, siguiendo los siguientes pasos:

- Las semillas de *L. corniculatus* se esterilizan sumergiéndolas en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (puro) durante 12 minutos para escarificarlas.
- Se realizan sucesivos lavados con agua destilada estéril. Asegurarse que las semillas quedan bien lavadas con agua destilada estéril; el agua debe quedar transparente, sin restos del ácido.
- A continuación se esterilizan las semillas en hipoclorito sódico (lejía) al 2,5%, durante 10 minutos, pasados los cuales se hacen sucesivos lavados con agua destilada estéril. Asegurarse que quedan bien lavadas.
- Se dejan embebiendo las semillas durante 3-4 horas en agua destilada estéril.
- Posteriormente se colocan sobre placas de agar-agua para su pregerminación.
- Se dejan en oscuridad a 28°C durante como máximo 24 horas.

Por otro lado se preparan tubos con medio Fåhreaus (tabla 26) para la realización del ensayo.

**Tabla 26. Composición del medio Fåhreaus modificado.**

Reactivos	Cantidad en g/L (1X)	Cantidad en g/L (10X)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0,12	1,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Panreac®)	0,10	1,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Panreac®)	0,15	1,5
Citrato férrico (Panreac®) *	1mL	10 mL
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Codex)	1mL	10 mL
Solución de oligoelementos (tabla 27) *	1mL	10 mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 50mM (Sigma) *	3.20g	32.0g

\*Estos reactivos se preparan a parte y se añaden después del autoclavado.

- Es aconsejable realizar un stock del medio a 10X con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , el cual se mantendrá estéril y guardado a 4°C.
- Tras realizar la dilución al 1X se añade la solución de oligoelementos (tabla 27) y el citrato férrico, previamente esterilizados.

**Tabla 27. Composición de la solución de oligoelementos.**

Solución de oligoelementos	Cantidad para 200mL (1mg/mL)
$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	200 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	200 mg

\*Todos los oligoelementos empleados son de la casa comercial Panreac.®

- A continuación se preparan al menos 15 tubos por tratamiento, con 20 ml de medio Fåhreaus hasta ahora preparado.
- Se introduce en cada tubo un papel de filtro de 15 x 1,5 cm previamente esterilizado.
- Los tubos se cierran con tapones, hechos de algodón y envueltos en gasa, previamente esterilizados. Se autoclava todo de nuevo.
- A continuación se añade a cada tubo  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (tabla 26), previamente esterilizado.

Una vez preparado el material a utilizar se comienza con la realización del ensayo:

- Sobre cada papel de filtro se coloca una semilla. Nos podemos ayudar para colocarlas de un asa de siembra desechable de 10 µL.
- A continuación se introduce, con ayuda de un asa desechable, una semilla pregerminada por tubo, colocándola de tal manera que la raíz quede mirando hacia abajo del tubo.
- Se introducen los tubos en capuchones, realizados con papel opaco. Este capuchón debe cubrir la mitad del tubo y hará las veces de “suelo”.
- A continuación se colocan los tubos con las semillas ya introducidas, en cámara iluminada durante una noche.
- Al día siguiente, se inocula cada tubo con 1mL de una suspensión D.O.600 0,5 de la cepa correspondiente.
- Se mantienen en cámara iluminada a una temperatura de 24°C, con un fotoperíodo 16/8 y un 60% de humedad relativa.
- Se hace una visualización de los tuboscada 48-72 horas, contando el número de nódulos hasta los 30 días posteriores da la inoculación.
- Pasados dichos días se observan y fotografian los nódulo con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800).
- Los nódulos se pueden guardar en formaldehído (Sigma®) al 4% para realizar cortes histológicos (apartado 5.7).

- Se mide el porte aéreo y radicular de cada una de las plantas y se fotografían
- ❖ Se utilizaron 15 plantas por experimento y se realizaron dos controles: un control negativo de semillas sin inocular y sin Nitrógeno y un segundo control positivo de semillas sin inocular y con Nitrógeno.
- ❖ Tener cuidado al manejar el  $H_2SO_4$ . Siempre que se deseche el ácido, debe hacerse sobre una cama de agua, para evitar que se produzca una reacción exotérmica de calor.

### **7.3. Ensayos de colonización e infección en placa cuadrada.**

Estos ensayos, llevados a cabo en placa cuadrada, se realizaron para observar la colonización e infección de cepas individuales, así como las coinoculaciones.

- El primer paso es sembrar las cepas a inocular con el fin de que estén frescas para el día de la inoculación.
- Se preparan las placas cuadradas (10x10 cm) con medio Fahraeus modificado (1X) con agar, o bien con agar-agua (1,5%).
- Una vez que el medio está sólido, se corta la parte superior del agar, con el fin de dejar una cámara de aire para la parte aérea de la planta. Se coloca papel Whattman estéril del tamaño adecuado al tipo de placa encima de medio recién cortado.
- Se esterilizan y pre-germinan las semillas. Hay que tener en cuenta el tipo de semilla para realizar la correspondiente esterilización.
- Se colocan 4-5 semillas pre-germinadas por placa cuadrada. Se debe tener en cuenta el tamaño y el peso de las mismas.
- A continuación se inocula con 500  $\mu$ L/planta de una suspensión de la cepa a ensayar a una D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Para ello se resuspende el cultivo fresco de la cepa en cuestión en 20 mL de Fähræus modificado 1X hasta llegar a la D.O. requerida.
- Se coloca otro papel Whattman estéril del tamaño adecuado encima de las semillas.
- Posteriormente se sellan las placas con parafilm y se coloca un papel opaco que hará las veces de “suelo”.
- Las placas se mantendrán de forma vertical en cámara iluminada a una temperatura de 24°C, un fotoperíodo 16/8 y un 60% de humedad relativa.
- Las plantas se observarán al microscopio óptico, de fluorescencia o confocal (según finalidad del ensayo) a tiempos determinados.
- Es conveniente realizar un control de plantas sin inocular.

#### 7.4. Ensayos de invernadero.

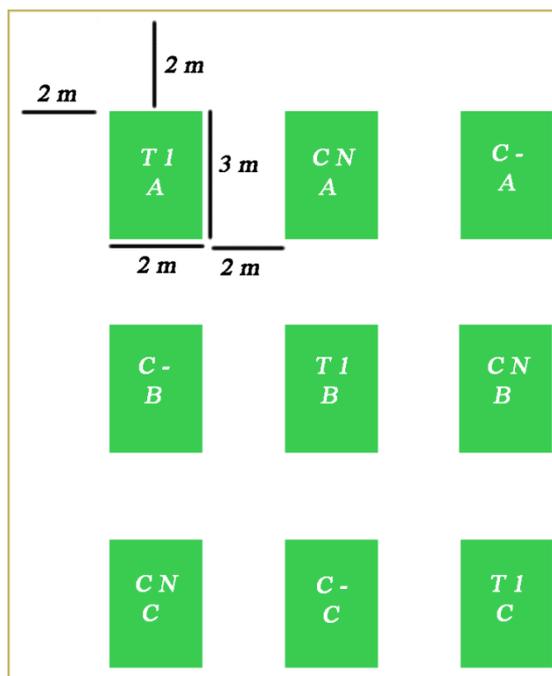
Estos ensayos se desarrollaron dentro del Servicio de Invernadero del Parque Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL), situado dentro de las instalaciones del Instituto Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias (CIALE).

- Primero se esterilizan y pre-germinan las semillas.
- En el caso de la planta *L. corniculatus*, se ponen 5 semillas en macetas de 2,5L. En el presente trabajo, las macetas se llenaron de tierra procedente de tierra de La Armuña. Cada bandeja contenía 6 macetas.
- Las semillas se protegen con film transparente durante 2-3 días.
- Cada semilla se inocula con 1mL de una suspensión D.O.600 0,5 de la cepa correspondiente (5mL/maceta).
- Se mantuvo bajo condiciones controladas de invernadero durante 6 semanas.
- Las plantas fueron regadas 2-3 veces a la semana y fueron fertilizadas con fertilizante NPK (20:20:20); 20g/L de riego (H<sub>2</sub>O).
- Pasadas seis semanas se fotografiaron y se pesó la parte aérea de las plantas en fresco.
- Se secaron las plantas en estufa a 60°C durante 4-5 días noche entre papeles de filtro.
- Una vez que las plantas estuvieron completamente secas se tomó el peso seco de la parte aérea.
- A continuación, una muestra representativa y molida se envió al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC para llevar a cabo la determinación de contenido en Nitrógeno total y de otros macro/microelementos.
- Se llevó a cabo el tratamiento estadístico de los resultados.

#### 7.5. Ensayos de campo.

Este ensayo se llevó a cabo en una tierra procedente de La Armuña, en el término municipal de Negrilla de Palencia.

- Se realizaron tres réplicas por tratamiento.
- Cada réplica constó de una superficie de 2x3 metros, con un margen de 2 metros alrededor de cada una (figura 14).



**Figura 14. Ejemplo representativo de la distribución realizada de las parcelas en el ensayo de campo. T1: tratamiento 1; C N: control sin inocular y fertilizado; C-: control negativo, sin inocular.**

- Cada parcela fue sembrada con 5 hileras de semillas homogéneamente sembradas.
- A continuación cada parcela fue inoculada con aproximadamente 1,5L de suspensión bacteriana a una densidad de D.O.600 0,6.
- Las parcelas se regaron con una periodicidad de 2-3 veces a la semana.
- El primer corte se realizó a los 4 meses de la siembra; el segundo tras dos meses desde el primer corte del cultivo.
- Los tratamientos “control +” fueron fertilizados (con un fertilizante NPK) en el momento de la floración de la planta.
- A continuación, una muestra representativa y molida se envió al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC para llevar a cabo la determinación de contenido en Nitrógeno total y de otros macro/microelementos.
- Se llevó a cabo el tratamiento estadístico de los resultados.

## **8. Análisis del suelo.**

Se recogieron dos muestras representativas de suelo antes y después de realizar los tratamientos del ensayo de campo.

Posteriormente, y como se realizó con anterioridad en los análisis de plantas, se enviaron las muestras al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC para llevar a cabo la determinación de contenido en Nitrógeno total y de otros macro/microelementos.



RESULTADOS  
*y*  
DISCUSIÓN



Estudio de la biodiversidad  
bacteriana en nódulos de  
*Lotus corniculatus*.



CAPÍTULO I



## 1. Aislamiento de microorganismos.

Las cepas bacterianas fueron aisladas de 35 nódulos efectivos, de color rosáceo, de tres plantas de *Lotus corniculatus* recogidas en el estadio de floración. Se obtuvieron 90 cepas que fueron aisladas y seleccionadas en medio YMA e YED, donde se colonias de diversa apariencia morfológica. Recibieron la nomenclatura CSLC, seguida de un número de ordenación.

Las colonias que presentaban una apariencia mucosa y con una tonalidad ligeramente transparente o blanquecina se aislaron en medio YMA, representando el 45% del total aproximadamente. La apariencia viene conferida por el exopolisacárido que producen las cepas en este medio (figura 15Q), siendo su morfología redondeada, convexa y opaca.

Las colonias que presentaban una morfología y textura diferente a la anterior, fueron aisladas en medio YED, después de comprobar que éste era el medio donde mejor crecían. Estas cepas eran muy heterogéneas presentando algunas de ellas una consistencia más dura y grumosa y con tendencia a anclarse con fuerza al agar, mientras que otras presentaban una consistencia más algodonosa y blanda. En estas cepas, la coloración era variada encontrándonos con cepas de tonos blancos, amarillos, anaranjados o rojos (figura 15 A-P y F).

Sin duda, a priori observamos que la diversidad de bacterias que encontramos en el interior de nódulos de *Lotus corniculatus* es mayor que la descrita en la bibliografía hasta la fecha, dónde principalmente se habla de *Mesorhizobium* como bacteria endosimbionte que ocupa los nódulos de la planta. La morfología típica del género *Mesorhizobium* es la que encontramos en nuestro grupo mayoritario (figura 15Q).

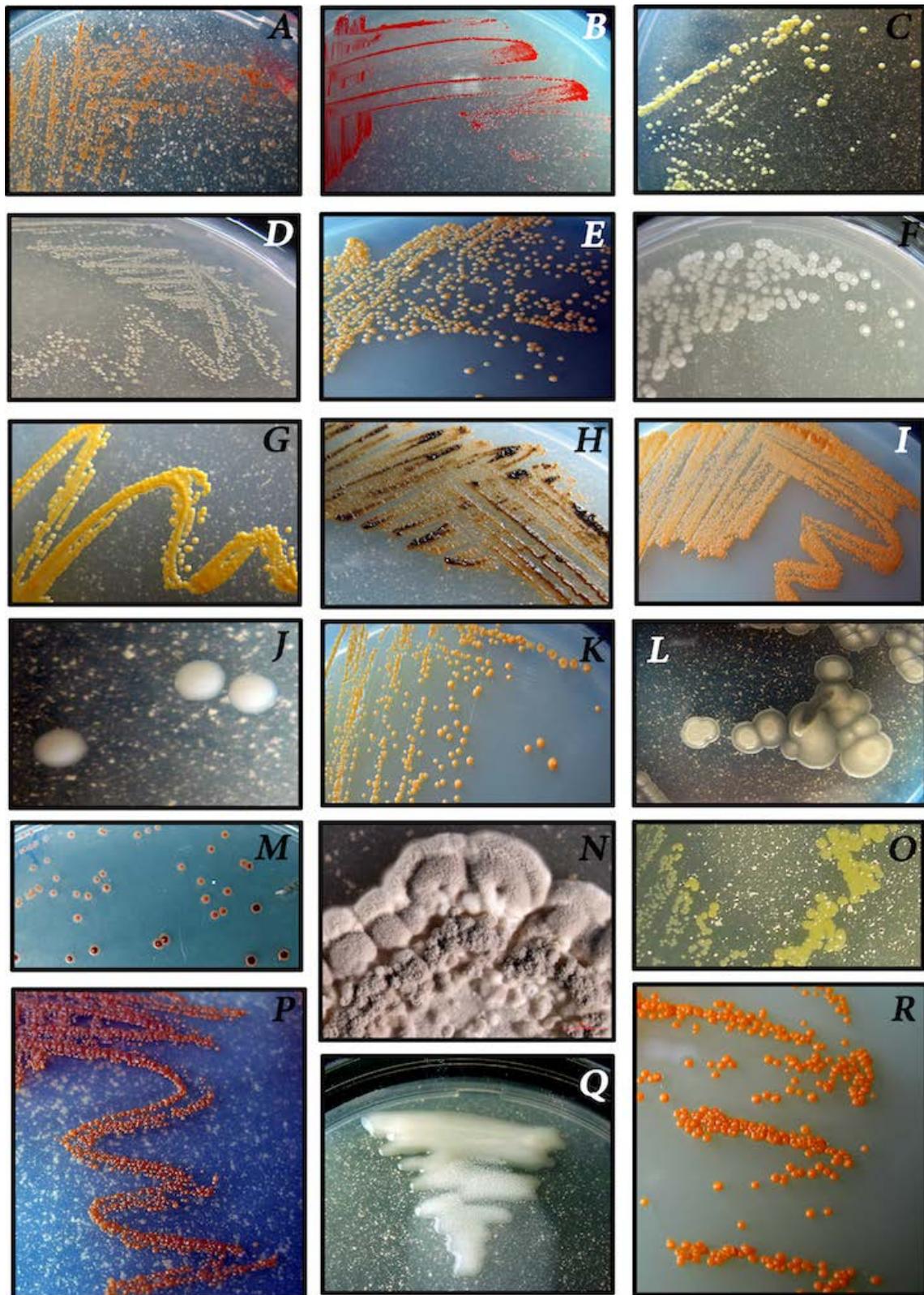


Figura 15. Imágenes realizadas con cámara fotográfica (Nikon) donde se pueden observar la morfología presentada por las diferentes cepas. CSLC 90N (I) y en medio YED-P las cepas CSLC53N (A), CSLC47N (B), CSLC54N (C), CSLC62N (D), CSLC92N (E), CSLC56N (F), CSLC93N (G), CSLC94N (H), CSLC87N (I), CSLC81N (J), CSLC89N (K), CSLC70N (L), CSLC90N (M), CSLC57N (N), CSLC67N (O), CCSLC98N (P), CSLC38N (Q) y CSLC107N (R).

## 2. Caracterización genotípica.

### 2.1. Análisis de la biodiversidad mediante perfiles de RAPD.

El análisis de perfiles de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) destaca entre las técnicas utilizadas actualmente para el análisis de la diversidad genética bacteriana como una de las más útiles, ya que nos permite estudiar genomas complejos sin un conocimiento previo de los mismos. Es un método basado en la amplificación al azar mediante PCR de diversas secuencias del ADN distribuidas a lo largo de todo el genoma y que funcionan como marcadores moleculares. Los fragmentos de ADN obtenidos son separados por electroforesis en gel de agarosa proporcionando perfiles de bandas que generalmente varían entre distintas cepas de una misma especie (de la Puente-Redondo et al. 2000).

El empleo de un único primer (Mulcahy et al. 1993) puede ser suficiente para analizar la variabilidad entre cepas. El primer M13 fue el empleado en nuestro estudio. Está formado por 15 pb y permite amplificar, en condiciones poco restrictivas, distintas regiones del ADN.

Decidimos realizar el análisis de los perfiles RAPD en dos grupos diferentes, en función de la apariencia morfológica existente entre las 90 cepas aisladas.

En un primer grupo se realizó el análisis de los perfiles RAPD para los 52 aislados del estudio que no presentaron un aspecto mucoso y por el contrario su aspecto fue muy diverso morfológicamente.

Los resultados obtenidos para las 52 cepas, se muestran en la figura 12 donde se observa que el tamaño de las bandas obtenidas en todos los casos varía entre 0.3Kb y 2.5Kb. De esta manera, observando el dendrograma obtenido de perfiles RAPD (Figura 16), podemos afirmar que a nivel general, las cepas aisladas, a pesar de provenir de un único suelo y de un nicho ecológico muy concreto, presentan una elevada diversidad genética.

A continuación, se realizó un análisis de los aislados utilizando el programa Bionumerics, aplicando el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento UPGMA, obteniendo el dendrograma que se observa en la figura 16. Basándonos en este dendrograma y tomando un porcentaje de similitud aproximado del 80%, se establecieron 33 grupos.

Los resultados obtenidos analizando los perfiles de RAPD ponen de manifiesto la alta diversidad genética de las cepas aisladas de nódulos de *Lotus corniculatus*, que puede ser característica de los suelos salmantinos donde dichas plantas fueron recogidas. No obstante, a pesar de la indudable utilidad de estos perfiles para el análisis de la diversidad en bacterias, se debe tener en cuenta que pueden ser muy diferentes entre cepas de la misma especie. Esto supone un problema para agrupar las cepas a

niveles taxonómicos actualmente admitidos como son el de especie o subespecie, por lo que se llevó a cabo el análisis de los perfiles de TP-RAPD, que no son dependientes de cepa (Rivas et al. 2001).

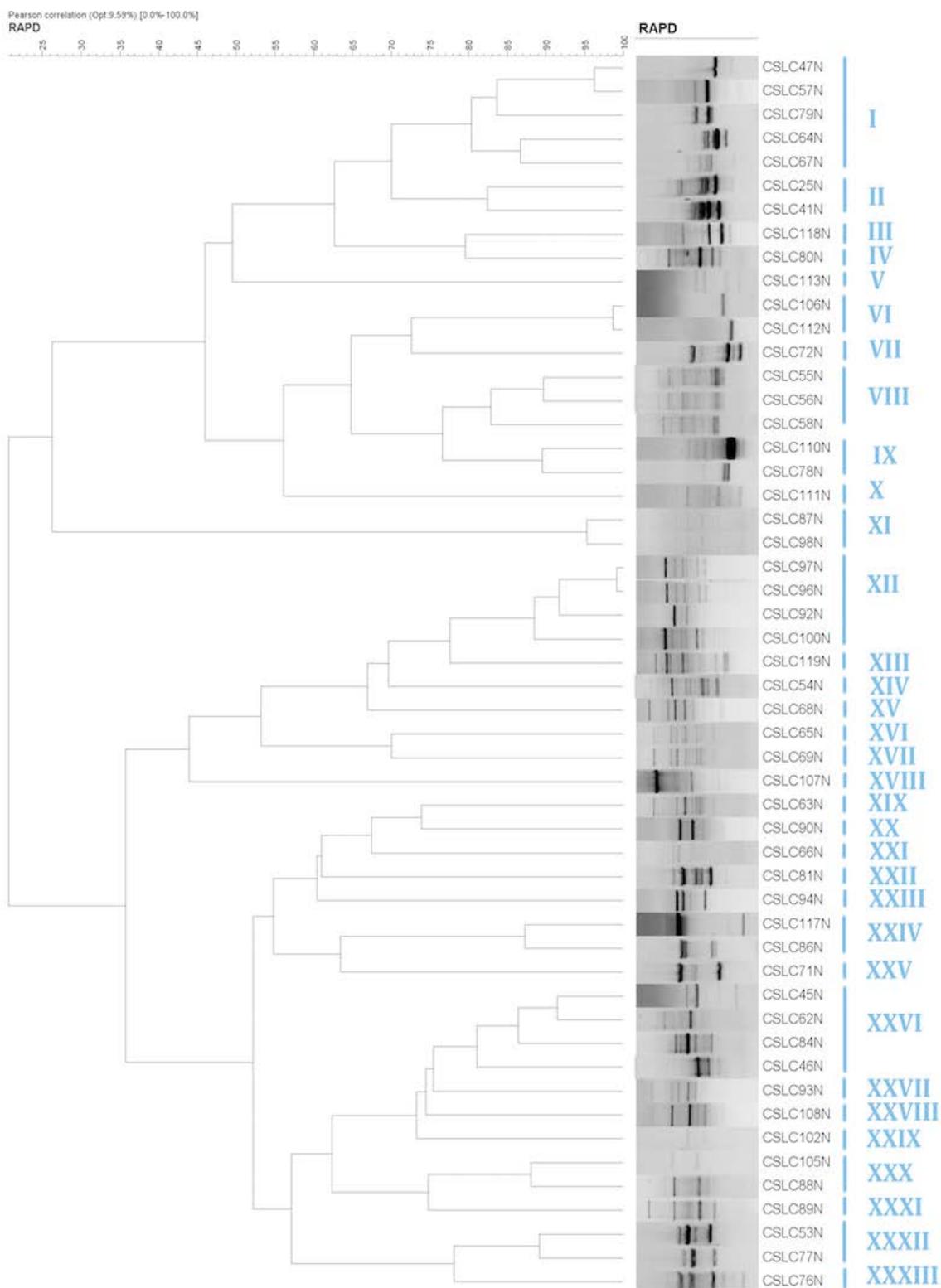
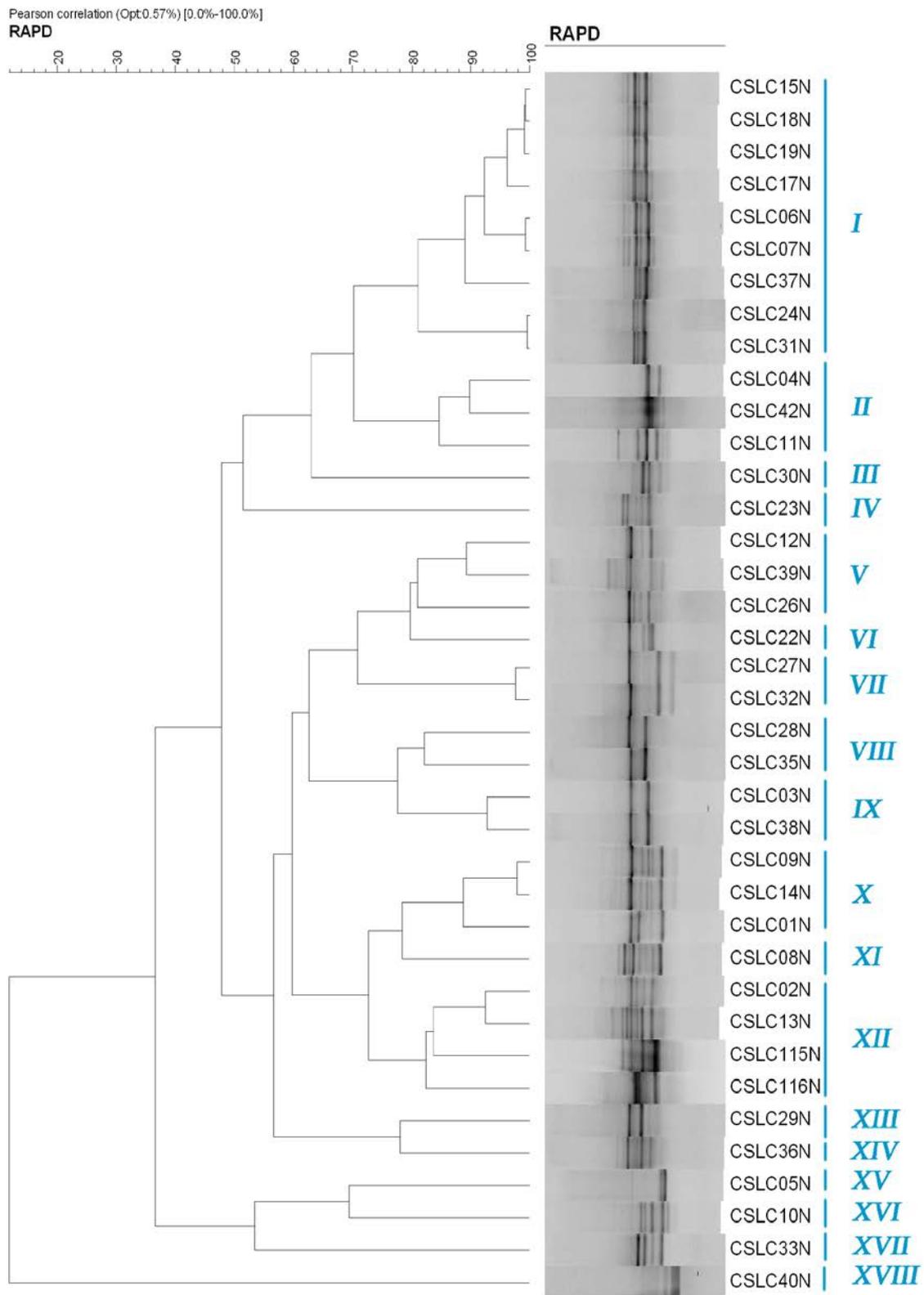


Figura 16. Dendrograma de las cepas endófitas aisladas en el presente estudio analizadas por M13-RAPD basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

Las cepas que presentaban un aspecto morfológico característico de especies pertenecientes al género *Mesorhizobium*: colonias redondeadas, de color blanquecino y, por lo general, muy mucosas, fueron analizadas de forma independiente a las cepas endófitas. Mediante este análisis, las 38 cepas endosimbiontes analizadas se diferenciaron, según sus perfiles, en XVIII grupos diferentes (figura 17). El objetivo de realizar esta técnica era poder observar la variabilidad de cepas existentes dentro de este grupo de bacterias del género *Mesorhizobium* (Mulcahy et al. 1993; de la Puente-Redondo et al. 2000).

La biodiversidad genética de las cepas endosimbiontes de *L. corniculatus* se intuye elevada por el número de grupos obtenidos. Sin embargo, como hemos visto anteriormente al realizar el análisis de las cepas endófitas, los perfiles pueden ser muy diferentes entre cepas de la misma especie. Por ello, nuevamente volvimos a realizar un análisis de los perfiles TP-RAPD, que no son dependientes de cepa.



**Figura 17.** Dendrograma de las cepas simbióticas analizadas por M13-RAPD basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

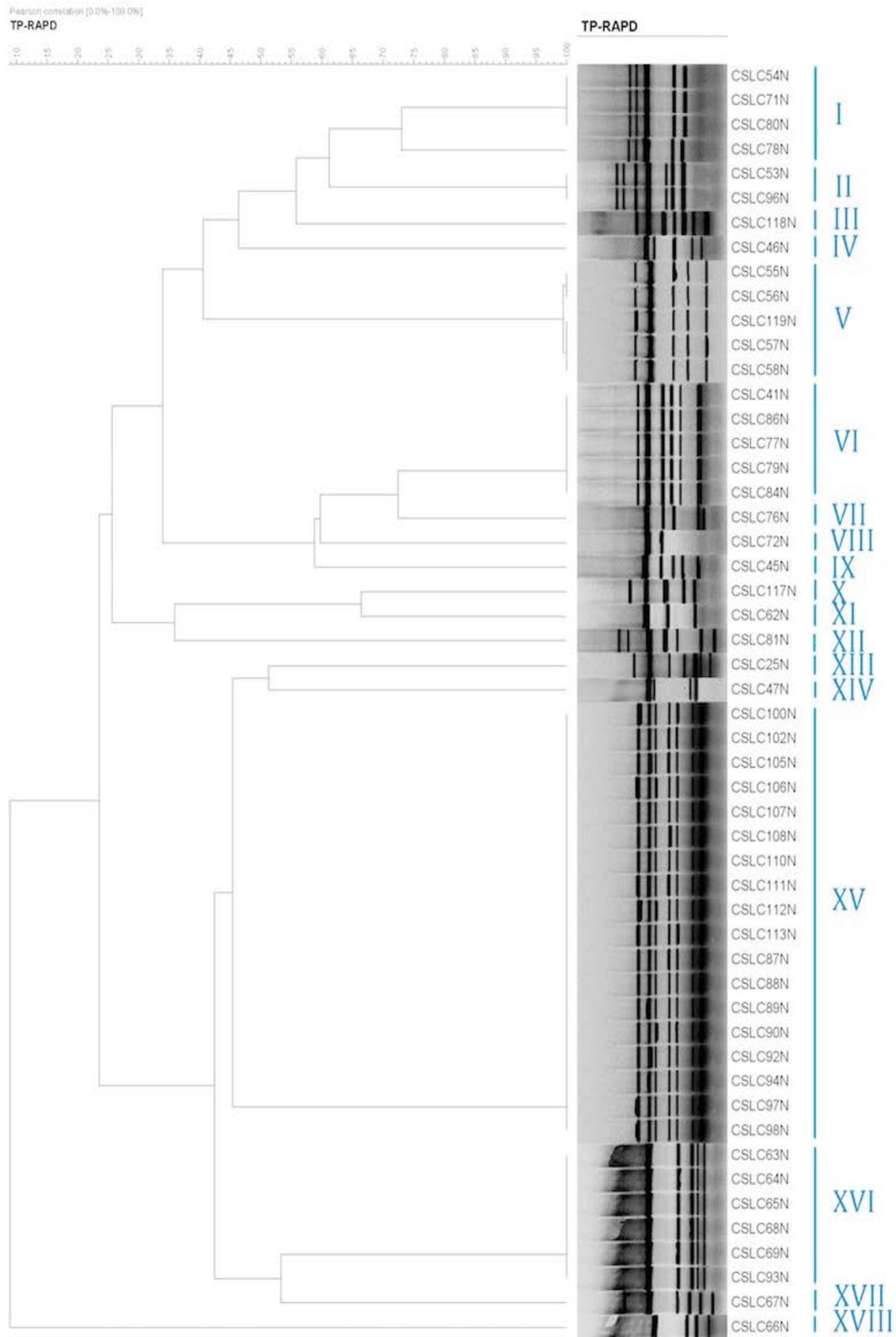
## 2.2. Análisis de los perfiles de TP-RAPD.

En los últimos años se han descrito procedimientos de PCR que utilizan primers basados en la secuencia del ADN ribosómico 16S con los que se obtienen productos de reacción que, una vez separados electroforéticamente, generan perfiles de bandas de ADN y son específicos de especie o subespecie (Rivas et al. 2001). Por ello, estos métodos resultan adecuados para clasificar los aislados de una población, ya que se asegura la agrupación de las cepas a niveles aceptados en taxonomía, permitiendo seleccionar representantes de cada grupo para secuenciar su ADN ribosómico 16S y así determinar las relaciones filogenéticas con taxones establecidos. Dentro de este grupo de técnicas, se incluye el análisis de los perfiles de TP-RAPD que presenta una serie de ventajas como es su repetitividad y su potencial de agrupamiento de cepas bacterianas a nivel de especie y subespecie. Esta técnica se basa en la utilización de dos tipos de parejas de primers diseñados en diferentes posiciones de la secuencia del gen ribosómico 16S. En nuestro estudio utilizamos los primers 879F y 1522R, que tienen un alto contenido en G+C y que ya han sido utilizados anteriormente para el análisis de poblaciones de bacterias (Rivas et al. 2002).

Como realizamos en el apartado anterior en el análisis de los perfiles RAPD, las cepas se analizaron en dos grupos diferentes, divididas por su clara y diferente apariencia morfológica.

Los resultados de este análisis nos permitieron clasificar los 52 aislados endofíticos en 18 grupos (a partir de ahora designados mediante números romanos), con perfiles TP-RAPD diferentes (figura 18). Es destacable señalar que la variabilidad de los perfiles TP-RAPD se ha reducido a casi la mitad con respecto a los perfiles RAPD. De esta forma podemos observar que esta técnica permite agrupamientos a niveles superiores a cepa, lo cual resulta una gran ventaja a la hora de realizar estudios taxonómicos. Entre los XVIII grupos establecidos en este estudio, podemos destacar por encima de los demás el grupo XV, dentro del cual se agruparon 18 cepas con similar perfil TP-RAPD. El grupo XVI, con 6 cepas con similar perfil TP-RAPD, fue el segundo grupo en extensión. Por debajo se encuentran los grupos I, V y VI con 4, 5 y 5 cepas respectivamente en cada uno. Las restantes cepas están distribuidas, de forma individual, entre los restantes grupos; a excepción del grupo II, representado por dos cepas con similar perfil.

Los resultados obtenidos en los perfiles de TP-RAPD, apuntan la gran diversidad existente en relación a las especies de bacterias que pueden localizarse en el interior de los nódulos de *Lotus corniculatus* y que se desconocía hasta la fecha. Sin embargo, esta hipótesis debe ser confirmada, y para verificarla es necesario analizar los aislados mediante pruebas adicionales. Una de las principales pruebas que podemos aplicar es la secuenciación del gen ribosómico 16S, ya que esta técnica es una herramienta de elección cuando se trata de identificar cepas a nivel de género por lo que sin duda revelará la verdadera identidad de nuestros aislados.



**Figura 18. Dendrograma de las cepas endófitas de este estudio analizadas por TP-RAPD, basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.**

Teniendo en cuenta los XVIII grupos establecidos en base a los perfiles TP-RAPD, podemos intuir que existen, al menos, 18 especies o subespecies diferentes. Por ello se seleccionó un representante por cada grupo, a excepción de los mencionados grupos más numerosos, I, V, VI, XV y XVI de los cuales se escogieron varios representantes, para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S.

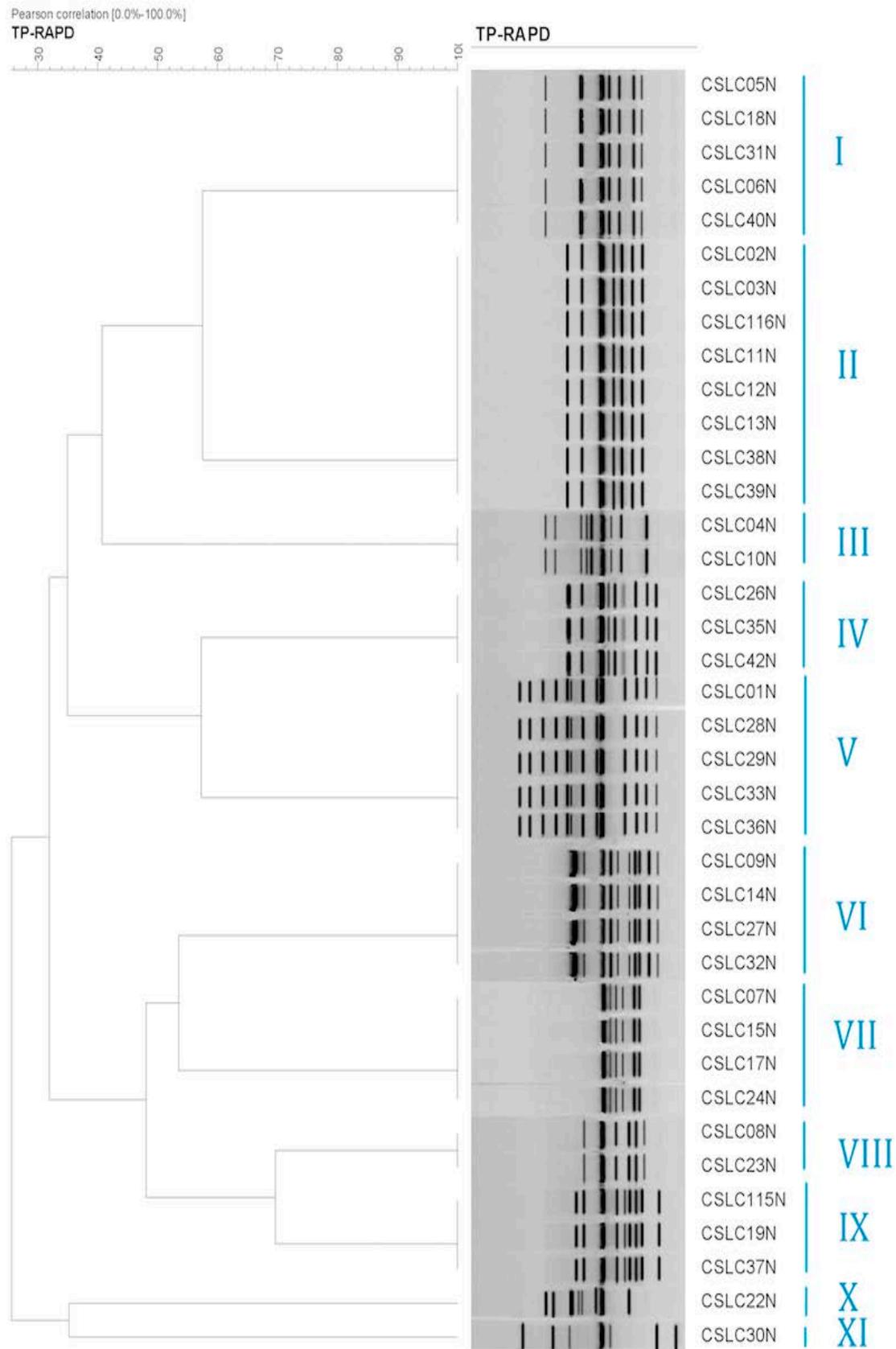
A continuación, realizamos el análisis de los perfiles TP-RAPD de las 38 cepas restantes aisladas de nódulos de *L. corniculatus* con el fin de averiguar la diversidad de especies existentes dentro de este segundo grupo.

Los resultados obtenidos de este análisis nos permitieron clasificar los 38 simbiontes aislados en 11 grupos (a partir de ahora designados mediante números romanos) diferentes (figura 19). Nuevamente observamos como la variabilidad de perfiles de TP-RAPD obtenidos con respecto a los perfiles de RAPD, se reduce; confirmando, una vez más, que esta técnica resulta ventajosa al realizar agrupamientos a niveles superiores a cepa.

El grupo más numeroso resultó ser el II, con 8 cepas agrupadas con similares perfiles. Le siguen los grupos I y V, con 5 cepas cada uno, y los grupos VI y VII con 4 cepas. A continuación tenemos dos grupos con tres cepas cada uno, el IV y el IX y finalmente los grupos III, X y XI con 2, 1 y 1 cepas, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podemos concluir que nuestros aislados pertenecen a once especies diferentes, lo cual ya supondría toda una revelación, al encontrar especies diferentes nodulando los nódulos de *L. corniculatus*, diferentes a las actualmente descritas como endosimbiontes de dicha leguminosa: *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015b).

Seleccionamos un total de 22 cepas, representantes de los diferentes grupos TP-RAPD obtenidos, para llevar a cabo la secuenciación del gen ribosómico 16S, dada la heterogenicidad de perfiles obtenidos.



**Figura 19.** Dendrograma de las cepas simbióticas de este estudio analizadas por TP-RAPD, basado en el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson.

### 2.3. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S.

Actualmente, la clasificación filogenética de las bacterias está basada en la comparación de las secuencias del gen ribosómico 16S. Este método fue introducido en la sistemática bacteriana como una herramienta de clasificación basada en la filogenia molecular que revolucionó la taxonomía (Ludwig y Schleifer, 1994).

El análisis filogenético de las secuencias del gen ribosómico 16S se usó para conocer la relación de las cepas con respecto al resto de cepas del género dentro del que se encuadran. Este proceso se llevó a cabo utilizando el programa informático Mega 5.0 (Tamura et al. 2011) con el que se calculó las distancias evolutivas y se construyó el árbol filogenético. Previamente se utilizó el programa ClustalX, con el que se alinearon las secuencias. Además se utilizó el programa Phydit para realizar las matrices de similitud de las secuencias del gen ribosómico 16S. En las figuras 20, 21 y 22 se muestra un análisis filogenético basado en el método de Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2. En estos tres árboles filogenéticos se incluyeron las cepas secuenciadas, representantes de los diferentes grupos TP-RAPD, así como aquellas cepas tipo con las cuales tuvieron un porcentaje de similitud más próximo, de acuerdo con los resultados de comparación en el Genbank.

Los dos grupos establecidos en los análisis de los dos perfiles realizados en los dos apartados anteriores, RAPD y TP-RAPD, se siguieron manteniendo para realizar el análisis filogenético del gen ribosómico 16S.

En primer lugar fueron analizadas las cepas endófitas, que fueron agrupadas en 18 perfiles diferentes de TP-RAPD. El análisis de las cepas secuenciadas nos llevó, a su vez, a dividir este grupo tan heterogéneo en tres filos diferentes, razón por la cual se realizaron tres árboles filogenéticos diferentes, con el objetivo de analizar mejor los resultados por separado: Phylum *Proteobacteria* (figura 20), Phylum *Firmicutes* (figura 21) y Phylum *Actinobacteria* (figura 22).

En el árbol filogenético correspondiente al filo *Proteobacteria* (G-), quedaron englobadas las cepas pertenecientes a los grupos IX, XII, XIII, XIV y XVII de los perfiles TP-RAPD. Casualmente en cada uno de estos grupos únicamente se encuentra una cepa, cada una de las cuales pertenece a un género taxonómico diferente.

Más concretamente, las cepas representantes de los grupos IX, XIII y XIV pertenecen al grupo de las *Alphaproteobacterias*, dentro del orden *Rhizobiales*. Las cepas CSLC45N (grupo IX) y CSLC47N (XIV) pertenecen a la familia *Methylobacteriaceae*. En cambio, la cepa CSLC25N (XIII) pertenece a la familia *Rhizobiaceae*.

La cepa CSLC47N, representante única del grupo XIV, mostró porcentajes de similitud bajos con las especies más relacionadas a ella. Con la especie

*Methylobacterium goesingense* iEII3<sup>T</sup> mostró el porcentaje de similitud más alto con un 99,6%. Por detrás se encuentran *M. gossipiicola* Gh-105<sup>T</sup> con un 99,1% y *M. adhaesivum* AR27<sup>T</sup> con un 99%.

La cepa CSLC45N es la representante única del grupo IX, clasificada en la familia *Methylobacteriaceae*, dentro del género *Roseomonas*. La especie más próxima a dicha cepa es *R. rhizosphaerae* YW11<sup>T</sup> con un 98,3% de similitud. Las siguientes especies que filogenéticamente están más próximas ya muestran con la cepa CSLC45N porcentajes más bajos de similitud comprendidos entre 98-97,8%. Estos datos nos hacen suponer que esta cepa pertenece a una potencial nueva especie del género *Roseomonas*.

En el grupo XIII TP-RAPD nos encontramos la cepa CSLC25N con un 99,1% de similitud con la especie más próxima, *Rhizobium cellulosilyticum* ALA10B2<sup>T</sup>. Las siguientes especies *R. smilacinae*, *R. soli*, *R. yantingense* y *R. kunmingense* se encuentran más alejadas filogenéticamente, con valores de similitud por debajo del 99%.

Por otro lado, las dos cepas representantes de los grupos XVII y XII pertenecen al grupo de las *Gammaproteobacterias*, dentro del orden *Pseudomonales*. La cepa CSLC67N (grupo XVII) se identifica dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, mientras que la cepa CSLC81N (XII) pertenece a la familia *Moraxellaceae*.

La cepa CSLC81N mostró un 100% de similitud con respecto a la cepa tipo *Acinetobacter radioresistens* DSM 6976<sup>T</sup>. Las siguientes cepas relacionadas son *A. calcoaceticus* con un 96,7% (especie tipo del género *Acinetobacter*), *A. venetianus* RAG-1<sup>T</sup> con un 97,5%, *A. indicus* CIP 110367<sup>T</sup> con un 96,8% y *A. refrigeratorensis* WB1<sup>T</sup> y *A. variabilis* NIPH 2171<sup>T</sup>, ambas con un valor de similitud de 96,8%. Concluimos por tanto que la especie CSLC81N pertenece a la especie *A. radioresistens*.

La otra cepa dentro de esta familia, CSLC67N, mostró un 99,9% de similitud con respecto a la cepa *Pseudomonas rhizosphaerae* DSM 16299<sup>T</sup>. Sin embargo, también tuvo un porcentaje alto de similitud con otra cepa próxima, *P. coloeopterorum* Esc2Am<sup>T</sup> con un 99,5%. Con las otras cepas relacionados, los porcentajes ya fueron algo más alejados: *P. graminis* DSM 11263<sup>T</sup> con un 98,8%, *P. lutea* DSM 17257<sup>T</sup> CON UN 98,6%, *P. abietaniphila* ATCC 700689<sup>T</sup> con un 98,5% y *P. aeuruginosa* DSM 50071T con un 94%.

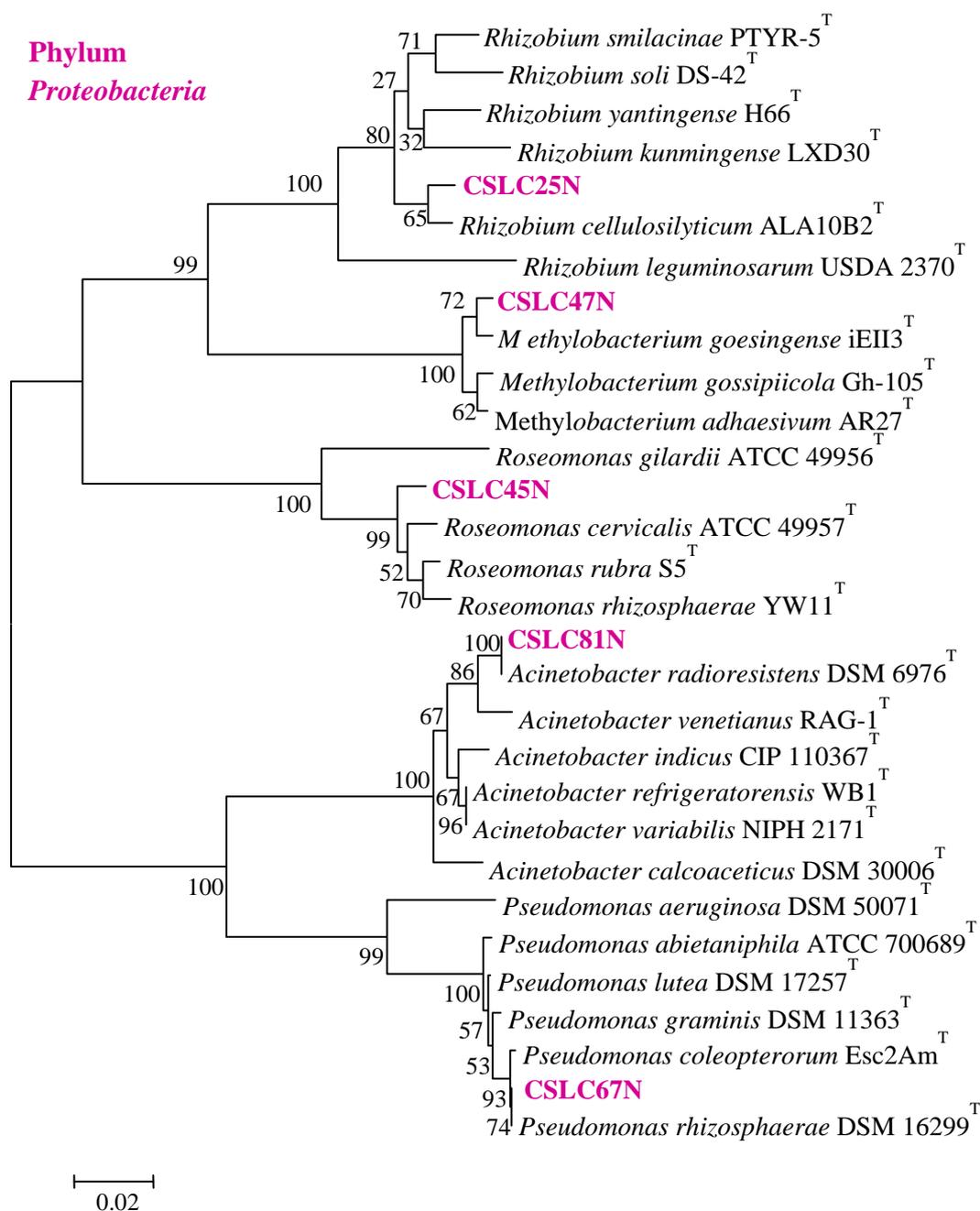


Figura 20. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados identificados dentro del phylum *Proteobacteria* y de las especies tipo más próximas de cada género según la cepa. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

En la figura 21 observamos el segundo árbol filogenético correspondiente al phylum *Firmicutes*, en el que quedaron englobadas las cepas pertenecientes a los grupos VI, VII, VIII, X y XI de los perfiles TP-RAPD. Los grupos XI y X quedaron englobados dentro de la familia *Staphylococcaceae*, con una única cepa representante de estos dos grupos, CSLC62N y CSLC117N respectivamente. Los grupos VII y VIII también están representados por una única cepa en cada uno, CSLC76N y CSLC72N, pertenecientes a las familias *Paenibacillaceae* y *Planococcaceae*, respectivamente. Por último, el grupo VI es el más numeroso con 5 cepas con similar perfiles TP-RAPD y que pertenecen a la familia *Bacillaceae*: CSLC41N, CSLC77N, CSLC79N, CSLC84N y CSLC86N.

Las cepas agrupadas en los 5 mencionados grupos de TP-RAPD, I VI, VII, VIII, X y XI, representan cuatro familias diferentes de la clase *Bacilli*, dentro del orden *Bacillales*.

La cepa CSLC76N (VII) mostró similitudes bajas con las especies más próximas a ella. Con la especie tipo del género, *Paenibacillus polymyxa*, se aleja bastante con un 93,4% de similitud, descartando su pertenencia a dicha especie. Más relacionadas a esta cepa se encuentran las especies *P. oceanisediminis* L10<sup>T</sup> con un 97,9%, *P. tylopili* MK2<sup>T</sup> con un 97,9%, *P. tundrae* A10b<sup>T</sup> con un 98,2%, *P. cucumis* con un 98,6%; y ya más próxima se encuentra la especie *P. amylolyticus* NRRL NRS-290<sup>T</sup> con un 98,6% de similitud. Aunque se hace necesario realizar más análisis para determinar la especie a la que pertenece esta especie, casi con toda probabilidad podemos decir que pertenece a una nueva especie del género *Paenibacillus*.

La cepa del grupo VIII, CSLC72N posee porcentajes de similitud bajos con las especies más relacionadas a ella. Más específicamente tiene un 98,8% de similitud con la especie *Lysinibacillus macroides* LMG 18474<sup>T</sup>, un 98,8% con la especie *L. pakistanensis* NCCP-54<sup>T</sup>, un 98,63% con la especie *L. xylanilyticus* XDB9<sup>T</sup> y un 98,7% con la especie *L. boronitolerans* T-10a<sup>T</sup>. Estos resultados nos hacen pensar que, con toda probabilidad, esta cepa pertenece a una nueva especie del género *Lysinibacillus*.

Las cepas de los grupos XI y X, CSLC62N y CSLC117N, muestran entre sí un 98,4% de similitud. Ambas se engloban dentro del género *Staphylococcus*, pero en diferentes especies. La cepa CSLC62N se identifica dentro de la especie *S. saprophyticus*. Muestra un 99,8% de similitud con la cepa tipo *S. saprophyticus* subsp. *bovis* GTC 843<sup>T</sup> y un 99,9% de similitud con la cepa tipo *S. saprophyticus* supsp. *saprophyticus* ATCC 15305<sup>T</sup>. Próxima a ella y con una similitud de 99,7% encontramos la especie *S. xylosus* ATCC 299971<sup>T</sup>. Con porcentajes más bajos de similitud, descartando por tanto su pertenencia a dichas especies, se encuentran las subespecies de las especies *S. succinus* y *S. aureus*, con porcentajes entre 98,1%-97,2%. La cepa CSLC117N, en cambio, pertenece a la especie *S. succinus*, debido a que presenta un porcentaje de similitud con *S. succinus* subsp. *succinus* AMG-D1<sup>T</sup> del 100% y con *S. succinus* subsp. *casei* SB72<sup>T</sup> del 99,9%. Con el resto de especies pertenecientes a este

género e incluidas en el árbol filogenético (figura 21) se encuentra más alejada filogenéticamente, con porcentajes de similitud comprendidos entre 99,1% y 97,3%.

Por último analizamos las cepas del grupo VI, pertenecientes a la familia *Bacillaceae*. Las cepas CSLC41N y CSLC79N muestran entre sí y con la cepa tipo *Bacillus aryabhatai* B8W22<sup>T</sup> un 100% de similitud. Sin embargo, muestran con la siguiente especie tipo más relacionada a ellas, *B. megaterium* ATCC 14581<sup>T</sup>, un 99,9% y un 99,9% de similitud, respectivamente. Más alejada, se encuentra la especie *B. flexus* NBRC 15715<sup>T</sup> con un 98,9% y un 98,8% de similitud, respectivamente. Filogenéticamente próximas a estas dos cepas, se encuentra la cepa CSLC86N, con un 99,5% de similitud con la cepa tipo *Bacillus aryabhatai* B8W22<sup>T</sup>. Con *B. megaterium* ATCC 14581<sup>T</sup> y *B. flexus* NBRC 15715<sup>T</sup> tiene un 99,2% y 98,4% de similitud, respectivamente. Estos datos nos hacen considerar que sería necesario realizar más estudios para determinar la especie a la que pertenece la cepa CSLC86N.

Dentro de la familia *Bacillaceae* se encuentra la cepa CSLC77N, muy relacionada con las especies *B. butanolivorans* DSM 18926<sup>T</sup> y *Bacillus simplex* NBRC 15720<sup>T</sup>, con las cuales muestra un 99,4% y un 99,2% de similitud. Al igual que en el caso anterior, se debe complementar el análisis del gen ribosómico 16S con otros estudios para clasificar la identificación de esta cepa en una especie concreta.

Por último y dentro de la familia *Bacillaceae*, se encuentra la cepa CSLC84N. Esta cepa muestra porcentajes de similitud muy elevados con las tres especies más relacionadas a ellas y que son *B. wiedmannii* FSL W8-0169<sup>T</sup>, *B. cereus* ATCC 14579<sup>T</sup> y *B. anthracis* ATCC 14578<sup>T</sup> con un 99,9%, de proximidad en cada caso. Sería necesario complementar el análisis del gen ribosómico 16S con otros análisis, para determinar de forma más específica, la especie a la que pertenece dicha cepa.

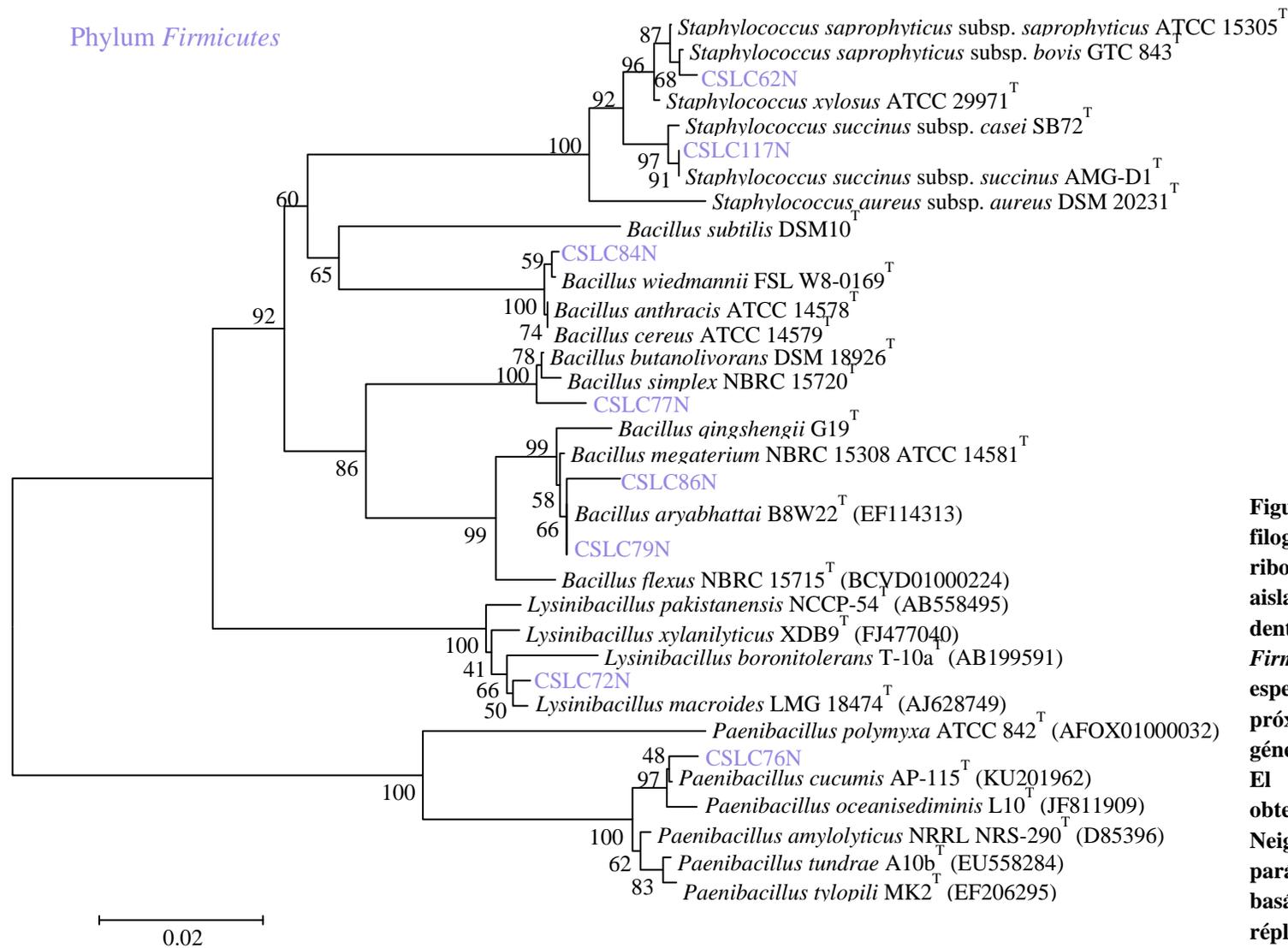


Figura 21: análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados identificados dentro del phylum *Firmicutes* y de las especies tipo más próximas de cada género según la cepa. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

El tercer árbol filogenético (figura 22) muestra la diversidad existente de las bacterias pertenecientes al filo *Actinobacteria*, dentro de la clase *Actinobacteria* y del orden *Actinomycetales*. A su vez, las cepas aisladas en este estudio se clasifican en tres subórdenes diferentes. Dentro del suborden *Micrococcineae*, las cepas se reparten en tres familias diferentes: *Micrococcaceae*, *Dermacoccaceae* y *Microbacteriaceae*. En el segundo suborden, *Streptomycineae*, encontramos la familia *Streptomycetaceae*. Por último, en el suborden *Micromonosporineae* encontramos el mayor número de cepas englobadas en la familia *Micromonosporaceae*.

La familia *Micrococcaceae* está representada por las cepas pertenecientes al grupo I y IV de los perfiles TP-RAPD, CSLC46N, CSLC54N, CSLC71N CSLC78N y CSLC80N, que se desglosan en tres géneros diferentes y que observamos a continuación.

La cepa CSLC46N (I) muestra un porcentaje de similitud respecto a las dos especies más relacionadas a ella, *Arthrobacter agilis* DSM20550<sup>T</sup> y *A. pityocampae* TP2<sup>T</sup>, de 98,4% y 98,0% respectivamente. Estos porcentajes tan bajos nos hacen pensar que con toda probabilidad se trate de una nueva especie del género *Arthrobacter*, que tendría que ser confirmada con estudios adicionales al gen ribosómico 16S.

Dentro del género *Pseudarthrobacter* se identifica la cepa CSLC78N (IV). Esta cepa muestra un porcentaje de similitud del 99,4% con la especie tipo *P. oxydans* KCTC 3383<sup>T</sup> y del 99,4% con *P. polychromogenes* DSM 20136<sup>T</sup>. Con la especie *P. scleromae* YH-2001<sup>T</sup> muestra un porcentaje de similitud más bajo, de 99,4%. Estos porcentajes de similitud nos confirma la idea de que se hace necesario realizar más estudios para confirmar la especie concreta a la que pertenece dicha cepa.

Las cepas CSLC80N y CSLC71N (IV) están próximas entre ellas, con un 99,7% de similitud, identificándose dentro del género *Paenarthrobacter*. La especie más próxima a ellas es *P. nitroguajacolicus* G2-1<sup>T</sup> con un 99,5% de similitud en el caso de la cepa CSLC71N y un 99,4% en el caso de la cepa CSLC80N. La especie *P. aurescens* DSM 20116<sup>T</sup> se encuentra más alejada filogenéticamente de ellas con un 99,3% de similitud con CSLC80N y un 99,3% con CSLC71N. Más alejada filogenéticamente se encuentran con la especie *P. ilicis* DSM 20138 con un 98,8% con la cepa CSLC80N y un 98,7% con la cepa CSLC71N.

El grupo XVI, representante de la familia *Dermacoccaceae*, lo constituyen 6 cepas, de las cuales decidimos identificar 4 por la similitud de sus perfiles. La cepa más próxima en las cuatro cepas fue *Dermacoccus nishinomiyaensis* DSM 20448<sup>T</sup>, pero en cada caso con un porcentaje de similitud diferente. Las cepas CSLC63N y CSLC93N muestran una similitud del 99,8% con dicha especie y en cambio con las otras tres especies de *Dermacoccus* representadas en el árbol filogenético (figura 22), muestran un porcentaje de similitud más bajo, comprendido entre 98,7% y 98,8%. Las cepas

CSLC64N y CSLC68N muestran porcentajes de similitud más bajos con respecto a la especie más próxima a ellas, *Dermaococcus nishinomiyaensis* DSM 20448<sup>T</sup>, del 94,4% y 99,6% respectivamente. La cepa CSLC64N tiene una similitud comprendida entre 98,4-98,5% con las especies *D. barathri* MT2.1<sup>T</sup>, *D. abysssi* MT1.1<sup>T</sup> y *D. profundus* MT2.2<sup>T</sup>; en cambio, la CSLC93N tienen un porcentaje de similitud con estas tres citadas especies de 98,7-98,8%. Por los valores de similitud obtenidos llegamos a la conclusión de que, con toda probabilidad y teniendo en cuenta la similitud de sus perfiles TP-RAPD, las seis cepas que representan dicho grupo pertenecen a la especie *D. nishinomiyaensis*.

La familia *Microbacteriaceae* está representada por dos grupos diferentes, III y XVIII, a su vez englobados en dos géneros distintos.

En el grupo XVIII encontramos una única cepa representante, CSLC66N que se identifica dentro del género *Pseudoclavibacter* con un 99,5% de similitud con la especie más próxima a ella, *P. helvolus* DSM 20419<sup>T</sup>. Muy próxima a ella destaca la especie *P. Terrae* THG-MD12<sup>T</sup>, con un 99,3%. Más alejada filogenéticamente de ella encontramos la especie tipo del género, *P. chungangensis* CAU59<sup>T</sup> con un 96,2% de similitud.

La cepa CSLC118N representa el grupo III y se identifica dentro del género *Microbacterium*. Las dos especies más próximas a ella son *M. saccharophilum* K-1<sup>T</sup> y *M. invictum* DC-200<sup>T</sup> con un 98,7% de similitud en ambos casos. Con porcentajes más bajos de similitud encontramos las especies *M. lacus* A5E-52<sup>T</sup>, *M. flavum* YM18-098<sup>T</sup>, *M. lacticum* DSM 20427<sup>T</sup> y *M. aoyamense* KV-492<sup>T</sup> con porcentajes que oscilan entre 97,7% y 98,6%. Con estos resultados concluimos que la cepa CSLC118N pertenece a una nueva especie del género *Microbacterium*, siendo necesario realizar más estudios para su adecuada identificación.

Cinco son las cepas que representan el grupo V, de las cuales secuenciamos tres de ellas. Las cepas CSLC56N y CSLC57N presentaron una similitud del 100% entre ellas y con las especies tipo *Streptomyces enissocaesilis* NRRL B-16365<sup>T</sup>, *S. plicatus* NBRC 13071<sup>T</sup> y *S. rochei* NBRC 12908<sup>T</sup>. Ambas cepas muestran también mucha proximidad con las especies *S. geysiriensis* NBRC 15413<sup>T</sup> y *S. vinaceusdrappus* NRRL 2363<sup>T</sup> con un 99,9% y 99,9% de similitud respectivamente. La especie más próxima a la cepa CSLC58N es *S. drozdowiczii* NBRC 101007<sup>T</sup> con un 99,7% de similitud. Por debajo y con un 99,2% de similitud se encuentra la especie *S. laculatispora* BK166<sup>T</sup>.

Por último observamos las cepas englobadas en los grupos II y XV, correspondientes a la Familia Micromonosporaceae, a su vez identificadas dentro del género *Micromonospora*. Dentro de estos dos grupos encontramos 22 cepas representantes, de las cuales decidimos secuenciar una cepa representante de las dos cepas que constituyen el grupo II, y once cepas del total de las veinte que constituyen el grupo XV, para una mayor fiabilidad de los resultados.

La cepa CSLC89N se encuentra próxima a varias especies con altos porcentajes de similitud que oscilan de *M. violae* NEAU-zh8<sup>T</sup>, *M. vinacea* GUI63<sup>T</sup> y *M. taraxaci* NEAU-P5<sup>T</sup> con un 99,5% de similitud, a *M. chokoriensis* 2-19/6<sup>T</sup> con un 99,6% y *M. saelicesensis* Lupac 09<sup>T</sup> con un 99,9%. Próximas a las especies *M. vinacea* GUI63<sup>T</sup> y *M. saelicesensis* Lupac 09<sup>T</sup> con un 99,43% de similitud en ambos casos, se encuentra la cepa CSLC90N. Más alejadas a ella se encuentran las especies *M. noduli* GUI43<sup>T</sup> con un 99,2% y *M. profundus* DS3010<sup>T</sup> con un 99,1% de similitud.

Las cepas CSLC97N, CSLC88N, CSLC108N, CSLC96N y CSLC100N se encuentran muy próximas entre sí y con cinco especies diferentes. *M. chokoriensis* 2-19/6<sup>T</sup> es la especie más próxima a ellas con unos porcentajes de similitud que oscilan, según la cepa, entre 99,5% y 99,6% (tabla 1). A continuación se encuentran las especies *M. violae* NEAU-zh8<sup>T</sup> y *M. saelicesensis* Lupac 09<sup>T</sup>, con valores que varían entre 99,2% - 99,5% en el primer caso y entre 99,2% - 99,5% en el segundo caso. Menos próximas se encuentran las especies *M. taraxaci* NEAU-P5<sup>T</sup> y *M. noduli* GUI43<sup>T</sup> con porcentajes de similitud que varían entre 99% y 99,3%.

La especie *M. chokoriensis* 2-19/6<sup>T</sup> es la especie más próxima a la cepa CSLC112N, con un 99,4% de similitud; muy cercana a la especie *M. lupini* lupac 14N<sup>T</sup> con un 99,3% de similitud. Por debajo se encuentran las especies *M. saelicesensis* Lupac 09<sup>T</sup> y *M. taraxaci* NEAU-P5<sup>T</sup> con un 99,1% y un 99,0% de similitud, respectivamente.

La cepa CSLC94N presenta porcentajes de similitud bajos respecto a las cepas más próximas a ella: *M. matsumotoense* DSM 44100<sup>T</sup> con un 99,2%, o *M. oryzae* CP2R9-1<sup>T</sup> y *M. rifamycinica* AM105<sup>T</sup> ambas con un 98,9% de similitud. Estos datos, al igual que los obtenidos para la cepa CSC112N, nos hacen afianzar la idea de que se hace necesario realizar más análisis para asegurar la pertenencia de estas dos cepas a sus especies más próximas.

Por último, tenemos la especie más próxima a la cepa CSLC98N es *M. palomenae* NEAU-CX1<sup>T</sup> con un porcentaje de similitud elevado del 99,8%. Más alejadas filogenéticamente se encuentran las especies *M. nickelidurans* K55<sup>T</sup> y *M. coxensis* 2-30-b/28<sup>T</sup> con un 99,1% y un 99,0% de similitud, respectivamente.

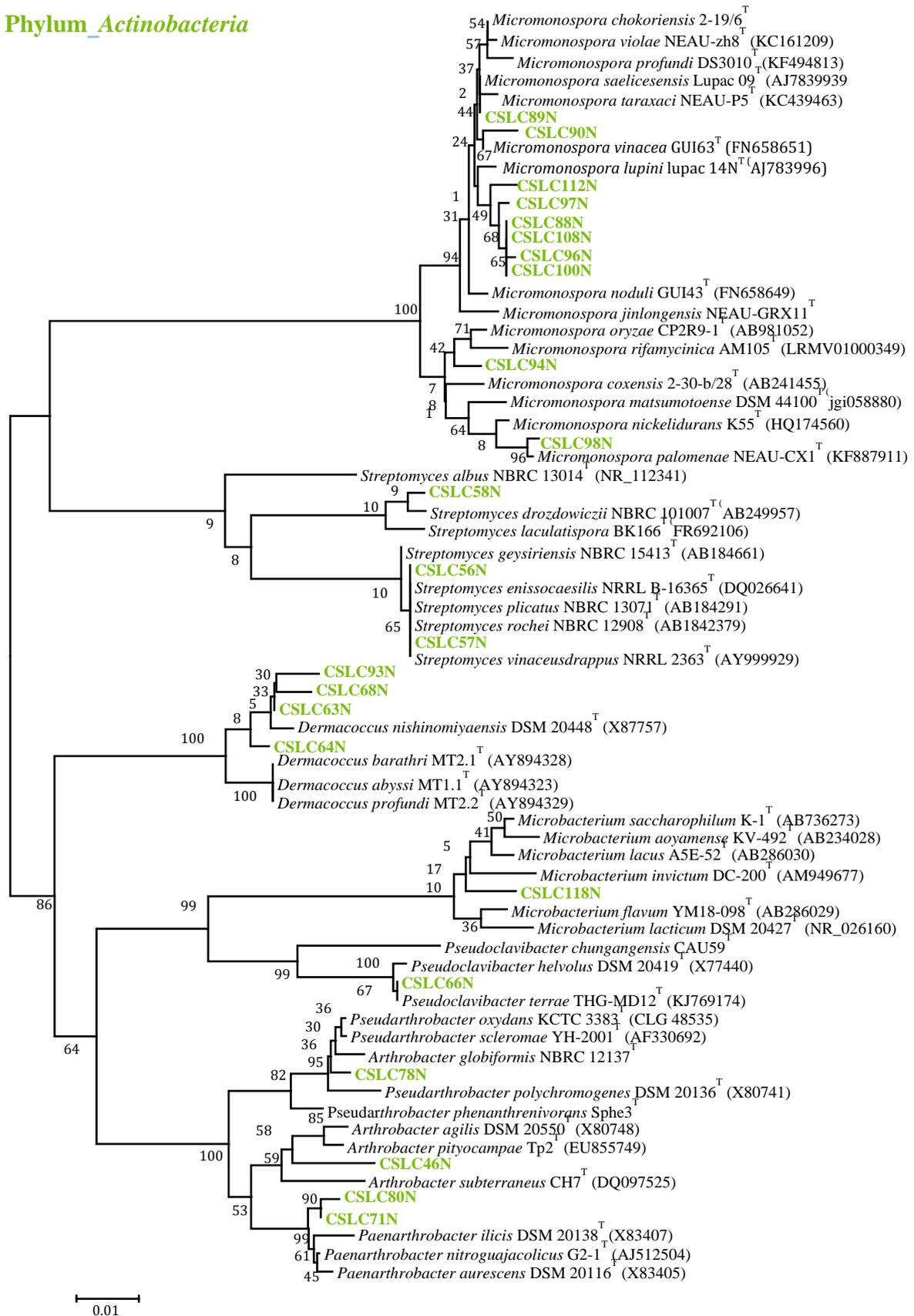
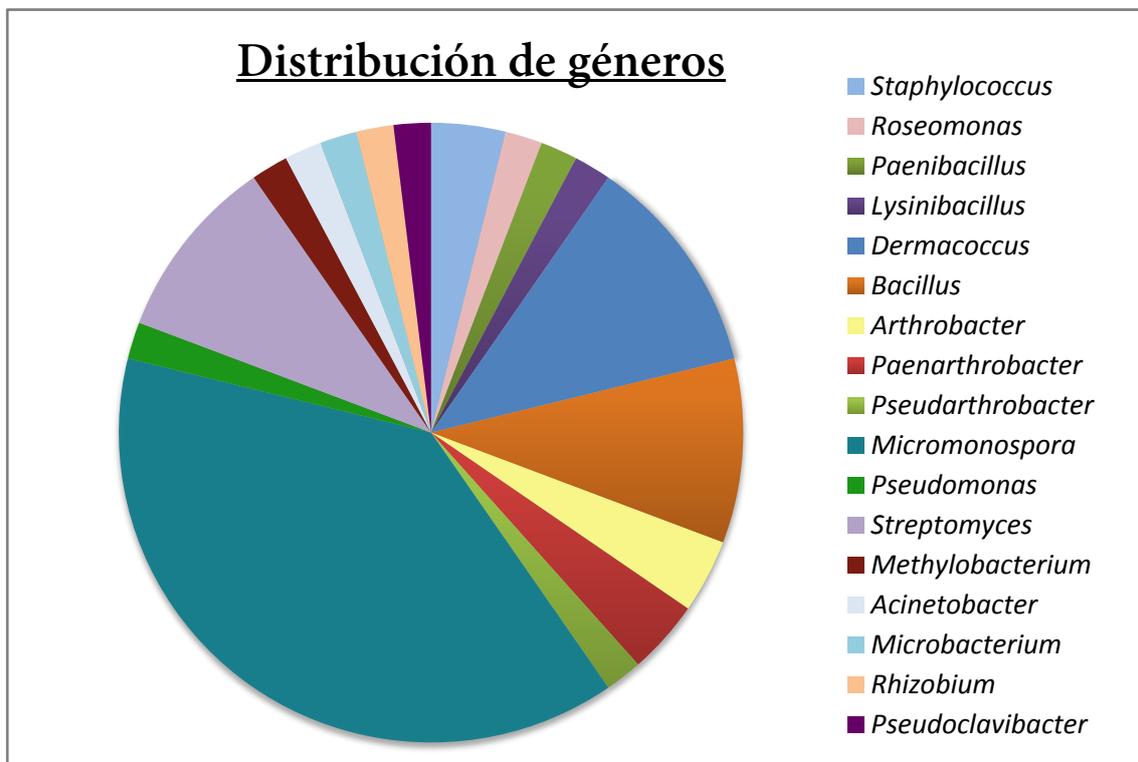
Phylum *Actinobacteria*

Figura 22. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados identificados dentro phylum *Actinobacteria* y de las especies tipo más próximas de cada género según la cepa. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

El análisis del gen ribosómico 16S no resulta determinante para definir de forma concluyente las especies a las que las cepas aisladas pertenecen. Para ello es necesario realizar más análisis que nos permitan identificar correctamente nuestros aislados. No obstante, nos sirve de aproximación y para hacernos una idea de la gran diversidad filogenética aislada por primera vez del interior de nódulos de *L. corniculatus*. De un total de 52 cepas endófitas aisladas (tabla 28), hemos obtenido bacterias identificadas en 17 géneros distintos (gráfica 2), de las cuales cuatro con toda probabilidad pertenecerán a especies nuevas dentro de los géneros *Roseomonas*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* y *Microbacterium*.

Para determinar las especies a las que pertenecen las cepas aisladas en el presente estudio del género *Micromonospora* sería necesario complementar el análisis del gen ribosómico 16S con el análisis de los genes *atpD*, *gyrB*, *recA* y *rpoB*, comparando las secuencias obtenidas con las depositadas en el GenBank y realizando, posteriormente realizar un árbol filogenético basado en el parámetro Neighbor-joining basado en la concatenación de dichos genes, junto con el ya obtenido ARNr 16S. Así mismo, ocurre con las cepas englobadas dentro de los diferentes géneros bacterianos, siendo necesario en el caso de aquellas de las que se prevee que pertenezcan a una nueva especie, realizar un estudio de hibridación ADN-ADN, así como otra serie de análisis para complementar su caracterización fenotípica.



Gráfica 2. Distribución de las 52 cepas endófitas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* en los diferentes géneros dentro de los cuales se identifica.

Tabla 28. La tabla refleja la distribución de las cepas endófitas según los diferentes perfiles TP-RAPD a los que pertenecen, así como la proximidad de las especies tipo más próximas con las que se identifican.

Cepa	Grupo TP-RAPD	Especie tipo más próxima	% Similitud
CSLC62N	I	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>Saprophyticus</i> ATCC 15305 <sup>T</sup>	99,9%
CSLC117N	II	<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>succinus</i> AMG-D1 <sup>T</sup>	100%
CSLC45N	III	<i>Roseomonas rhizosphaerae</i> YW11 <sup>T</sup>	98,4%
CSLC76N	IV	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290 <sup>T</sup>	98,6%
CSLC72N	V	<i>Lysinibacillus macroides</i> LMG 18474 <sup>T</sup>	98,8%
CSLC63N	VI	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 <sup>T</sup>	99,8%
CSLC64N	VI	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 <sup>T</sup>	94,4%
CSLC65N	VI	<i>Dermaococcus</i> sp.*	99,6%
CSLC68N	VI	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 <sup>T</sup>	99,6%
CSLC69N	VI	<i>Dermaococcus</i> sp. *	99,5%
CSLC93N	VI	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> DSM 20448 <sup>T</sup>	99,8%
CSLC41N	VII	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100%
CSLC77N	VII	<i>Bacillus butanolivorans</i> DSM 18926 <sup>T</sup>	99,4%
CSLC79N	VII	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup>	100%
CSLC84N	VII	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 <sup>T</sup> , <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 <sup>T</sup> , <i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 <sup>T</sup>	99,9%
CSLC86N	VII	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup>	99,5%
CSLC46N	VIII	<i>Arthrobacter agilis</i> DSM20550 <sup>T</sup>	98,4%
CSLC54N	VIII	<i>Paenarthrobacter</i> sp. *	99,5%
CSLC71N	VIII	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 <sup>T</sup>	99,5%
CSLC78N	VIII	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> KCTC 3383 <sup>T</sup>	99,4%
CSLC80N	VIII	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 <sup>T</sup>	99,4%
CSLC53N	IX	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,6%
CSLC96N	IX	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 <sup>T</sup>	99,6%
CSLC87N	X	<i>Micromonospora</i> spp.	99,9%
CSLC88N	X	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 <sup>T</sup>	99,6%
CSLC89N	X	<i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,9%
CSLC90N	X	<i>M. vinacea</i> GUI63 <sup>T</sup> , <i>M. saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,4%
CSLC92N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,5%
CSLC94N	X	<i>Micromonospora matsumotoense</i> DSM 44100 <sup>T</sup>	99,2%
CSLC97N	X	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,5%
CSLC98N	X	<i>Micromonospora palomenae</i> NEAU-CX1 <sup>T</sup>	99,8%
CSLC100N	X	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,5%
CSLC102N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,1%

Tabla 28 (continuación)

CSLC105N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,5%
CSLC106N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,5%
CSLC107N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,5%
CSLC108N	X	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 <sup>T</sup>	99,6%
CSLC110N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,3%
CSLC111N	X	<i>Micromonospora</i> sp. *	99,6%
CSLC112N	X	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 <sup>T</sup>	99,4%
CSLC113N	X	<i>Micromonospora</i> sp.	99,6%
CSLC67N	XI	<i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> DSM 16299 <sup>T</sup>	99,9%
CSLC55N	XII	<i>Streptomyces</i> sp. *	99,6%
CSLC56N	XII	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL B-16365 <sup>T</sup> <i>Streptomyces rochei</i> NBRC 12908T <i>Streptomyces plicatus</i> NBRC 13071T	100%
CSLC57N	XII	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> NRRL B-16365 <sup>T</sup> <i>Streptomyces rochei</i> NBRC 12908T <i>Streptomyces plicatus</i> NBRC 13071T	100%
CSLC58N	XII	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007 <sup>T</sup>	99,7%
CSLC119N	XII	<i>Streptomyces</i> sp. *	99,6%
CSLC47N	XIII	<i>Methylobacterium goesingense</i> iEII3 <sup>T</sup>	99,6%
CSLC81N	XIV	<i>Acinetobacter radioresistens</i> DSM 6976 <sup>T</sup>	100%
CSLC118N	XV	<i>Microbacterium saccharophilum</i> K-1 <sup>T</sup> , <i>Microbacterium invictum</i> DC-200 <sup>T</sup>	98,7%
CSLC25N	XVI	<i>Rhizobium cellulosilyticum</i> ALA10B2 <sup>T</sup>	99,1%
CSLC66N	XVII	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> DSM 20419 <sup>T</sup>	99,5%

(\*) El porcentaje de las cepas con \* se refiere a secuencias parciales.

El elevado número de cepas de *Micromonospora* aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus*, está en concordancia con estudios realizados previamente que determinaron la presencia de dichas bacterias en el interior de nódulos de diferentes leguminosas, tanto silvestres como cultivadas. Han sido aisladas más de 500 cepas del género *Micromonospora* de nódulos de diferentes leguminosas distribuidas en España, Ecuador y Nicaragua. Los nódulos de las leguminosas hospedadoras desde las que se han aislado estas bacterias son muy diversas, tal es el caso de *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Lens culinarium*, *Lupinus angustifolius*, *L. gredensis*, *Medicago sativa*, *Ononis* sp., *Ornithopus* sp., *Pisum sativum*, *Trifolium* sp., *Vicia* sp., *Coriaria myrtifolia*, *Medicago sativa* y la leguminosa tropical *Mucuna* sp. (Trujillo et al. 2006; Trujillo et al. 2007; Cerda 2008; Carro et al. 2010; Trujillo et al. 2010; Carro et al. 2016a; Carro et al. 2016b). A raíz de los resultados obtenidos en el presente trabajo y según lo consultado en la bibliografía, podemos confirmar que es la primera vez que se aísla del interior de nódulos de *Lotus corniculatus* bacterias del género *Micromonospora*. Constituye, por tanto, otra leguminosa a añadir a la amplia lista de leguminosas en las que se ha reportado la presencia de *Micromonospora* en el interior de los nódulos.

El gran número de poblaciones de *Micromonospora* encontradas en el interior de los nódulos radiculares sugería que la presencia de estas bacterias en este nicho tan específico no era casual y que era posible que *Micromonospora* desempeñara un papel ecológico importante que no se restringía a una única especie vegetal. Estudios recientes han demostrado el efecto positivo que ejercen las bacterias de este género sobre la promoción del crecimiento vegetal de la alfalfa (Martínez-Hidalgo et al. 2014), así como la capacidad que poseen para impulsar los mecanismos de defensa de la misma (Martínez-Hidalgo et al. 2015a). Las actinobacterias son bien conocidas por su capacidad para producir una amplia gama de metabolitos secundarios, actuando como agentes de biocontrol contra patógenos fúngicos y como reguladores del crecimiento de la planta (Gadelhak et al. 2005; Valdés et al. 2005; Hirsch y Valdés 2010).

En las últimas décadas, los nódulos de las leguminosas han sido fuente de una gran variedad de microorganismos que se identifican dentro de diferentes géneros. Como veremos a continuación, son diversos los estudios que han aislado del interior de nódulos de diferentes leguminosas, una amplia variedad de bacterias endofíticas conviviendo de forma simultánea con diferentes bacterias endosimbiontes fijadoras de nitrógeno de dichos hospedadores.

Del interior de nódulos de la leguminosa *Sphaerophysa salsula* recogidas en diferentes zonas de la meseta de Loess en China, se aislaron 25 especies de bacterias diferentes. De un total de 115 bacterias aisladas, 50 cepas eran bacterias fijadoras de Nitrógeno, que fueron identificadas en los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* y las 65 cepas restantes, no simbióticas, se repartieron en 15 especies diferentes de los géneros *Paracoccus*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* y *Bacillus*. Estas bacterias simbióticas y no simbióticas fueron aisladas de manera simultánea de los mismos nódulos radiculares de *Sphaerophysa salsula* (Deng et al. 2011). Por otro lado, también encontramos estudios realizados en plantas de *Lespedeza* sp., de cuyos nódulos se aislaron 39 cepas bacterianas identificadas dentro de 8 géneros diferentes: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium* y *Arthrobacter* (Palaniappan et al. 2010).

Tampoco es la primera vez que se aísla del interior de nódulos cepas del género *Paenibacillus*, como así demuestran los estudios realizados por Valverde et al. (Valverde et al. 2010). Ellos aislaron e identificaron una nueva especie de este género, *P. prosopidis*, del interior de los nódulos de la leguminosa *Prosopis farcta* (Valverde et al. 2010). Diversas especies de este género se han aislado también del interior de los nódulos de dos especies del género *Glycyrrhiza*, *G. uralensis* y *G. glabra*, junto con diferentes géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium* (Li et al. 2012). Lo cual vuelve a demostrar, una vez más, la capacidad de convivencia que presentan las bacterias endofíticas no simbióticas y las bacterias endosimbiontes de convivir en el interior de nódulos de diferentes leguminosas.

La presencia de cepas pertenecientes al género *Acinetobacter* también se ha encontrado en el interior de nódulos de *Acacia tortilis* sbsp. *raddiana* en los suelos áridos de Tunisia, en Túnez (Fterich et al. 2012). La existencia de bacterias endofíticas es común en los nódulos de soja, predominando bacterias del género *Pantoea*, seguidas por *Serratia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Agrobacterium* y también *Acinetobacter* (Li et al. 2008).

Nuestros resultados muestran que las plantas de *L. corniculatus* recogidas en la comarca salmantina de Carbajosa de la Sagrada, se asocian con diversas bacterias simbióticas y no simbióticas conviviendo en el interior de sus nódulos de una forma positiva para la planta. Según la bibliografía consultada, es la primera vez que se aísla del interior de nódulos de esta leguminosa tanta biodiversidad de bacterias endofíticas; al menos 25 especies diferentes son capaces de cohabitar los nódulos, con 7 especies diferentes del género *Mesorhizobium*, como detallaremos a continuación. Además, también debemos resaltar la presencia de cepas de los géneros *Dermacoccus* y *Roseomonas*, por primera vez aisladas del interior de nódulos de una leguminosa, y conviviendo con una amplia diversidad de géneros y especies diferentes. Por otro lado, hemos visto que es necesario complementar el análisis del gen ribosómico 16S con otros genes, para identificar correctamente todas las cepas, por lo que cabe la posibilidad de que esta biodiversidad se vea aumentada con un mayor número de especies cohabitando dichos nódulos.

Los resultados ponen de manifiesto que existe un claro dominio de las cepas Gram positivas, que como hemos visto predominan en número sobre las Gram negativas, dentro del grupo de las bacterias endofíticas aisladas en el presente trabajo. Tomados en conjunto todos estos resultados podemos inferir que la presencia de tal diversidad de bacterias endofíticas asociadas a nódulos de una misma planta de *Lotus corniculatus*, junto con bacterias del grupo de los rizobia, no es casual, estableciéndose una relación mutualista, donde los endófitos juegan un papel primordial en la promoción del crecimiento vegetativo de su hospedador. Esto abre el camino para el diseño de inoculantes aplicados a leguminosas y también no leguminosas, que permitirá la ansiada reducción de productos químicos sobre los cultivos agrícolas.

A continuación, realizamos el análisis completo del gen ribosómico 16S para 22 cepas, representando el conjunto de las 38 cepas aisladas y cada uno de los grupos TP-RAPD. Las secuencias obtenidas se compararon con las procedentes de la base de datos ExTaxon, que contiene las cepas tipo de todas las especies descritas a nivel mundial. Los resultados obtenidos muestran que las cepas aisladas en este estudio están estrechamente relacionadas con diferentes especies del género *Mesorhizobium* con valores de similitud por encima del 99% en todos los casos. Los resultados del análisis filogenético del gen ribosómico 16S de las diferentes cepas del presente estudio se muestran en la figura 19. Para realizar el árbol filogenético se empleó el método “Neighbor-Joining” nuevamente, que es el más ampliamente utilizado en taxonomía.

El análisis del gen ribosómico 16S nos muestra que las cepas aisladas en la comarca salmantina de Carbajosa de la Sagrada (Noroeste español), se dividen en cinco grupos (figura 23). Las cepas CSLC01N, CSLC09N, CSLC14N, CSLC28N, CSLC29N, CSLC33N, CSLC35N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N y CSLC42N representantes de los grupos I, II, IV y IX (ver figura 19 perfiles TP-RAPD) pertenecen a un grupo amplio (cluster I) que incluye las cepas tipo de *M. huakuii* IFO 15243<sup>T</sup>, *M. jarvisii* ATCC 33669<sup>T</sup> y *M. waimense* ICMP 19557<sup>T</sup>. La cepa ATCC 33669<sup>T</sup> (anteriormente conocida como *M. loti*) fue aislada de nódulos de *L. corniculatus* y ha sido recientemente reclasificada en una nueva especie llamada *M. jarvisii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015b).

Varias cepas aisladas de *L. corniculatus* en diferentes países Europeos, como por ejemplo Suecia (Ampomah y Huss-Danell 2011), Noruega (Gossmann et al. 2012) y España (Lorite et al. 2010b), así como en países Americanos, como Uruguay (Binde et al. 2009; Sotelo et al. 2011) y Brasil (Binde et al. 2009), pertenecen también al grupo I, como así demostramos en estudios previos (Marcos-García et al. 2015).

La cepa CSLC22N, única representante del grupo III de TP-RAPD, se agrupa con la cepa tipo de *M. erdmanii* USDA3471<sup>T</sup>, constituyendo el cluster II. Este cluster también incluye cepas aisladas en Suecia (Ampomah y Huss-Danell 2011), Noruega (Gossmann et al. 2012), Uruguay (Sotelo et al. 2011) y dos cepas que nodulan *L. corniculatus*, R7A y MAFF 303099 (esta última cepa representada en la figura 19), aisladas en Nueva Zelanda y Japón y cuyos genomas han sido secuenciados (Sullivan et al. 1995a; Kaneko et al. 2000).

Las cepas CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N, incluidas en el grupo V, CSLC08N y CSLC23N, incluidas en el grupo VI, CSLC04N y CSLC10N, incluidas en el grupo VIII, CSLC06N, representante del grupo X y CSLC24N, representante del grupo XI, se agrupan juntas con las cepas tipo de *M. caraganae* CCBAU 11299<sup>T</sup>, *M. gobiense* CCBAU 83306<sup>T</sup>, *M. metallidurans* STM 2683<sup>T</sup>, *M. tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup> y *M. tianshanense* A1BS<sup>T</sup> constituyendo el cluster III. En este cluster también se agrupan varias cepas que nodulan *L. corniculatus* aisladas en Suecia (Ampomah y Huss-Danell 2011), el norte de México (Qian y Parker 2002) y Uruguay (Sotelo et al. 2011) y que nuevamente se demostró en estudios anteriores (Marcos-García et al. 2015).

Finalmente, la cepa CSLC30N representante única del grupo VII, pertenece al cluster IV, el cual incluye las cepas tipo de *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>, *M. ciceri* UPMCa7<sup>T</sup>, *M. sangaii* SCAU27<sup>T</sup>, *M. qingshengii* CCBAU 33460<sup>T</sup>, *M. australicum* WSM 2073<sup>T</sup>, *M. shangrilense* CCBAU65327<sup>T</sup> y *M. cantuariense* ICMP 19515<sup>T</sup>. Esta cepa se encuentra muy próxima a varias cepas aisladas en Suecia (Ampomah y Huss-Danell 2011), Noruega (Gossmann et al. 2012) y Nueva Zelanda (Reeve et al. 2014), como así se comprobó en estudio previos (Marcos-García et al. 2015).

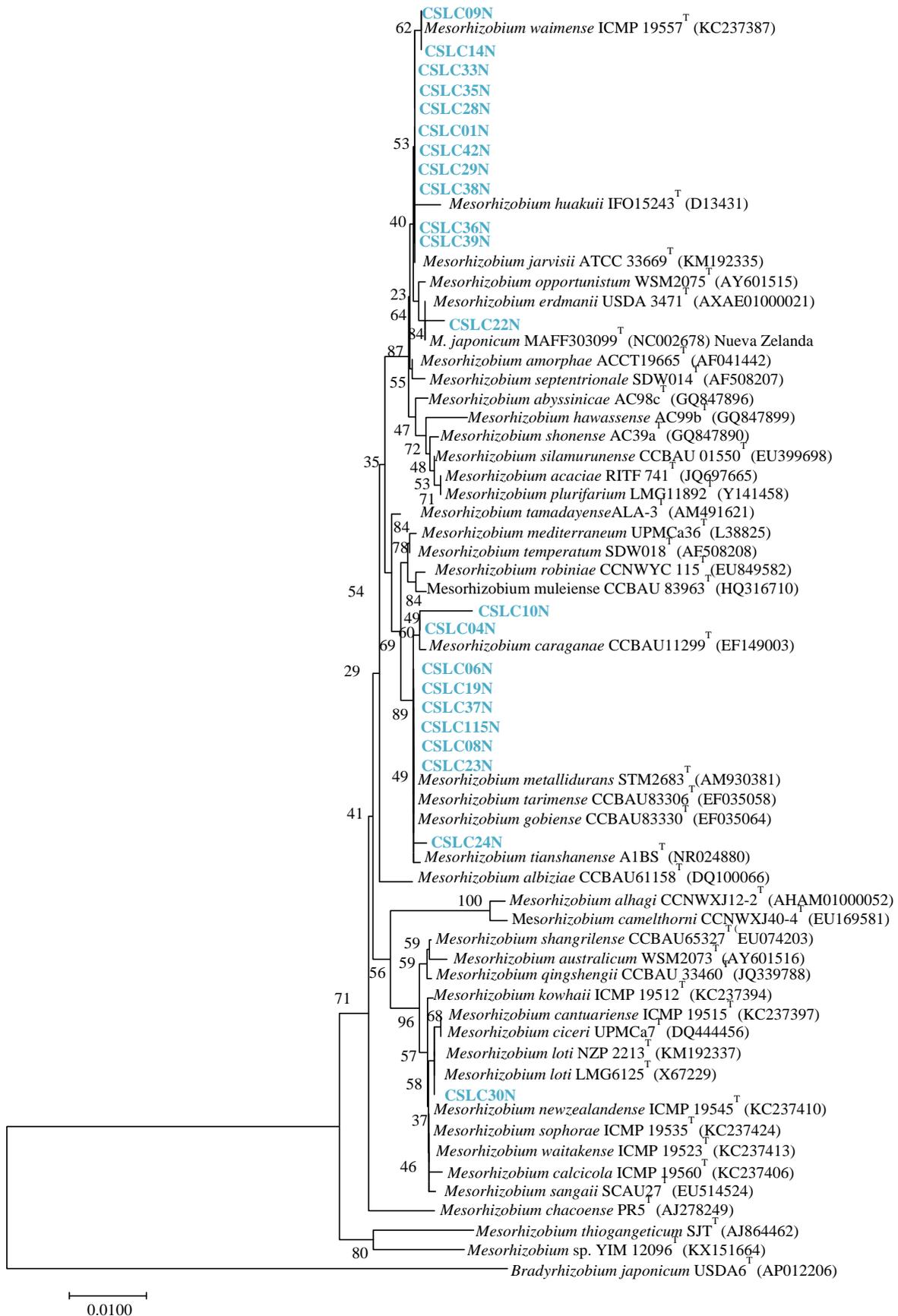


Figura 23. Análisis filogenético del gen ribosómico 16S de los aislados identificados dentro del género *Mesorhizobium* y de las especies tipo más próximas de cada género según la cepa. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis filogenético del gen ribosómico 16S muestran la diversidad existente entre los aislados del género *Mesorhizobium* de esta región Salmantina. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el análisis de los perfiles TP-RAPD, confirmándose la pertenencia de las cepas aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus* a diferentes especies. No obstante, estos resultados deben confirmarse utilizando otras técnicas, cuando los valores de identidad son superiores al 97% en la secuencia del gen ribosómico 16S, tal es el caso de la hibridación del ADN total (Stackebrandt y Goebel 1994).

Además, gracias al análisis filogenético del gen ribosómico 16S hemos podido comprobar que las cepas aisladas en el presente trabajo pertenecen a cuatro grupos filogenéticamente divergentes dentro del género *Mesorhizobium*. También hay que destacar, que estos grupos filogenéticos están ampliamente distribuidos a nivel mundial y las cepas que son capaces de nodular *L. corniculatus*, están distribuidas en varios países de Europa, América y Asia (Marcos-García et al. 2015). Tres de estos grupos incluyen las especies de *Mesorhizobium* que recientemente se han descrito como endosimbiontes de *L. corniculatus*; *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii*. Como podemos observar en la figura 19, algunas de nuestras cepas se encuentran filogenéticamente próximas a ellas.

#### 2.4. Análisis filogenético de los genes *recA*, *atpD*, *glnII*.

Como hemos podido comprobar al realizar el análisis filogenético del gen ribosómico 16S, esta herramienta no es suficiente para discriminar entre especies próximas del género *Mesorhizobium* ya que algunas de las especies del género están estrechamente relacionadas a nivel genético. Sin embargo, pueden ser diferenciadas mediante el estudio de los genes *housekeeping*, como por ejemplo *recA* y *atpD* que están disponibles para muchas de las especies de *Mesorhizobium*, lo cual nos permite la identificación de nuevos aislados.

Estos dos genes *housekeeping* resultan muy útiles para diferenciar especies próximas dentro de la familia Rhizobiaceae, debido a que se encuentran situados entre los genes ribosómicos 16S y 23S

En la figura 24 podemos observar el árbol filogenético concatenado de las secuencias de los genes *recA* y *atpD*. En el podemos observar que nuestras cepas pertenecen a cinco clusters y dos linajes independientes dentro del género *Mesorhizobium*.

El cluster I agrupa 13 cepas representando los grupos I y II de los perfiles TP-RAPD. La cepa representante del grupo VII, constituye el cluster II. El cluster III contiene 4 cepas representando el grupo IX; el cluster IV agrupa dos cepas

representantes del grupo VIII y el cluster V contiene 14 cepas representando los grupos V, VI, X y XI de los perfiles TP-RAPD.

Por otro lado, la cepa representante del grupo III de TP-RAPD forma un linaje independiente (A), al igual que también ocurre con las tres cepas representantes del grupo IV, que constituyen otro linaje independiente (B).

Las cepas del cluster I tienen valores similares cercanos o superiores al 99% en ambos genes, *recA* y *atpD*, con respecto a la cepa tipo de *M. jarvisii* ATCC 33669<sup>T</sup>, por tanto concluimos que pertenecen a dicha especie. Las cepas pertenecientes al cluster IV tienen valores de similitud alrededor del 99% en estos dos genes, con respecto a la cepa tipo de *M. caraganae* CCBAU 11299<sup>T</sup>, por lo que también llegamos a la conclusión de que ambas cepas pertenecen a dicha especie.

Los linajes A y B forman un cluster amplio que incluye a las cepas tipo *M. jarvisii* ATCC 33669<sup>T</sup> y *M. japonicum* MAFF 303099<sup>T</sup>, pero las cepas que incluyen estos linajes están más próximas a *M. jarvisii* ATCC 33669<sup>T</sup> cuando ambos genes *recA* y *atpD* se consideran juntos o concatenados. La cepa del linaje A, CSLC22N, probablemente pertenece a esta especie, debido a que presenta valores de similitud altos, superiores al 98% en ambos genes. Sin embargo, las cepas que constituyen el linaje B, CSLC26N CSLC35N y CSLC42N, podrían pertenecer a una nueva especie del género *Mesorhizobium*.

El cluster II está representado por la cepa perteneciente al grupo VII de TP-RAPD, CSLC30N. En este cluster están incluidas las cepas tipo de *M. shangrilense* CCBAU65327<sup>T</sup>, *M. sangaii* SCAU7<sup>T</sup>, *M. ciceri* USDA3383<sup>T</sup> y *M. loti* NZP2213<sup>T</sup>. Esta cepa se encuentra próxima a *M. loti* con un 95,4% de similitud en los análisis del gen *atpD*; sin embargo, cuando se compara con el gen *recA* la especie más próxima a dicha cepa es *M. ciceri* con un 98,3% de similitud. Cuando se analiza esta cepa con los dos genes concatenados, presenta una similitud con *M. loti* del 96,01% y con *M. ciceri* del 96,52%. Estos valores tan bajos nos hacen considerar la posibilidad de analizar otros genes para tratar de determinar la pertenencia de esta cepa a una especie concreta, ya que con el análisis de los genes *recA* y *atpD* es insuficiente para llegar a una conclusión.

Las cepas pertenecientes al cluster III, CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N, probablemente también pertenezcan a una nueva especie de este género, teniendo en cuenta los bajos valores de similitud obtenidos, por debajo del 98%, encontrados en los dos genes analizados. Además hay que tener en cuenta también la distancia filogenética encontrada entre las cepas del cluster III y las especies restantes del género *Mesorhizobium*, que fueron más altas que las encontradas entre varias especies descritas de este género.

Por último, tenemos las cepas pertenecientes al cluster V representadas por los grupos V, VI, X y XI de los perfiles TP-RAPD. Las cepas del grupo V, CSLC19N,

CSLC37N y CSLC115N, tienen idénticas secuencias respecto al gen *recA* y la especie más próxima a ellas es *M. metallidurans* STM 2683<sup>T</sup> con un 96,4% de similitud, lo cual nos sugiere que no pertenecen a esta especie. Respecto al análisis del gen *atpD*, donde también muestran entre ellas idéntica similitud, también la especie más próxima a ellas es *M. metallidurans* STM 2683<sup>T</sup> con un 97,4% de similitud. Analizando en conjunto estos dos genes (figura 24), observamos que estas cepas forman un brazo filogenéticamente divergente con dicha especie con la cual tienen un 96,15% de similitud. Esto nos hace pensar que estas tres cepas pertenecen a una nueva especie dentro del género *Mesorhizobium*, tal y como se confirma en el apartado 2.2.6., pasándose a denominar esta nueva especie *M. helmanticense* (Marcos-García et al. 2017).

Dentro del cluster V encontramos las cepas representantes de los grupos VI, X y XI de TP-RAPD, muy relacionadas con *M. helmanticense*. Las cepas de los grupos X y XI, se encuentran más estrechamente relacionadas a esta especie, con valores de similitud superiores al 99%, tanto al analizar los genes *recA* y *atpD* de forma separada, como conjuntamente. En el grupo VI encontramos las cepas CSLC08N y CSLC23N, cuyos valores de similitud respecto a *M. helmanticense* son inferiores a los mencionados para las cepas representantes de los grupos X y XI. En esta ocasión, los porcentajes varían entre el 98% y el 99% en el caso del gen *atpD* para ambas cepas y también al analizar los genes *recA* y *atpD* de forma conjunta. En cambio, al analizar el gen *recA* por separado, la cepa CSLC23N muestra un 100% de similitud, pero la cepa CSLC08N tiene un valor más bajo de 98,6%. No obstante, pese a los valores de similitud obtenidos, concluimos que es necesario realizar un análisis mayor de las cepas incluidas en los tres grupos TP-RAPD para incluir o descartar la pertenencia de las mismas a la nueva especie aislada del género *Mesorhizobium*.

Estos resultados confirman la diversidad filogenética de las cepas aisladas en este estudio, que está de acuerdo y confirma la diversidad encontrada entre estas cepas, incluidas en nuestros estudios previos (Marcos-García et al. 2015). El total de las 38 cepas aisladas se reparte en 7 grupos que pertenecen a varios linajes filogenéticos del género *Mesorhizobium*, aislados de nódulos de tres plantas de *L. corniculatus*. Según lo consultado en la bibliografía, es la primera vez que se aísla tanta diversidad del interior de estos nichos tan específicos como son los nódulos, encontrando además bacterias endofíticas identificadas dentro de 17 géneros diferentes, conviviendo con cepas endosimbionas de dichas plantas del género *Mesorhizobium*. Esto supone una alta diversidad bacteriana, 90 cepas repartidas en 18 géneros diferentes, nunca antes encontrada hasta ahora en dicho hospedador.

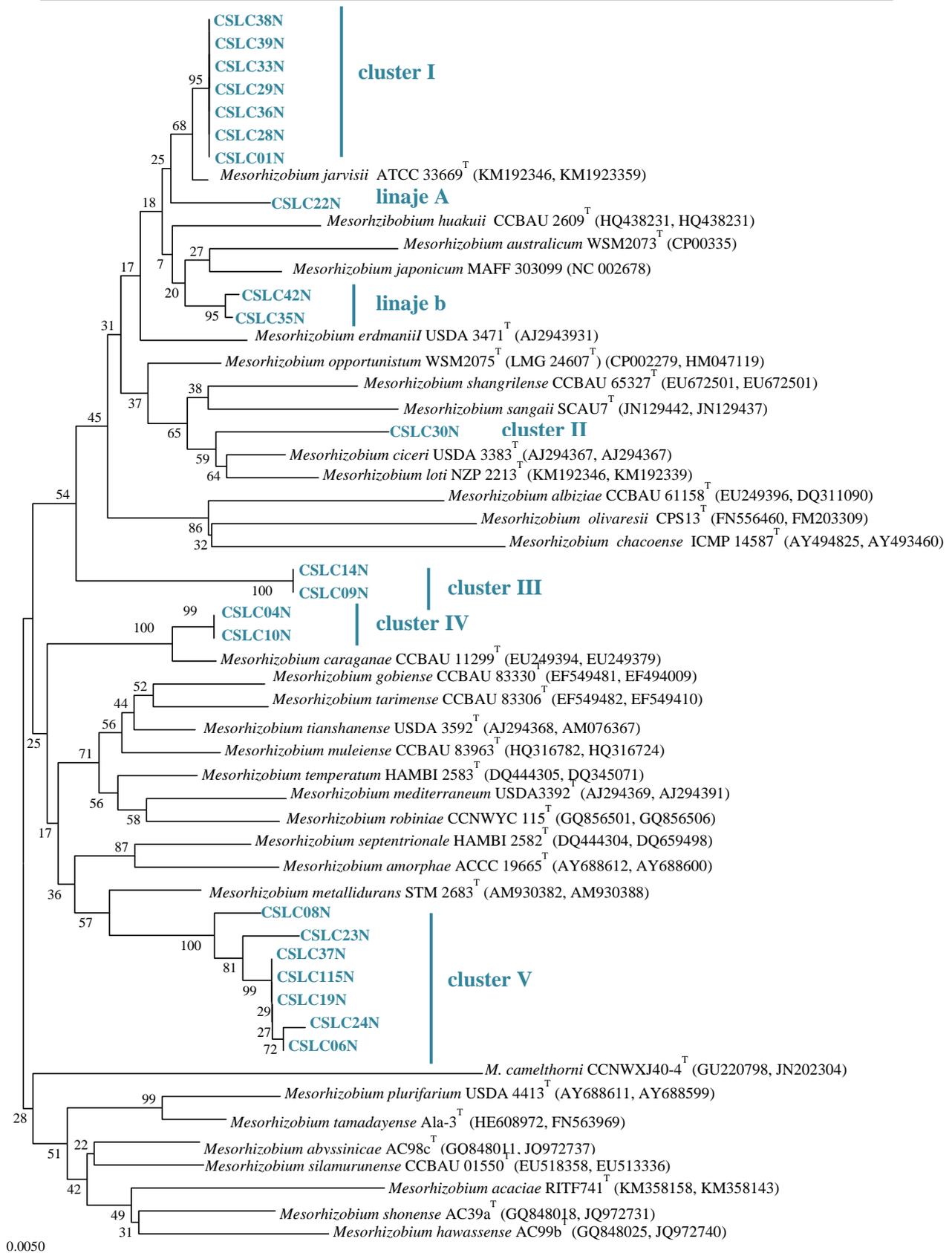


Figura 24. Árbol filogenético concatenado de los genes *recA* y *atpD* mostrando la posición de las cepas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y las cepas tipo de las especies más próximas actualmente descritas. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

A continuación se muestra una tabla resumen (tabla 29) con los resultados obtenidos de los análisis genéticos realizados a las 38 cepas aisladas del interior de nódulos de *L. cornicultus*, identificadas en diferentes especies dentro del género *Mesorhizobium*.

El análisis del gen *glnII* se realizó únicamente con las cepas CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N, para tratar de determinar si se identificaban dentro de una nueva especie del género *Mesorhizobium*. Los datos aparecen reflejados en la figura 27 del apartado 3.1. del presente capítulo.

Tabla 29. Resultados obtenidos de los análisis genéticos de las cepas aisladas de nódulos de plantas de *L. corniculatus* recogidas en Carbajosa de la Sagrada (Salamanca).

Cepas	Grupo TP-RAPD	Especie tipo más próxima en los genes recA y atpD (valores de similitud en %)	Clúster o linaje después del análisis de los genes recA y atpD concatenados
CSLC01N, CSLC28N, CSLC29N, CSLC33N, CSLC36N	I	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <sup>T</sup> (100/98,9)	I
CSLC02N, CSLC03N, CSLC11N, CSLC12N, CSLC13N, CSLC38N, CSLC39N, CSLC116N	II	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <sup>T</sup> (100/98,9)	I
CSLC22N	III	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <sup>T</sup> (98,3/97,5)	A
CSLC26N, CSLC35N, CSLC42N	IV	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <sup>T</sup> (99,0/98,3)	B
CSLC19N, CSLC37N, CSLC115N	V	<i>M. helmanticense</i> (100/100)	V
CSLC08N	VI	<i>M. helmanticense</i> CSLC115N <sup>T</sup> (98,6/98,8)	V
CSLC23N	VI	<i>M. helmanticense</i> CSLC115N <sup>T</sup> (100/98,3)	V
CSLC30N	VII	<i>M. ciceri</i> UPMCa7 <sup>T</sup> (98,3/99,8)	II
CSLC04N, CSLC10N	VIII	<i>M. caraganae</i> CCBAU 11299 <sup>T</sup> (97,9/99,9)	IV
CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N, CSLC32N	IX	<i>M. jarvisii</i> ATCC 33669 <sup>T</sup> (97,6/93,3)	III
CSLC05N, CSLC06N, CSLC18N, CSLC31N, CSLC40N	X	<i>M. helmanticense</i> CSLC115N <sup>T</sup> (99,6/99,1)	V
CSLC07N, CSLC15N, CSLC17N, CSLC24N	XI	<i>M. helmanticense</i> CSLC115N <sup>T</sup> (100/99,1)	V

## 2.5. Análisis filogenético del gen *nodC*.

A pesar de que los genes simbióticos no ofrecen información taxonómica porque están ubicados en elementos fácilmente intercambiables, como son los plásmidos o las islas simbióticas, el análisis del gen *nodC* nos permite la identificación de cepas a nivel de simbiovar (Peix et al. 2015). En este apartado analizamos las cepas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* identificadas dentro de distintas especies del género *Mesorhizobium*, mostrando que están filogenéticamente relacionadas con las cepas del simbiovar *loti* (figura 25). Este simbiovar es característico de los rizobios que nodulan las distintas especies del género *Lotus* spp.

Como ya se ha comentado con anterioridad, los rizobios son bacterias simbióticas, por lo tanto portan genes simbióticos, además de los propios genes esenciales. Estos genes, como hemos adelantado, se localizan en elementos genéticos, y por ello pueden ser transferibles por fenómenos de transferencia horizontal entre especies y también entre géneros (Sullivan et al. 1995; Sullivan et al. 2002). No son útiles en taxonomía pero, en el caso del gen *nodC*, se utilizan para describir los diferentes simbiovars y su filogenia se puede relacionar con el rango de hospedador, ofreciendo información sobre la promiscuidad de los mismos (Rivas et al. 2007; Iglesias et al. 2007; León Barrios et al. 2014). Los genes de nodulación confieren especificidad en la nodulación, determinando el rango de leguminosas huéspedes que un rizobio en particular puede nodular. De esta manera, los análisis filogenéticos basados en estos genes corresponden en gran medida, con el rango del huésped (Lorite et al. 2010a; Lorite et al. 2010b; Rogel et al. 2011; Ramírez-Bahena et al. 2012).

El gen *nodC* codifica para una N-acetil-glucosaminil-transferasa, esencial para la nodulación, estando implicada en el primer paso de la síntesis de los factores de nodulación. Este gen es el más comúnmente empleado para definir los simbiovars de todos los géneros rizobianos (Laranjo et al. 2012; Peix et al. 2015). Las especies rizobianas pueden extender la gama de huéspedes al asociarse con diferentes simbiovars y, del mismo modo, el mismo simbiovar puede ser compartido por diferentes especies (Rogel et al. 2011; Laranjo et al. 2012; Peix et al. 2015).

Los biovars se han descrito en varias especies bacterianas y pueden ser compartidos por diferentes especies debido a la transferencia lateral de información simbiótica. Los biovars se describieron por primera vez en *Rhizobium leguminosarum*, en una revisión taxonómica de las especies de rizobios (Krieg y Holt 1984). Desde entonces, se han identificado biovars en otras especies de *Rhizobium*, así como también en otros géneros como *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*.

Las especies relacionadas con el simbiovar *loti* son *Mesorhizobium loti*, *M. jarvisii*, *M. erdmanii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015b), *M. tarimense*, *M. japonicum* y *M.*

*olivaresii* (Lorite et al. 2016). En el análisis filogenético realizado en las cepas del género *Mesorhizobium* aisladas en el presente trabajo, hemos encontrado grupos filogenéticamente divergentes entre sí y, algunos de ellos, con las especies incluidas en el simbiovar *loti*. Sin embargo, como demostraremos más adelante en el capítulo IV, todas y cada una de las 38 cepas aisladas, son capaces de nodular la leguminosa *L. corniculatus*. Está bastante claro que las cepas aisladas en este trabajo, que son filogenéticamente divergentes de las especies relacionadas con el simbiovar *loti*, habrán adquirido dichos genes simbióticos a través de la transferencia horizontal genética con las cepas pertenecientes a las especies relacionadas con dicho simbiovar. La transferencia horizontal de genes juega un papel muy importante en la diversificación de las poblaciones naturales de rizobios en el campo (Ampomah y Huss-Danell 2011).

Como venimos comentando, la aparición de nuevos grupos de bacterias capaces de nodular leguminosas no descritas anteriormente, puede deberse en gran parte a la adquisición entre rizobios a través de la transferencia horizontal de genes. Los genes esenciales para la nodulación, la infección y la fijación de nitrógeno se agrupan en módulos de simbiosis que se encuentran a menudo en elementos genético móviles (MGE), ya sean grandes plásmidos (>0,2 Mb) (Galibert et al. 2001), islas cromosómicas (Sullivan et al. 2002b) o ambos (Wang et al. 2014).

Los genes simbióticos se han establecido en muchos géneros bacterianos diferentes y es probable que esta diversidad haya sido clave para el éxito evolutivo de la simbiosis rizobio-leguminosa, que se establece en el 70% de las especies de Fabáceas, una de las mayores familias dentro de las plantas (Remigi et al. 2016). Los rizobios pertenecen a cientos de especies restringidas a catorce géneros distribuidos en dos clases de bacterias, las Alphaproteobacterias y Betaproteobacteria, lo cual sugiere una infrecuente y exitosa transferencia entre géneros, pero frecuente y exitosa dentro de los propios géneros (Masson-Boivin et al. 2009; Peix et al. 2015). La transferencia de genes simbióticos dentro de las especies de rizobios y entre especies estrechamente relacionadas parece que ocurre con frecuencia. Por ejemplo, los grupos de genes del simbiovar *viciae* son muy similares, habiéndose encontrado en bacterias de *Rhizobium leguminosarum*, *R. pisi* y *R. laguerrae*, permitiéndoles de este modo nodular las plantas de *Vicia*, *Lathyrus* y *Pisum* (Saidi et al. 2014). Otros ejemplos los encontramos en *Phaseolus*, cuya nodulación es activada por el simbiovar *phaseoli* en *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. leguminosarum*; mientras que la nodulación de *Trifolium* es proporcionada por los genes del simbiovar *trifolii* en *R. leguminosarum* y *R. pisi* (Marek-Kozaczuk et al. 2013). Estos tres ejemplos muestran cómo se han traspasado tres conjuntos distintos de genes simbióticos entre especies dentro del complejo de especies filogenéticamente próximas y relacionadas con *R. leguminosarum*.

Del mismo modo, encontramos que el simbiovar *cicceri*, que confiere la nodulación de *Cicer* (garbanzo), se encuentra no sólo en *Mesorhizobium cicceri*, sino también en muchas otras especies del género *Mesorhizobium* (Rogel et al. 2011; Laranjo et al. 2012). Por ejemplo este biovar se ha descrito en las especies *M. amorphae*

y *M. tianshanse*, capaces de nodular la planta del garbanzo. Sin embargo, cuando estas especies fueron descritas por primera vez, no nodulaban garbanzo (Rogel et al. 2011).

Las transferencias de genes han sido observadas también en el campo. Tal es el caso del simbiovar *loti*, cuyos genes simbióticos fueron propagados a partir de *M. loti*, que fue introducida en Nueva Zelanda para nodular cultivos de *Lotus*, a especies indígenas de *Mesorhizobium* que previamente no tenían la capacidad para nodular este hospedador (Sullivan et al. 2002b). En particular, el biovar *loti*, que como hemos comentado con anterioridad posibilita la capacidad de nodular *Lotus*, parece estar presente en diferentes especies del género *Mesorhizobium*. Recientemente se ha descrito una nueva especie de dicho género, *M. olivaresi*, aislada en Granada de nódulos de *L. corniculatus*. Esta especie posee el simbiovar *loti*, a pesar de encontrarse filogenéticamente divergente del cluster formado por las cepas tipo de otras especies de *Mesorhizobium* con la capacidad de nodular este huésped, particularmente *M. jarvisii* (Lorite et al. 2016).

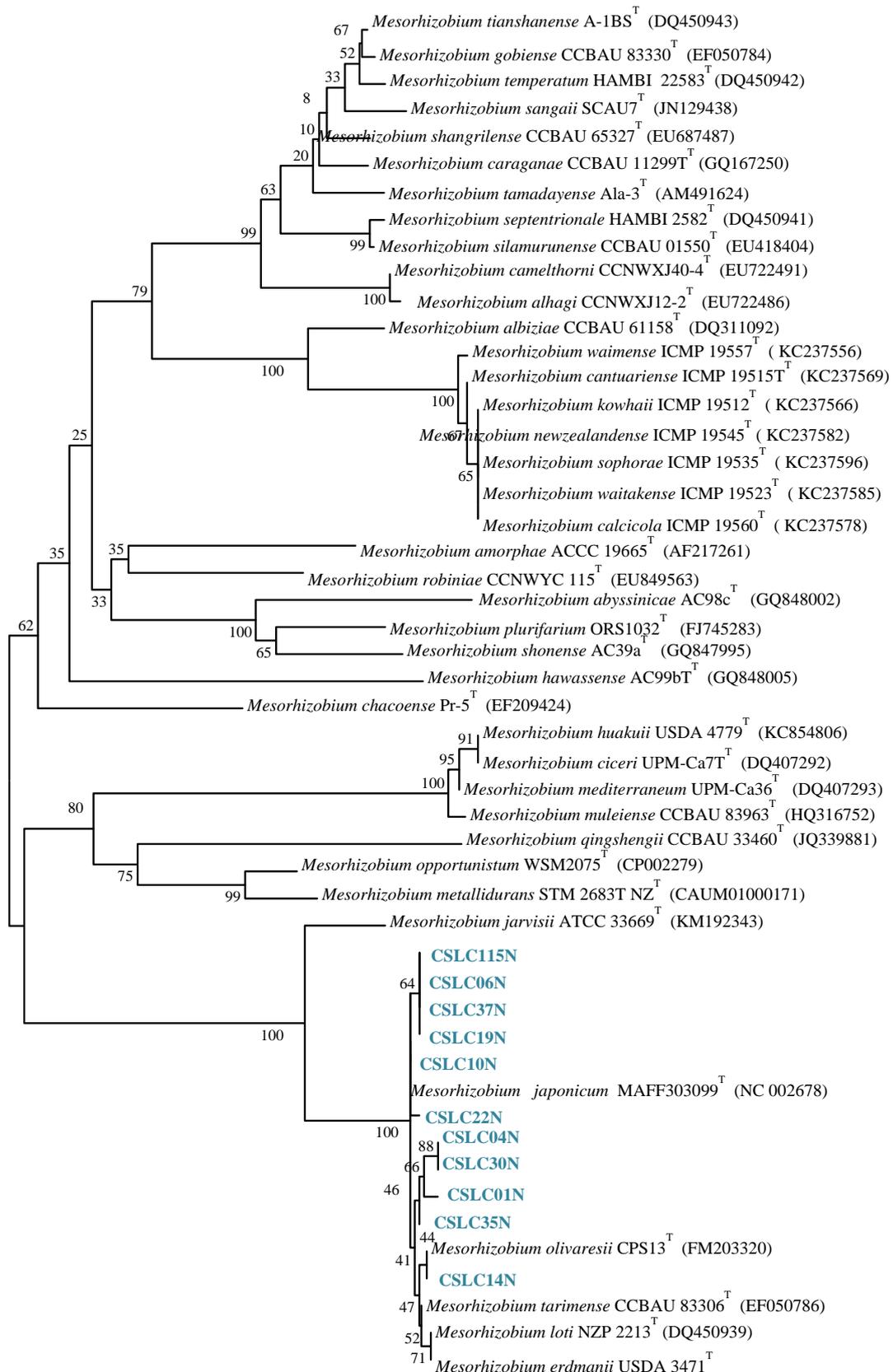


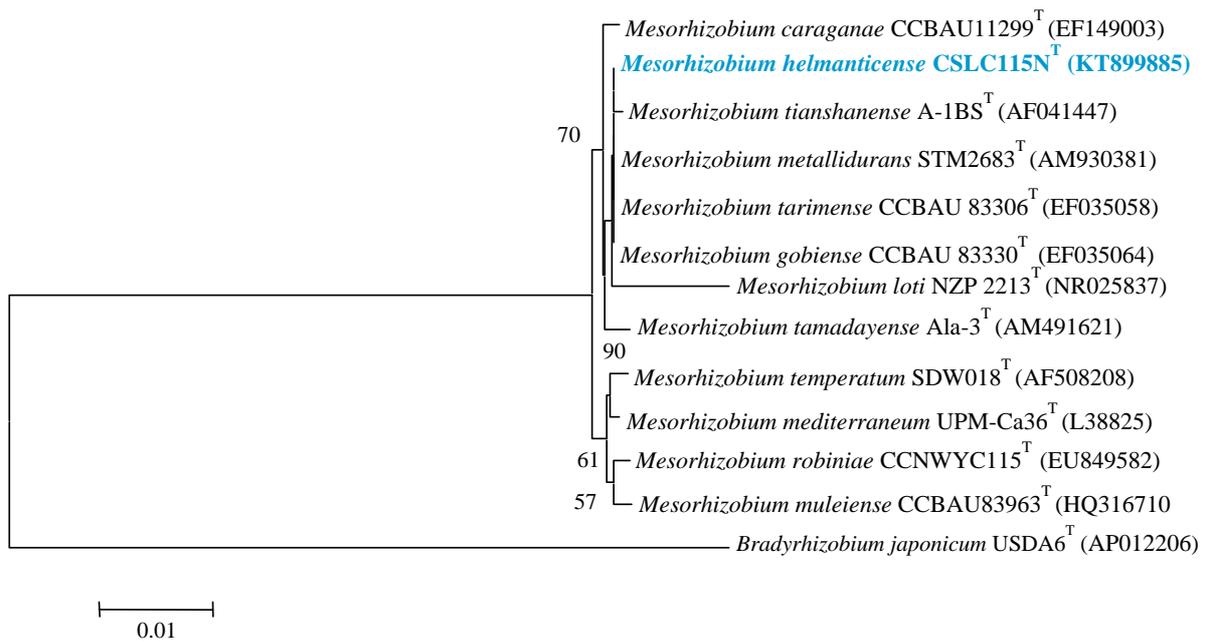
Figura 25. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *nodC* mostrando la posición de las cepas aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus* dentro del género *Mesorhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

### **3. *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov. aislada de nódulos de *Lotus corniculatus*.**

Actualmente, el género *Mesorhizobium* contiene más de 30 especies (<http://www.bacterio.net/mesorhizobium.html>), algunas de ellas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* incluyendo la especie tipo de este género, *M. loti*. Como hemos visto en los apartados anteriores donde describimos la filogenia de las cepas de *Mesorhizobium* aisladas, hay varios grupos filogenéticamente divergentes de las especies actualmente descritas del género *Mesorhizobium*. El objetivo de este apartado es realizar una caracterización polifásica de tres cepas de un grupo en concreto, que resultaron ser idénticas entre sí al realizar el análisis filogenético del gen ribosómico 16S y de los genes *housekeeping*, *recA* y *atpD*, CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N, para proponer una nueva especie denominada *M. helmanticense* sp. nov.

#### **3.1. Caracterización genotípica.**

En primer lugar se realizó un análisis del gen ribosómico 16S. Como las tres cepas tienen idéntica secuencia en dicho gen, únicamente se incluyó la cepa CSLC115N<sup>T</sup> en el análisis filogenético (figura 26). El resultado de este análisis mostró que la cepa CSLC115N<sup>T</sup> pertenece a un grupo que contiene las especies *M. metallidurans* STM2683<sup>T</sup>, *M. tianshanense* A1BS<sup>T</sup>, *M. tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup>, *M. gobiense* CCBAU 83330<sup>T</sup> y *M. caraganae* CCBAU11299<sup>T</sup>, que presentan valores similares, superiores al 99% con respecto a la cepa CSLC115N<sup>T</sup>. Estos altos valores de similitud respecto a las secuencias del gen ribosómico 16S es común encontrarlo entre las especies del género *Mesorhizobium* que es distinguible mediante el análisis de los genes *recA* y *glnII*, los cuales están disponibles para la mayoría de las especies de este género y permite la selección de cepas para los experimentos de hibridación ADN-ADN.



**Figura 26.** Arbol filogenético del gen ribosómico 16S, mostrando la posición de *M. helmanticense* sp. nov. con las especies más próximas del género *Mesorhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

El análisis de los genes *recA* y *glnII* concatenados nos mostró que las cepas CSLC115N<sup>T</sup>, CSLC19N y CSLC37N forman un cluster con las especies *M. metallidurans* STM2683<sup>T</sup>, *M. tianshanense* A1BS<sup>T</sup> y *M. tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup> (figura 27), con valores de similitud en ambos genes inferiores al 95%. Estos valores de similitud son inferiores a los presentados por otras especies de *Mesorhizobium*, lo que sugiere que las cepas CSLC115N<sup>T</sup>, CSLC19N y CSLC37N efectivamente pertenecen a una nueva especie del género *Mesorhizobium*.

Esta suposición fue confirmada al llevar a cabo los experimentos de hibridación ADN-ADN. Las cepas CSLC115N<sup>T</sup> y CSLC19N mostraron una relación ADN-ADN del 98% ( $\pm 1\%$ ). La cepa CSLC115N<sup>T</sup> mostró un 44% ( $\pm 2\%$ ), un 41% ( $\pm 2\%$ ) y un 42% ( $\pm 4\%$ ) de relación en la hibridación con respecto a las especies *M. metallidurans* STM2683<sup>T</sup>, *M. tianshanense* A1BS<sup>T</sup> y *M. tarimense* CCBAU 83306<sup>T</sup>, respectivamente. Estos valores son inferiores al valor umbral de 70% de similitud entre ADN y ADN para la definición de especies bacterianas (Wayne et al. 1987), lo que confirma que las cepas noduladoras de *L. corniculatus* aisladas en Salamanca pertenecen a una nueva especie del género *Mesorhizobium*.

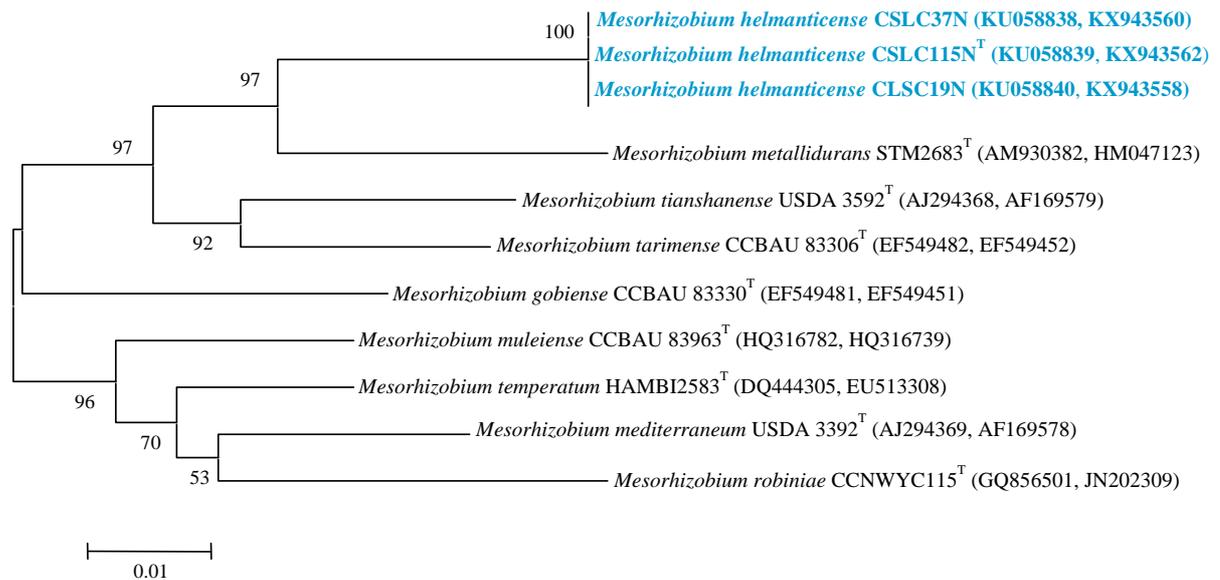


Figura 27. Arbol filogenético de los genes *recA* y *glnII* concatenados, mostrando la posición de *M. helmanticense* sp. nov. con el género *Mesorhizobium*. El análisis se ha obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro Kimura 2, basándose en 1000 réplicas.

### 3.2. Quimiotaxonomía: ácidos grasos.

Se llevó a cabo un análisis de los ácidos grasos celulares (tabla 30). Este análisis fue por primera vez introducido por Abel et al. (Abel et al. 1963) para la identificación de bacterias y se emplea para caracterizar fenotípicamente a las bacterias. Los principales ácidos grasos de la cepa CSLC115N<sup>T</sup> son “summed feature” 8 (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) y C18:1ω7c 11-metilo como en las especies de *Mesorhizobium* más próximas a ella (Tabla 3). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos para varias especies de *Mesorhizobium*, incluyendo la especie tipo de este género *M. loti* (Han et al. 2008). Los perfiles de ácidos grasos de las cepas aisladas en este estudio mostraron algunas diferencias entre ellas, apoyando la teoría de que no son clones. La nueva especie difiere de sus especies relacionadas más cercanas en presencia de cantidades ligeramente mayores de los ácidos grasos anteriormente mencionados “summed feature 8” (tabla 30).

Tabla 30. Composición de ácidos grasos de *M. helmanticense* sp. nov. y sus especies más próximas *M. metallidurans* LMG 24485<sup>T</sup>, *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> y *M. tarimense* LMG 24338<sup>T</sup>, y la cepa tipo de la especie tipo del género *Mesorhizobium*, *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.

**Cepas:** 1, *M. helmanticense* CSLC115N<sup>T</sup>; 2, *M. helmanticense* CSLC19N; 3, *M. helmanticense* CSLC37N; *M. metallidurans* LMG 24485<sup>T</sup>, *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> y *M. tarimense* LMG 24338<sup>T</sup>; *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>. Los ácidos grasos presentes en cantidades inferiores al 1% no se muestran. Nd, no detectado. Los datos son de este estudio.

Ácidos grasos	1	2	3	4	5	6	7
C <sub>16:0</sub>	12.9	10.7	11.0	10.4	11.6	15.7	13.9
C <sub>17:0</sub>	nd	nd	1.2	nd	nd	1.1	nd
C <sub>18:0</sub>	2.2	5.1	5.3	3.1	2.5	3.8	5.6
C <sub>12:0</sub> 2 OH	0.5	1.0	0.2	nd	nd	nd	nd
C <sub>12:0</sub> 3 OH	0.6	1.4	0.7	1.1	nd	1.1	nd
C <sub>13:0</sub> iso 3 OH	1.7	2.1	1.0	3.6	2.5	2.3	nd
C <sub>17:0</sub> iso	5.9	6.0	3.0	6.0	5.7	4.1	4.6
C <sub>20:2</sub> ω 6,9c	3.2	nd	0.5	nd	1.4	0.5	nd
summed feature 3 (C <sub>16:1</sub> ω 7c/ C <sub>16:1</sub> ω 6c)	1.9	nd	1.1	nd	2.1	1.7	nd
summed feature 8 (C <sub>18:1</sub> ω 7c/ C <sub>18:1</sub> ω 6c)	42.8	45.5	44.4	33.7	40.2	35.8	43.6
C <sub>19:0</sub> 10-methyl	1.6	nd	0.7	1.2	2.5	1.6	nd
C <sub>18:1</sub> ω 7c 11-methyl	17.8	10.1	11.8	18.4	16.6	14.4	16.0
C <sub>19:0</sub> cyclo ω 8c	7.1	18.1	17.3	21.7	14.1	16.1	16.3

### 3.3. Caracterización fenotípica de la especie *M. helmanticense*.

Las características fenotípicas de la nueva especie se describen a continuación en la descripción de la especie y las diferencias con respecto a las especies más cercanas de *Mesorhizobium* se registran en la tabla 31.

**Tabla 31.** Diferencias fenotípicas entre la nueva especie de *M. helmanticense* sp. Nov. y sus especies más próximas *M. metallidurans* LMG 24485<sup>T</sup>, *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> y *M. tarimense* LMG 24338<sup>T</sup>, y la cepa tipo de la especie tipo del género *Mesorhizobium*, *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.

**Cepas:** 1, *M. helmanticense* CSLC115N<sup>T</sup>; 2, *M. helmanticense* CSLC19N; 3, *M. helmanticense* CSLC37N; *M. metallidurans* LMG 24485<sup>T</sup>, *M. tianshanense* USDA 3592<sup>T</sup> y *M. tarimense* LMG 24338<sup>T</sup>; *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.

+: positivo; -: negativo; d: débil.

Los datos son de este estudio.

Características	1	2	3	4	5	6	7
Crecimiento a pH 5	+	+	+	-	+	+	d
Crecimiento a pH 9	+	+	+	-	+	+	+
Crecimiento en presencia de 1% NaCl	+	+	+	-	-	-	-
<b>Hidrólisis de:</b>							
PNP- $\alpha$ -L- arabinopiranosido	-	-	-	-	+	+	+
PNP- $\beta$ -L- arabinopiranosido	-	-	-	-	+	-	+
PNP- $\alpha$ -D-maltopiranosido	+	+	+	-	-	-	-
PNP- $\alpha$ -D-xilopiranosido	-	-	-	-	+	+	d
PNP- $\beta$ -D- xilopiranosido	-	-	-	-	+	+	+
<b>Asimilación de (API ID32GN):</b>							
Gluconato	-	-	-	-	+	d	-
Asimilación de (API ID32GN):							
3-hidroxi-butarato	-	-	-	+	-	+	d
Melibiosa	+	+	+	-	d	-	+
<b>Resistencia a:</b>							
Eritromicina	+	+	+	+	-	-	+
Ampicilina	+	+	+	+	+	-	+

### 3.4. Descripción de *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov.

*Mesorhizobium helmanticense* (hel.man.ti.cen'se N.L. neut. Adj. Helmanticense perteneciente a Helmantica, el nombre de Salamanca en tiempos romanos).

Son bacilos aerobios gram-negativos que tienen 0,3-0,5  $\mu$ m de ancho y 1,5-3,0  $\mu$ m de largo. Las colonias en YMA son blancas, circulares y convexas con diámetro de 1-2 mm alrededor de 4-5 días posteriores a su incubación a 28°C. Posee un intervalo de crecimiento de 5°C a 35°C, con un óptimo en 28°C. El intervalo de pH para el

crecimiento es de 5 a 9 con un crecimiento óptimo a pH 7. Son capaces de crecer hasta un contenido de 1% en NaCl. Son catalasa y oxidasa positivo. La reducción de nitrato, la producción de indol y H<sub>2</sub>S, la arginina deshidrolasa y la gelatinasa son negativas y la ureasa es positiva. La hidrólisis de esculina es positiva. La producción de  $\beta$ -galactosaminidasa,  $\alpha$  y  $\beta$ -arabinosidasas,  $\alpha$  y  $\beta$ -fucosidasas,  $\alpha$  galactosidasa, lacotosidasa,  $\beta$ -maltosidasa,  $\beta$ -celobiasa,  $\alpha$  y  $\beta$ -manosidasa,  $\alpha$  ramnosidasa,  $\alpha$  y  $\beta$ -xilosidasa, galacturonidasa, glucuronidasa y ácido fosfatasas es negativa. La producción de ácido a partir de manitol es positiva. La asimilación como única fuente de carbono de glucosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-ribosa, D-manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, inositol, maltosa, sacarosa, salicina, melibiose, L-fucosa, D-sorbitol, Malato, L-histidina, 3-hidroxi-butirato y L-prolina es positivo. La asimilación de gluconato, caprato, adipato, citrato, fenilacetato, itaconato, suberato, malonato, propionato, valerato, 2-ceto-gluconato, 3 y 4 hidroxi-benzoato y L-serina es negativa.

La asimilación de acetato, D, L-lactato, glucógeno y 5-ceto-gluconato es débil. Es sensible a neomicina, penicilina, cefuroxima, ciprofloxacina y tetraciclina y resistente a ampicilina, cloxacilina, polimixina B y eritromicina. La resistencia a gentamicina fue variable con resultado positivo para la cepa tipo y resultados negativos para las otras dos cepas. Los principales ácidos grasos son los de la característica sumada 8 (C<sub>18:1</sub>ω7c/C<sub>18:1</sub>ω6c) y C<sub>18:1</sub>ω7c 11-metilo. El contenido de G + C de la cepa tipo fue de 62,7% en moles. La cepa tipo CSLC115N<sup>T</sup> (= LMG 29734<sup>T</sup> = CECT 9186<sup>T</sup>) se aisló de los nódulos radiculares de *Lotus corniculatus* en España.



Estudio de la capacidad para  
promover el crecimiento vegetal  
de los aislados.



## CAPÍTULO II



Los microorganismos asociados a las plantas cumplen importantes funciones sobre el crecimiento de las mismas y su salud. Muchas de las cepas bacterianas que encontramos en la rizosfera poseen mecanismos para promover el crecimiento vegetal; se conocen como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). La promoción directa del crecimiento de la planta por los microorganismos se basa, entre otros, en la mejora de la adquisición de nutrientes y en la estimulación hormonal. Esta promoción puede tener lugar de diversas maneras; por ejemplo, a través de la solubilización de P, la producción de sideróforos, el aumento de la disponibilidad de Fe, producción del ácido 3-indol-acético o AIA (auxinas) o produciendo enzimas como la ACC desaminasa. Los microorganismos que presenten uno o más de estos mecanismos pueden ser capaces de promover un crecimiento muy positivo en las plantas.

Por otro lado, los microorganismos también pueden asociarse a las plantas a través estructuras conocidas como biofilms (biopelículas), que pueden estar constituidas por pequeños grupos de células o por extensas biopelículas (Webb, et al., 2003; Parsek y Fuqua, 2004; Stoodley, et al., 2002). Las propiedades superficiales de los tejidos vegetales, la disponibilidad de nutrientes y de agua y la tendencia de las bacterias colonizadoras, influyen fuertemente en la estructura del biofilm resultante (Ramey, 2004). Además, las bacterias rizosféricas son capaces de producir exopolisacáridos, que no solamente proporcionan ventajas a las células bacterianas, sino que también aumentan la agregación del suelo, que a su vez mejora la estabilidad del agua, que es crítico para la supervivencia de la planta. Dentro de esta beneficiosa interacción, la celulosa juega un papel muy importante ya que forma parte de la matriz de unión entre los microorganismos y la planta.

Existe una larga y amplia bibliografía sobre el uso de PGPRs como inoculantes en distintos cultivos agrícolas, en los cuales producen un incremento del rendimiento y producción, a la vez que se mejora su contenido nutricional (García-Fraile et al. 2012; Flores-Félix et al. 2013; Flores-Félix et al. 2015; Jiménez-Gómez et al. 2016; Díez-Méndez et al. 2016).

Por todo ello, era esencial estudiar los diferentes mecanismos PGPR, así como de producción de celulosa y biofilms que podrían presentar cada una de las 90 cepas aisladas, con el objetivo de poder usar las mejores como futuros inoculantes.

### **1. Solubilización de fosfato.**

El fósforo es un micronutriente esencial para todos los seres vivos, los cuales lo demandan en cantidades apreciables debido a que forma parte de la composición de las moléculas orgánicas esenciales para la vida. En las plantas, los principales procesos bioquímicos, la fotosíntesis y la respiración, son activados por el P inorgánico y/o sus derivados orgánicos (Calderón-Vázquez et al. 2009; Maathuis 2009).

Las cepas aisladas se examinaron en relación a su capacidad para solubilizar fosfato inorgánico empleando el medio Pikovskya. Para ello, se sembraron todas las cepas y se dejaron crecer durante varios días a 28°C; de tal manera que aquellas cepas que son solubilizadoras de fosfato, mostraron un halo transparente alrededor de la colonia (Figura 28).

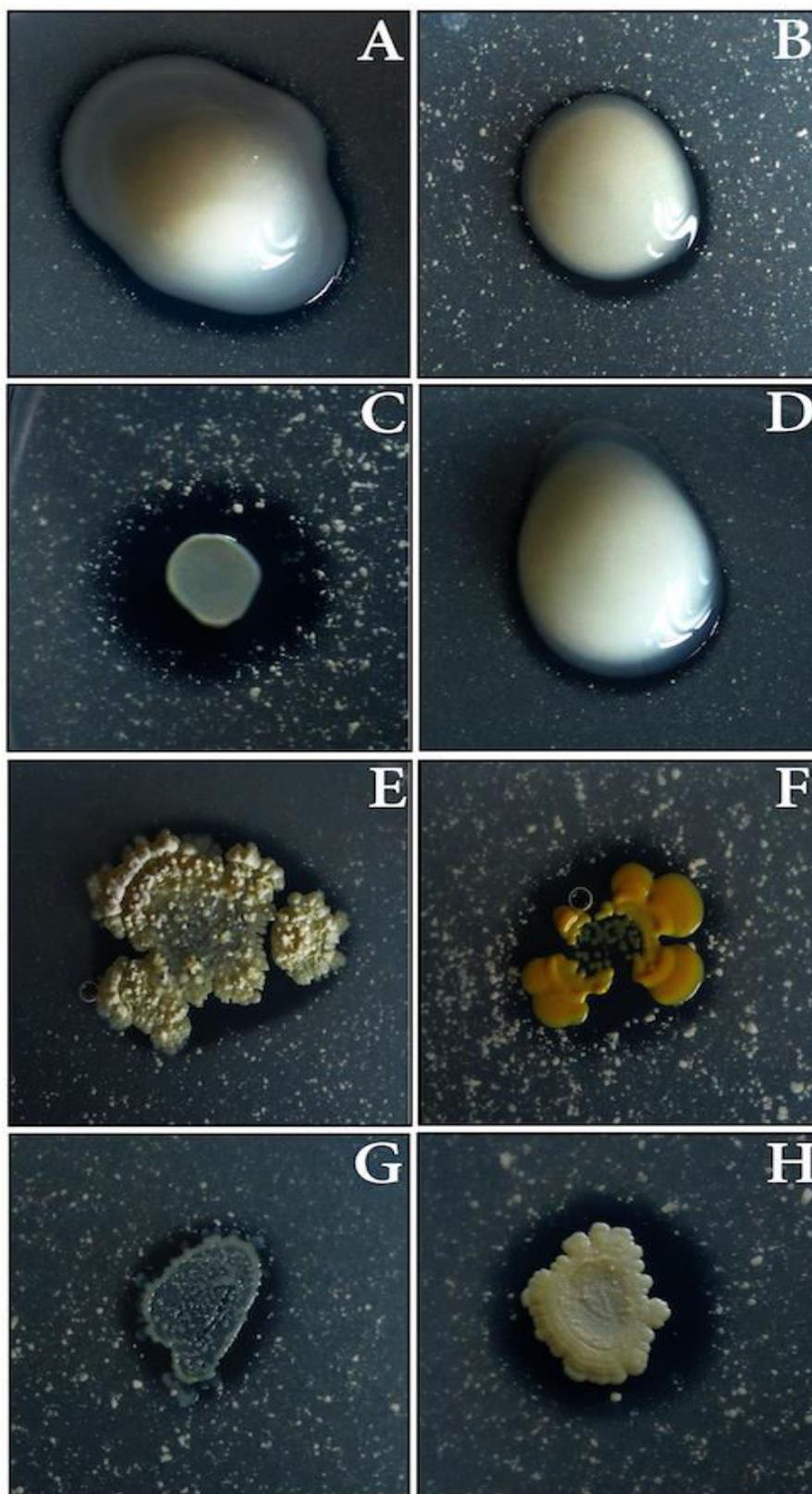


Figura 28. La imagen muestra la solubilización de Fosfato inorgánico de 8 cepas diferentes crecidas a 28°C durante 15 días. A) *Mesorhizobium jarvisii* CSLC03N, B) *M. jarvisii* CSLC29N, C) *M. jarvisii* CSLC36N, D) *M. jarvisii* CSLC38N, E) *Streptomyces* sp. CSLC56N, F) *Pseudoclavibacter helvolus* CSLC66N, G) *Paenibacillus* sp. CSLC76N y H) *Staphylococcus succinus* CSLC117N. Imágenes tomadas con cámara fotográfica (Nikon).

Los resultados obtenidos fueron muy positivos para las cepas aisladas del género *Mesorhizobium*, debido a que todas mostraron solubilización de fosfato con un marcado halo de actividad pasados los 20 días de crecimiento a 28°C. Que los rizobia solubilicen fosfato es algo que ya ha sido previamente corroborado en otros ensayos anteriores (Kämpfer 2007; Rivas et al. 2007).

Es interesante destacar que únicamente la cepa *Mesorhizobium jarvisii* CSLC36N produjo solubilización pasados 7 días. A los 14 días pudimos observar halos de hidrólisis de otras 11 cepas más: CSLC03N, CSLC04N, CSLC09N, CSLC10N, CSLC14N, CSLC26N, CSLC29N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N y CSLC116N, repartidas en tres especies diferentes, *M. jarvisii* (CSLC03N, CSLC29N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N y CSLC116N), *M. caraganae* (CSLC04N y CSLC10N) y *Mesorhizobium* sp. de dos grupos filogenéticamente divergentes (CSLC09N y CSLC14N y CSLC26N). Las diferencias de solubilización mostrada por cada una de las cepas a distintos tiempos, no hace más que confirmar la idea de que la solubilización de fosfato varía entre diferentes cepas pertenecientes a una misma especie (Peix et al. 2001). Llama la atención, además, que ninguna de las cepas pertenecientes a la nueva especie aislada, *Mesorhizobium helmanticensis*, CSLC08N, CSLC19N, CSLC23N, CSLC37 y CSLC115N, mostraron un buen halo de solubilización hasta pasados 20 días.

Por otro lado, los resultados de los 52 endófitos aislados fueron divididos según el halo de actividad que presentaron; de esta manera el 46,1% mostró un importante halo de actividad; el 26,9 % un halo débil y el 13,5% un halo muy débil. El 13,5% restante no presentaron halo de actividad, siendo cepas negativas en la solubilización de fosfato.

Las cepas endófitas positivas se reparten entre diferentes géneros, como por ejemplo: *Staphylococcus* sp. CSLC62N, CSLC117N, *Dermaococcus* sp. CSLC64N y CSLC93N, *Sreptomycetes* sp. CSLC55N y CSLC56N, *Pseudoclavivacter* sp. CSLC66N, *Paenarthrobacter* sp. CSLC71N, *Pseudarthrobacter* sp. CSLC78N, *Bacillus* sp. CSLC86N, *Paenibacillus* sp. CSLC76N, *Micromonospora* sp. CSLC88N, CSLC102N, CSLC105N y CSLC106N, *Acinetobacter radioresistens* CSLC81N o *Rhizobium* sp. CSLC25N.

Podríamos decir, por tanto, que la solubilización de fosfato es una característica común entre los diferentes géneros de bacterias aislados del interior de los nódulos de *Lotus corniculatus*.

Después del nitrógeno (N), el fósforo es el segundo mineral más importante del mundo, debido a que es esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Vance 2001). Las bacterias solubilizadoras de fosfato mejoran la fertilidad del suelo y su salud, al ser capaces de convertir las formas insolubles de P en formas solubles y por tanto asimilables para la planta. Como consecuencia de ello, la aplicación de estas bacterias ha aumentado de manera notable en la agricultura (Arcand y Schneider 2006; Hameeda et al. 2008; Yazdani et al. 2009). Esto resulta coherente si tenemos en cuenta que gran

parte del P inorgánico que es aplicado como fertilizante, se convierte rápidamente en formas no disponibles para las plantas y con baja solubilidad también en el suelo como resultado, entre otros factores, del escurrimiento y la lixiviación (Vassilev y Vassileva 2003; Miller et al. 2009). La selección de bacterias solubilizadoras de fosfato resulta una estrategia muy prometedora a la hora de aplicarlas, por ejemplo, en suelos con deficiencia de dicho elemento, constituyendo además una ventaja en una agricultura sostenible y/o alternativa, donde la conservación de los nutrientes resulta de vital importancia. Hay que tener en cuenta que las plantas requieren, aproximadamente, 30  $\mu\text{mol/L}$  de fósforo para una productividad máxima, pero tan solo esta disponible en 1  $\mu\text{mol/L}$  en muchos suelos. Esta limitación del fósforo en el suelo constituye un factor limitante del crecimiento en los sistemas tanto agrícolas, como hortícolas (Daniels et al. 2009).

Se tiene constancia del aumento de la disponibilidad de P a las plantas mediante la inoculación de bacterias capaces de solubilizarlo en experimentos realizados tanto en invernadero, como en campo (Zaidi et al. 2003). También se ha observado la promoción del crecimiento del maíz al utilizar como biofertilizante, bacterias que presentaban la capacidad de solubilizar fosfato y que se identificaban en diferentes géneros como *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*. (Gulati et al. 2010), *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Azotobacter* (Yazdani et al. 2009). Otros estudios llevados a cabo en guisante, también demostraron la capacidad que poseen las bacterias, en este caso del género *Pseudomonas*, capaces de solubilizar el fósforo inorgánico en asimilable para la planta, en promover de una manera directa en el crecimiento de dicha planta (Oteino et al. 2015). Como así también se ha observado al inocular arroz (Gusain et al. 2015), soja (Fankem et al. 2015) y trigo (Babana y Antoun 2007) con bacterias del género *Pseudomonas*, con la capacidad de solubilizar dicho elemento mineral, así como la coinoculación de dicho género con *Rhizobium* en habas (*Vicia faba*) (Demissie et al. 2013). En habas también demostraron la eficacia de inocular con bacterias solubilizadoras de fosfato Walpola y Yoon (Walpola y Yoon 2013); del mismo modo se demostró también en tabasco (*Capsicum frutescens*) (Surapat et al. 2013).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ponen de manifiesto el gran potencial que presentan las cepas solubilizadoras de fosfato, tanto las rizobianas como las endófitas, de ser aplicadas como futuros biofertilizantes, al haber sido ampliamente demostrado que dicha característica PGPR, promueve de una manera evidente y positiva el desarrollo de las plantas sobre las que han sido aplicados.

## 2. Producción de sideróforos.

La capacidad de las plantas para conseguir el hierro en el medio ambiente es limitada, ya que el hierro normalmente se encuentra en formas insolubles. Por ello, la forma principal en que las plantas obtienen este elemento, es mediante los aportes de las bacterias por la producción de sideróforos (Masalha et al. 2000).

Realmente, el hierro es un nutriente esencial para prácticamente todas las formas de vida. Sin embargo, en el ambiente aeróbico, el hierro existe principalmente como  $\text{Fe}^{3+}$  y tiende a formar hidróxidos insolubles y oxihidróxidos, haciéndolo en gran parte inaccesible a los microorganismos. Es por ello que las bacterias han tenido que desarrollar estrategias para solubilizar este metal para una absorción eficiente del mismo y poder adquirir el suficiente hierro que necesitan para sobrevivir. La producción de sideróforos es una de las estrategias más comúnmente encontrada, desarrolladas por las bacterias. Esto les confiere la capacidad de quelar el hierro de baja masa molecular con altas constante de asociación para formar complejos de hierro 15 y 16 (Rajkumar et al. 2010).

De las 90 cepas aisladas, el 30% presentaron halo de actividad positivo. Dentro de este porcentaje tan solo 5 cepas del género *Mesorhizobium* (CSLC06N, CSLC11N, CSLC15N, CSLC36N y CSLC115N) presentaron una producción positiva (Figura 29A y B), de las cuales la cepa CSLC115N lo produce de una forma muy débil (figura 29B). Estos resultados nos llevan a pensar que no es una característica común de las especies de *Mesorhizobium* aisladas de *L. corniculatus* presentes en esta comarca salmantina.

En contraste, el 24,4% de los endófitos que presentaron una actividad positiva engloba una gran diversidad de géneros entre los que podemos encontrar cepas del género *Streptomyces* (CSLC55N, CSLC56N, CSLC57N, CSLC58N) *Paenarthrobacter* (CSLC54N, CSLC71N y CSLC80N), *Dermaococcus* (CSLC64N), *Lysinibacillus* (CSLC72N), *Acinetobacter* (CSLC81N) y *Micromonospora* (CSLC88N, CSLC89N, CSLC92N, CSLC94N, CSLC102N, CSLC106N, CSLC110N y CSLC113N) (Figura 29).

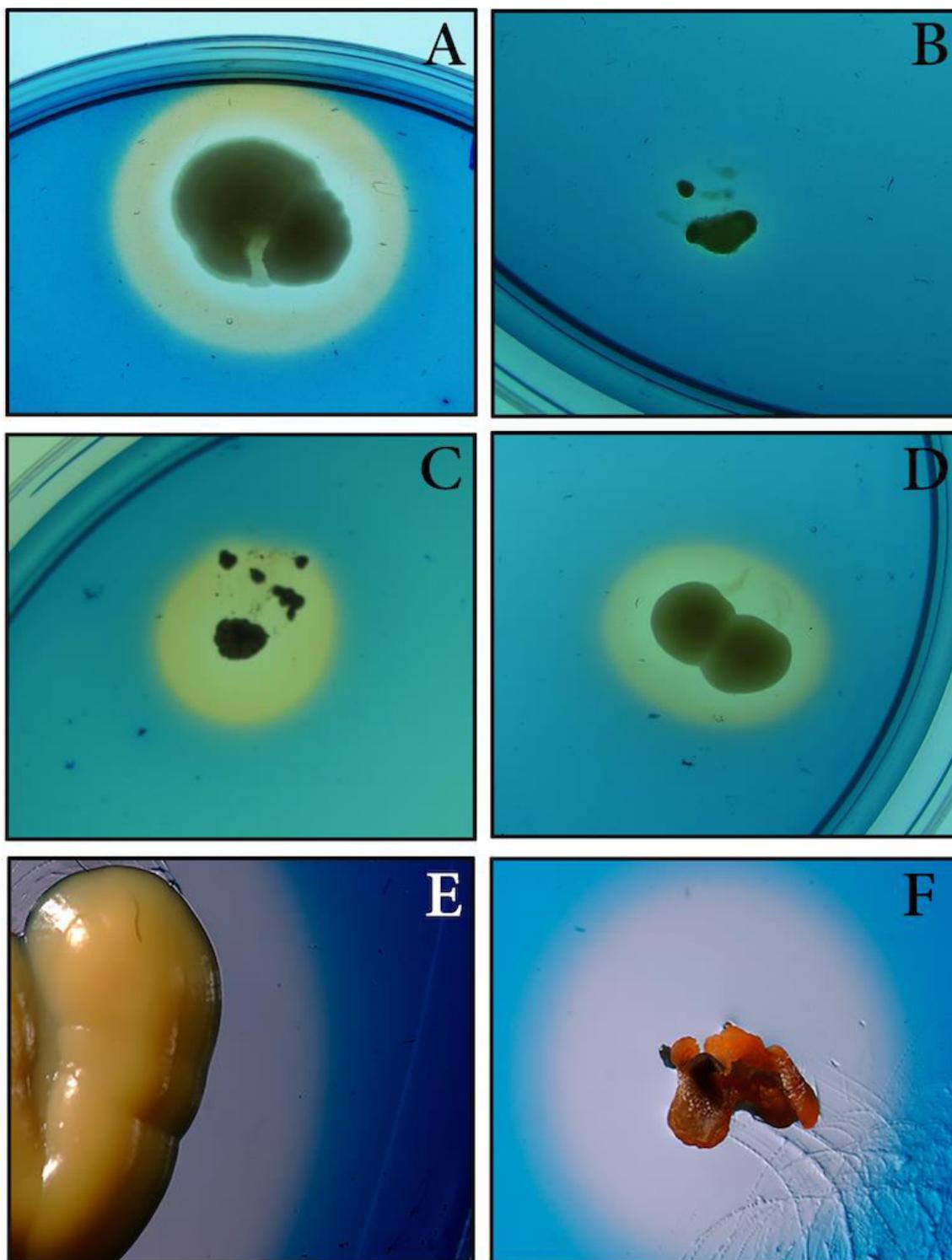


Figura 29. En la imagen podemos observar el mayor o menor halo de hidrólisis producido por diferentes especies aisladas, a distintos tiempos. Imágenes tomadas con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800): A) *Mesorhizobium* sp. CSLC11N; B) *Mesorhizobium* sp. CSLC15N; C) *Streptomyces* sp. CSLC56N y D) *Lysinibacillus* sp. CSLC72N; y con lupa estereoscópica: E) *Paenarthrobacter* sp. CSLC54N y F) *Micromonospora* sp. CSLC92N.

Asociado a las bacterias del género *Artrobacter* (Figura 29, E) se han descrito numerosos mecanismos para promover el crecimiento vegetal (Banerjee et al. 2010), identificados en algunas especies los sideróforos producidos dentro del tipo

hidroxamato (Kalinowski et al. 2000). Hace unos años se aisló del interior de nódulos de *Lespedeza* una cepa del género *Arthrobacter* con capacidad para producir sideróforos, por lo que este género puede ser un endófito habitual en nódulos de leguminosas (Palaniappan et al. 2010).

Las especies del género *Acinetobacter* son ubicuas, encontrándose en una amplia variedad de ambientes. Estas bacterias muestran una gran versatilidad metabólica y algunas son adecuadas para los sistemas modernos de manipulación genética molecular. Estas características están siendo explotadas en diversas aplicaciones biotecnológicas incluyendo la biodegradación y biorremediación (Gutnick y Bach 2008). Sin embargo, la utilización de algunas especies de este género presenta importantes problemas a la hora de formular biofertilizantes ya que son patógenos humanos de riesgo 2.

Otra de las cepas productoras de hierro pertenece al género *Lysinibacillus*. Asociadas a este género se han descrito cualidades potenciales para la biorremediación siendo capaces de degradar, entre otras sustancias, éteres de difenilo (Liang et al. 2009). Este hecho es muy importante, pues la misma bacteria, además de aportarle hierro a la planta, también degrada compuestos tóxicos para la planta.

Al igual que en el estudio realizado por da Silva *et al.*, (2008) observamos gran variabilidad entre los aislados pertenecientes al género *Streptomyces* con respecto a su capacidad para producir sideróforos. La capacidad de producir sideróforos es una actitud deseable en toda bacteria promotora del crecimiento vegetal, ya que la ausencia de hierro en las plantas provoca clorosis, esto es debido a que el hierro es un micronutriente necesario para la síntesis de clorofila, generando una reducción de la producción de la planta y un debilitamiento en el estado de salud general (Palaniappan et al. 2010).

Se ha estudiado y determinado la capacidad de promover el crecimiento vegetal por medio de la liberación de diferentes sustancias, entre las que se encuentran los sideróforos, en bacterias identificadas dentro de diferentes especies como *Pseudomonas putida* (Ahemad y Khan 2012a) y *P. aeruginosa* (Ahemad y Khan 2012b), *Acinetobacter* sp. (Farokh et al. 2011), *Paenibacillus polymyxa* (Phi et al. 2010), *Mesorhizobium* sp. (Wani et al. 2007; Ahmad et al. 2008b; Ahemad y Khan 2010b), *Bacillus* sp. (Ahmad et al. 2008b; Wani y Khan 2010), entre una amplia variedad de géneros (Ahemad y Kibret 2014).

Por otro lado, las bacterias productoras de sideróforos, que además son resistentes a los metales, desempeñan un papel importante en la supervivencia y el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con metales, constituyendo esta una característica biorremediadora (Rajkumar et al. 2010). Los sideróforos tienen la capacidad de unirse a una amplia variedad de metales, además del hierro, como por ejemplo el Al, el Pb y el Cd, protegiéndose de esa manera así mismos (Parmar y Chakraborty 2016). Esta característica ha hecho que los sideróforos hayan ganado

importancia en diferentes campos o áreas de aplicación. Además de ser útiles como agentes biorremediadores, también pueden ser aplicados como agentes de biocontrol, biosensores y agentes quelantes. En un estudio reciente observaron que dos cepas pertenecientes a especies diferentes, *Pseudomonas aeruginosa* P-7 y *Bacillus subtilis* BS-1, ambas productoras de sideróforos, eran capaces de mejorar el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con aceite diésel (Erdem et al. 2016).

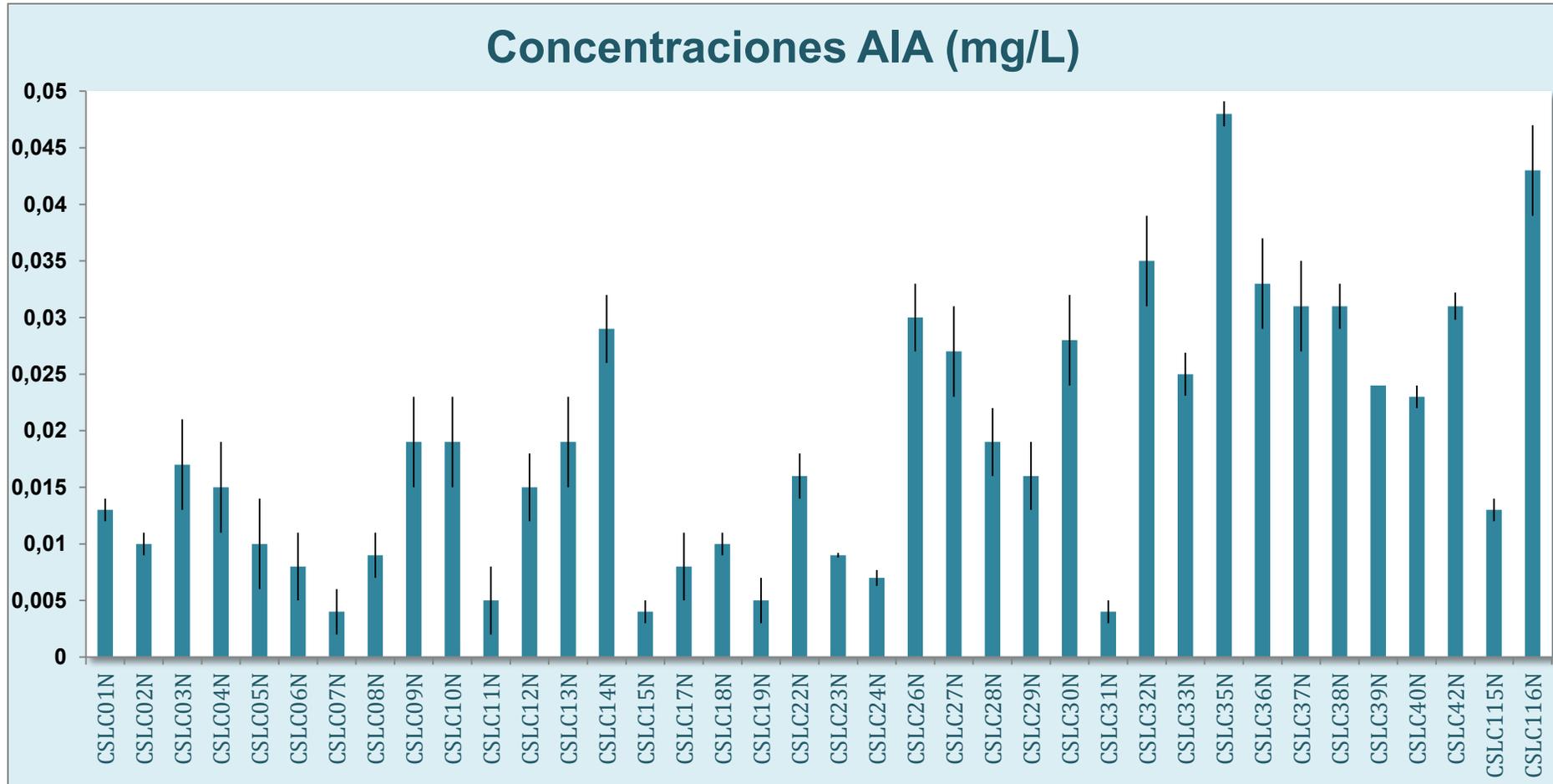
Para finalizar, queremos señalar que la capacidad de producir o capturar sideróforos es uno de los rasgos que hacen que los microorganismos productores de los mismos sean unos competidores exitosos en varios ambientes (Miethke y Marahiel 2007), facilitando la asociación entre la bacteria y la planta y contribuyendo a la colonización de raíces, tallos y hojas (Loaces et al. 2011). De esta manera, la capacidad de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal para producir sideróforos, es un factor determinante en el estudio de su potencial uso como biofertilizantes.

### 3. Producción de ácido indol-acético.

Las hormonas vegetales son mensajeros químicos que influyen en la habilidad de las plantas para responder al ambiente que le rodea. Existen cinco grupos principales de hormonas: auxinas, giberelinas, etileno, citoquininas y ácido abscísico. En concreto, el ácido 3-indol-acético (AIA) es un miembro del grupo de las fitohormonas y generalmente se considera la auxina nativa más importante (Ashrafuzzaman et al. 2009). Estas hormonas vegetales regulan diversos procesos del desarrollo vegetal, incluyendo la organogénesis, como el crecimiento de raíces y respuestas celulares tales como la expansión celular, la división y la diferenciación, así como la regulación de genes (Ryu y Patten 2008), por lo que su aplicación en agricultura es muy frecuente.

Entre sus funciones destaca la capacidad de inhibir el desarrollo de las yemas axiales, dando origen a un fenómeno que se conoce como dominancia apical, promover el fototropismo positivo, estimular el desarrollo de los frutos y promover el desarrollo de raíces laterales y adventicias.

Decidimos analizar por separado las cepas aisladas de *Mesorhizobium* (Gráfica 3) del resto de cepas endofíticas, debido a la gran variedad de géneros que aislamos y con distintas tasas de crecimiento.



Gráfica 3. Gráfica de las concentraciones en mg/ml de la media de las absorbancias medidas de cada una de las cepas del género *Mesorhizobium* aisladas de nódulos de *L. corniculatus* al realizar el ensayo de producción de AIA. Tanto la media como el error estándar corresponden a 3 medidas diferentes tomadas para cada una de las cepas.

Se trata de un método colorimétrico en el que se estima cuantitativamente la síntesis de auxinas derivadas del triptófano, como es el ácido indolacético. Como reactivo desencadenante de la coloración que posteriormente es medida, se utiliza Salkowski. Una vez obtenida la media de las medidas tomadas, procedimos a calcular la concentración en mg/L a partir de una recta patrón dado de ácido indolacético.

Todas las cepas mostraron una producción de ácido indolacético con diferente actividad (figura 30A). En términos generales, podemos hablar de producciones de AIA que estarían entre moderadas y débiles como así podemos ver en la gráfica 3; pero es destacable que todas las cepas, aunque algunas de forma reducida, muestran producción de AIA. Podemos destacar las concentraciones obtenidas de las cepas CSLC32N, CSLC35N y CSLC116N por encima del resto. Es por ello que se mandó una muestra de las mismas a analizar mediante cromatografía líquida de HPLC al servicio general de espectrometría de masas de la Universidad de Salamanca. Así mismo, también se envió una muestra representativa de las dos cepas que posteriormente se emplearon en los ensayos de producción en planta (Capítulo VI), CSLC28N y CSLC115N, junto con la cepa CSLC35N (tabla 32).

**Tabla 32. Detección de ácido 3-indol-acético mediante cromatografía líquida de HPLC.**

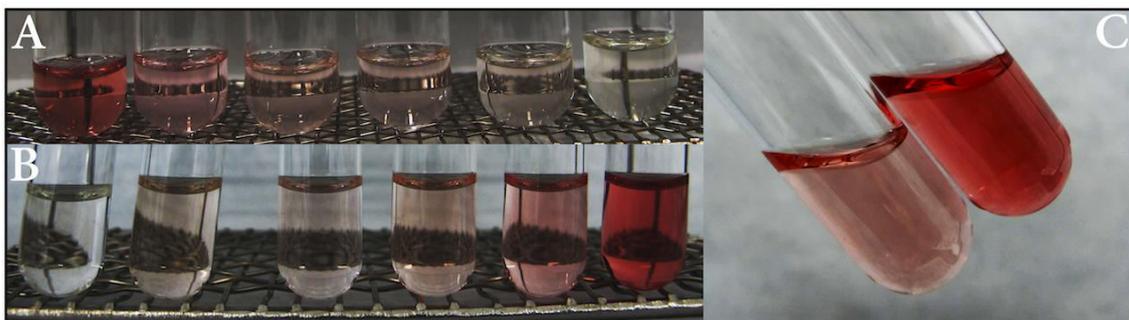
Muestra	Indolacético (mg/L)
CSLC28N	0,042
CSLC32N	1,450
CSLC35N	0,620
CSLC115N	0,008
CSLC116N	0,864

Como podemos observar en la tabla 32 de los resultados obtenidos del estudio de cromatografía líquida de HPLC, la cepa CSLC32N mostró una mayor producción en dicha fitohormona, de 1,450 mg/L, a pesar de haber obtenido un valor inferior, de 0,032 mg/L en el primer ensayo realizado. Por debajo nos encontramos las cepas CSLC116N y CSLC35N, con una detección de 0,864 mg/L y 0,620 mg/L, respectivamente. Finalmente las cepas CSLC28N y CSLC115N, muestran una producción inferior a las tres cepas anteriores, aunque ligeramente superior a la detectada mediante el análisis colorimétrico.

Es destacable apuntar que en cantidades altas, la auxina inhibe el crecimiento de las raíces primarias, aunque puede promover la formación de nuevas raíces secundarias. No obstante, en pequeñas cantidades, es capaz de estimular el crecimiento de las raíces. Por lo tanto, los valores obtenidos son positivos ya que ponen de manifiesto que

nuestros aislados pueden ser capaces de inducir el crecimiento de raíces, cualidad deseable en toda bacteria PGPR.

No es la primera vez que se encuentra *in vitro* la capacidad de producir AIA en bacterias del género *Mesorhizobium*, como así se realizó en estudios previos para detectar bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) (Ahmad et al. 2008a). Además, también se ha observado la capacidad de promover el crecimiento vegetativo del garbanzo, así como su nodulación, al realizar ensayos de inoculación en dicha planta con cepas del género *Mesorhizobium* con capacidad para producir AIA, entre otras características PGPR (Ahemad y Khan 2010a).



**Figura 30.** Variación de producción de AIA de diferentes cepas (de izquierda a derecha): *R. cellulosilyticum* CSLC25N, *Mesorhizobium* sp. CSLC32N, *Mesorhizobium* sp. CSLC27N, *M. jarvisii* CLSC01N, *M. jarvisii* CSLC02N y blanco; b) Blanco, *Methylobacterium goeisingense* CSLC47N, *Pseudarthrobacter* sp. CSLC78N, *Dermacoccus* sp. CSLC65N, *Streptomyces* sp. CSLC55N, *Bacillus* sp. CSLC77N y *Bacillus aryabhatai* CSLC79N; c) izquierda: *Bacillus* sp. CSLC77N y derecha: *Bacillus aryabhatai* CSLC79N.

Por otro lado, realizamos el ensayo con las cepas endófitas aisladas. De este ensayo solamente realizamos una repetición por cada cepa para tener una primera orientación de la capacidad de las mismas para producir AIA (tabla 33). Además, debemos tener en cuenta la complejidad que supondría analizar cada una de ellas entre sí, ya que pertenecen a géneros y especies diferentes.

En la tabla 33 aparecen ordenadas las diferentes cepas en función de la concentración obtenida en cada una de ellas, de mayor a menor valor.

Tabla 33. Tabla de las concentraciones en mg/ml de la media de las absorbancias medidas de las cepas endófitas al realizar el ensayo de producción de AIA.

CEPAS	mg/L	CEPAS	mg/L
<i>R. cellulosityticum</i> CSLC25N	0,732	<i>Pseudomona rizosphaerae</i> CSLC67N	0,011
<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC86N	0,188	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC107N	0,011
<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC79N	0,1861	<i>Microbacterium</i> sp. CSLC118N	0,011
<i>Staphylococcus succinus</i> CSLC117N	0,081	<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC41N	0,010
<i>Bacillus</i> sp. CSLC77N	0,062	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC105N	0,010
<i>Streptomyces drozdowiczii</i> CSLC58N	0,0534	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC113N	0,010
<i>Streptomyces</i> sp. CSLC119N	0,047	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC87N	0,009
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> CSLC63N	0,042	<i>Streptomyces enissocaesilis</i> CSLC56N	0,007
<i>Paenarthrobacter</i> sp. CSLC54N	0,040	<i>Streptomyces</i> sp. CSLC57N	0,007
<i>Dermaococcus</i> sp. CSLC65N	0,039	<i>Methylobacterium goesingense</i> CSLC47N	0,007
<i>Lysinibacillus</i> sp. CSLC72N	0,034	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC111N	0,004
<i>Dermaococcus</i> sp. CSLC69N	0,033	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC92N	0,004
<i>Streptomyces</i> sp. CSLC55N	0,030	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC94N	0,003
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> CSLC68N	0,030	<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> CSLC93N	0,003
<i>Paenarthrobacter</i> sp. CSLC80N	0,030	<i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC96N	0,003
<i>Pseudarthrobacter</i> sp. CSLC78N	0,029	<i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> CSLC71N	0,002
<i>M. saelicesensis</i> CSLC89N	0,019	<i>Paenibacillus</i> sp. CSLC76N	0,002
<i>Pseudoclavivacter helvolus</i> CSLC66N	0,017	<i>Micromonospora saelicesensis</i> CSLC100N	0,002
<i>Micromonospora</i> sp. CSLC102N	0,017	<i>Micromonospora saelicesensis</i> CSLC108N	0,0002
<i>Micromonospora</i> sp. CSLC90N	0,016	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC53N	0
<i>Micromonospora saelicesensis</i> CSLC97N	0,016	<i>Bacillus</i> sp. CSLC84N	0
<i>Arthrobacter</i> sp. CSLC46N	0,014	<i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC88N	0
<i>Dermaococcus nishinomiyaensis</i> CSLC64N	0,013	<i>Micromonospora palomenae</i> CSLC98N	0
<i>Roseomonas</i> sp. CSLC45N	0,012	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC106N	0
<i>Acinetobacter radioresistens</i> CSLC81N	0,012	<i>Micromonospora</i> sp. CSLC110N	0
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> CSLC62N	0,011	<i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC112N	0

Los resultados nos revelan mucha heterogeneidad entre las cepas endófitas. Por un lado, vemos que las dos cepas que mayor producción presentan, pertenecen a la misma especie: *Bacillus aryabhatai* CSLC79N y *Bacillus aryabhatai* CSLC86N. Muy por debajo estarían las cepas CSLC117N, identificada como *Staphylococcus succinus* y otra cepa perteneciente al género *Bacillus* sp. CSLC 77N.

Por otro lado, vemos cuatro cepas sin producción de AIA; estas son las cepas CSLC53N y CSLC106N identificadas como *Micromonospora saelicesensis*, CSLC98N, identificada como *Micromonospora palomenae*, y CSLC110N, identificada como *Micromonospora lupini*. En términos generales podemos decir que las cepas aisladas en este trabajo e identificadas dentro del género *Micromonospora* son deficientes en lo que se refiere a la producción de AIA.

Al igual que se hizo con las tres cepas más productoras del género *Mesorhizobium*, se envió una muestra de las 5 cepas con los valores más altos obtenidos al servicio general de espectrometría de masas de la Universidad de Salamanca (tabla 34).

**Tabla 34. Detección de ácido indolacético mediante cromatografía líquida de HPLC.**

Muestra	Indolacético (mg/L)
<i>R. cellulosilyticum</i> CSLC25N	0,208
<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC41N	0,030
<i>Arthrobacter</i> sp. CSLC46N	0,031
<i>Streptomyces enissocaesilis</i> CSLC56N	0,032
<i>Bacillus</i> sp. CSLC77N	0,855
<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC79N	0,422
<i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC86N	0,326
<i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC88N	0,033
<i>Staphylococcus succinus</i> CSLC117N	0,100

Como se puede observar en la tabla 33, la cepa *R. cellulosilyticum* CSLC25N que a priori era la que producía mayor cantidad de esta auxina, aparece según los datos reflejados en la tabla 34 como la segunda con menos producción. En el caso de la cepa *Bacillus* sp. CSLC77N que era la quinta con más producción, aquí aparece como la que más concentración de indolacético es capaz de producir por mL.

En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que el método colorimétrico no es capaz de detectar la producción débil de la fitohormona AIA. Este es el caso de *Micromonospora chokoriensis* CSLC88N ya que a través del método colorimétrico no conseguimos detectar la producción de AIA de esta cepa y sin embargo, de los resultados obtenidos del análisis mediante HPLC, observamos

que esta bacteria sí es capaz de producir esta fitohormona. En términos generales, podemos decir que los datos obtenidos de todas las cepas enviadas al servicio de espectrometría de masas para la determinación de AIA, son superiores a los obtenidos mediante el método colorimétrico. A pesar de ello, es indudable la utilidad de esta técnica para determinar e identificar las bacterias capaces de producir dicha fitohormona. No obstante, creemos que es conveniente realizar estudios de cromatografía líquida de HPLC, si queremos saber de una forma más exacta y concreta la concentración de estas auxinas que nuestras bacterias son capaces de producir, debido a que este método determina de una forma directa la concentración, y no a través de una absorbancia dada.

Las plantas albergan millones de bacterias productoras de AIA de géneros muy diversos como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Alcaligenes*, *Patoea* y *Streptomyces* (Apine y Jadhav 2011). Estas bacterias, por medio de la producción de esta fitohormona, son capaces de estimular la formación de pelos radiculares a la vez de aumentar el número y la longitud de las raíces laterales y primarias cuando están dentro de un rango de concentración ideal. No obstante, como señalábamos anteriormente, a concentraciones más altas, el AIA también puede inhibir el crecimiento de raíces primarias (Davies 2013). Un sistema radicular bien desarrollado es muy importante para la absorción de nutrientes y de agua, así como para anclar adecuadamente las plantas en el suelo. La planta responde de una manera beneficiosa a la bacteria, a la cual le proporciona un refugio, así como exudados que contienen nutrientes (Ahemad y Khan 2010a). La auxina AIA es por tanto una molécula de señalización recíproca en la interacción microorganismo-planta, manteniendo la relación simbiótica que ha evolucionado entre las plantas hospedadoras y los microorganismos asociados a ellos (Malhotra y Srivastava 2009; Duca et al. 2014).

#### **4. Determinación cualitativa de la producción de celulosa.**

El proceso de infección que se establece en la mayoría de las leguminosas comienza con la penetración de los rizobios a través de los pelos radicales. Una característica de los rizobios es su capacidad de formar agregados y biofilms para adherirse tanto a la raíz de las plantas como a las partículas de la rizosfera y así evitar ser desplazados de sus nichos ecológicos. La adhesión y posterior colonización de la raíz por los rizobios se produce mediante proteínas secretadas al exterior y polisacáridos de superficie. La importancia de los polisacáridos bacterianos en la adhesión a la punta de los pelos radicales y el posterior desarrollo del proceso infectivo parece crítica y, además, se ha demostrado su implicación en la competitividad de las cepas (Williams et al. 2008). Entre estos polisacáridos se encuentra la celulosa, entre cuyas funciones se encuentran: adhesión, agregación de las células bacterianas, cohesión de biofilms (Robledo et al. 2012), retención de

agua, absorción de compuestos orgánicos, etc. Es posible que los rizobios puedan utilizar la producción de celulosa no sólo para adherirse a las raíces de leguminosas sino también a cualquier tipo de planta.

Para evaluar la capacidad cualitativa de producir celulosa de nuestros aislados, se elaboró una escala con dos niveles de coloración. Por una parte, los aislados que presentaron una coloración roja intensa, producen más celulosa que aquellos que mostraron una coloración débilmente rosácea o incluso blanquecina, calificando a éste grupo cómo productores débiles de celulosa o no productores de celulosa.

Comenzamos realizando un primer ensayo de producción de celulosa sobre las cepas del género *Mesorhizobium* aisladas en el estudio obteniendo distintas intensidades de producción (figura 31).



Figura 31. Las cepas del género *Mesorhizobium* que mostraron producción de celulosa fueron las siguientes: CSLC05N, CSLC06N, CSLC07N, CSLC08N, CSLC11N, CSLC15N, CSLC18N, CSLC19N, CSLC23N, CSLC24N, CSLC31N, CSLC37N, CSLC40N y CSLC115N. Las cepas de *Mesorhizobium* que mostraron una débil producción de celulosa fueron: CSLC04N, CSLC10N, CSLC17N y CSLC30N.

De un total de 38 cepas analizadas, el 37% de ellas mostraron una buena producción de celulosa y un 10,5% una producción débil de la misma. El 52,5% restante de las cepas mostraron una muy débil producción de dicho polisacárido (tabla 35).

**Tabla 35. Agrupación de cepas según su diferente producción de celulosa.**

+: positivo	D: débil	MD: muy débil.
+	D	MD
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC05N	<i>M. caraganae</i> CSLC04N	<i>M. jarvisii</i> CSLC01N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC06N	<i>M. caraganae</i> CSLC10N	<i>M. jarvisii</i> CSLC02N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC07N	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>M. jarvisii</i> CSLC03N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC08N	CSLC17N	<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC09N
<i>M. jarvisii</i> CSLC11N	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>M. jarvisii</i> CSLC12N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC15N	CSLC30N	<i>M. jarvisii</i> CSLC13N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC18N		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC14N
<i>M. helmanticensis</i> CSLC19N		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC22N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC23N		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC26N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC24N		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC27N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC31N		<i>M. jarvisii</i> CSLC28N
<i>M. helmanticensis</i> CSLC37N		<i>M. jarvisii</i> CSLC29N
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC40N		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC32N
<i>M. helmanticensis</i> CSLC115N		<i>M. jarvisii</i> CSLC33N
		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC35N
		<i>M. jarvisii</i> CSLC36N
		<i>M. jarvisii</i> CSLC38N
		<i>M. jarvisii</i> CSLC39N
		<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC42N
		<i>M. jarvisii</i> CSLC116N

Según nuestros resultados, muchas de las cepas aisladas del género *Mesorhizobium* son efectivas en la producción de celulosa, por lo que es muy posible que la utilicen para participar en etapas de adhesión y anclaje a los pelos radicales y a la superficie de la raíz mediante su disposición en microfibrillas (Dazzo et al. 1984; Mateos et al. 1995) facilitando de esta manera su colonización en la planta, así como ayudando a formar biofilms en plantas (Robledo et al. 2012).

Completamos estos resultados realizando el ensayo de la producción de celulosa sobre las 52 cepas restantes endófitas (figura 32).



Figura 32. Las cepas que mostraron producción de celulosa fueron las siguientes: *Bacillus aryabhatai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Methylobacterium goeingense* CSLC47N, *Streptomyces drozdowiczii* CSLC58N, *Pseudarthrobacter oxydans* CSLC78N, *Micromonospora* sp. CSLC87N, *Micromonospora* sp. CSLC94N y *Micromonospora palomenae* CSLC98N. Las cepas que mostraron una débil producción de celulosa fueron: *R. cellulosityticum* CSLC25N, *Roseomonas* sp. CSLC45N, *Paenarthrobacter* sp. CSLC54N, *Streptomyces* sp. CSLC55N, *Streptomyces enissocaesilis* CSLC56N, *Staphylococcus saprophyticus* CSLC62N, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* CSLC71N, *Lysinibacillus* sp. CSLC72N, *Paenibacillus* sp. CSLC76N, *Bacillus* sp. CSLC77N, *Bacillus aryabhatai* CSLC79N, *Bacillus* sp. CSLC84N, *Bacillus aryabhatai* CSLC86N, *Micromonospora chokoriensis* CSLC88N, *Micromonospora saelicesensis* CSLC97N, *Micromonospora* sp. CSLC105N, *Micromonospora* sp. CSLC107N y *Micromonospora* sp. CSLC111N.

Entre las cepas endofíticas encontramos que 28 de ellas resultaron positivas, aunque 19 de ellas en menor grado, siendo consideradas de producción débil.

Como hemos comentado con anterioridad de las 38 cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium*, 37% dieron una clara producción de celulosa; frente a estas,

tan solo el 17,3% de un total de 52 bacterias endofíticas produjeron celulosa. En proporción, las especies del género *Mesorhizobium* son productoras de celulosa más activas. Sin duda, esto puede estar relacionado con la habilidad que presentan las cepas de este género para colonizar las raíces de leguminosas como *Lotus corniculatus*.

La cepa *Arthrobacter sp.* CSLC46N resultó positiva. Son varias las especies del género *Arthrobacter* que se han aislado de suelos contaminados y que son capaces de degradar herbicidas y pesticidas, pudiendo ser buenos fitorremediadores y biorremediadores de residuos que contienen Cr (VI) (Meqharaj, *et al.* 2003). Además, algunas de ellas también pueden degradar pesticidas agrícolas en una relación sinergista con varias cepas de *Streptomyces*. Las especies del género *Methylobacterium*, como *Methylobacterium goesingense* CSLC47N que también resultó positiva, son extremadamente importantes porque pueden utilizar metanol y metilamina, entre otros compuestos, para crecer. Se cree que estas bacterias utilizan el metanol emitido por los estomas de las plantas para estimular el desarrollo de la misma, así como sus semillas, mediante la producción de fitohormonas (Lidstrom y Chistoserdova 2002).

Las cepas CSLC87N, CSLC88N, CSLC97N y CSLC98N, identificadas como especies del género *Micromonospora*, también dieron positivo en la producción de celulosa. Estudios realizados por (Coombes y Franco 2003), en el que aislaron actinobacterias endofíticas en tejidos sanos del trigo, mostraron el uso potencial que tienen estos microorganismos como agentes de control biológico. El género *Micromonospora* pertenece al filo Actinobacteria, con potenciales aplicaciones biotecnológicas. Estudios realizados por Trujillo *et al.* (Trujillo *et al.* 2010), demostraron la presencia de cepas de *Micromonospora* en nódulos de diferentes especies de leguminosas. Sin embargo, aún es poco lo que se sabe acerca de ellas y las relaciones que pueden establecer con las plantas.

La producción de celulosa por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede ser un factor esencial en la formulación de bioinoculantes, ya que estos endófitos son capaces de adherirse a las plantas por medio de la producción de celulosa, formando posteriormente biofilms que contribuyen al crecimiento, desarrollo y defensa de la planta.

Por ello, el siguiente paso de nuestro estudio fue hacer estudios *in vitro* para saber la posible implicación que la producción de celulosa puede tener sobre la formación de biofilms de cada uno de nuestros aislados que, como se ha comentado con anterioridad, es el polisacárido que domina en la matriz extracelular polimérica que rodea las bacterias del biofilm (Robledo *et al.* 2012).

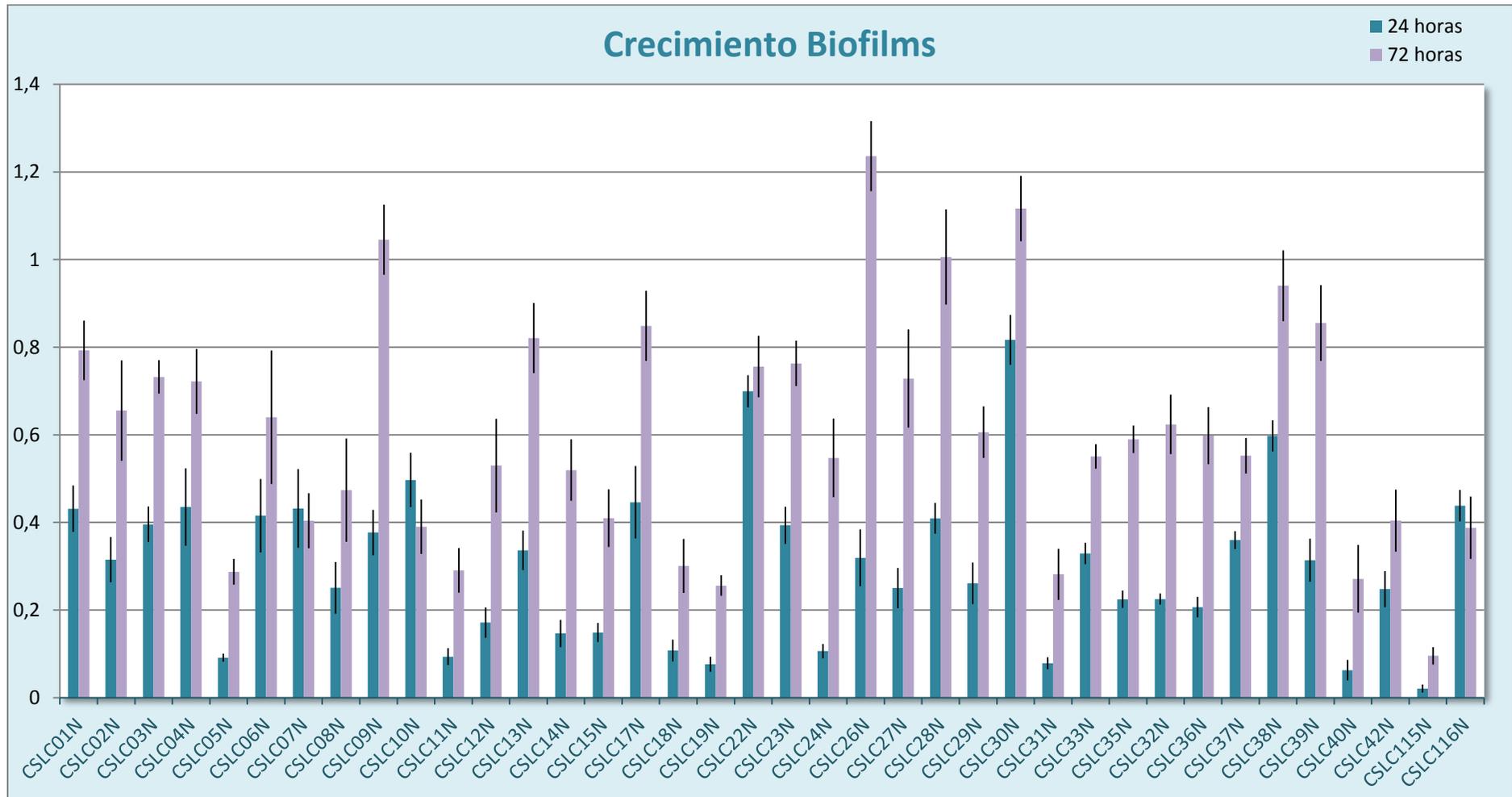
## **5. Determinación de la formación de biofilms *in vitro*.**

### **5.1. Determinación de biofilms en placas de microtitulación de poliestireno.**

Los ensayos relacionados con la formación de biofilms se llevaron a cabo según Fujishige *et al.* (Fujishige *et al.* 2006). Se utilizaron placas de microtitulación de poliestireno para determinar la capacidad de adhesión bacteriana a sustratos abióticos permitiendo realizar, de este modo, estimaciones cuantitativas. Las bacterias que sean capaces de adherirse a la superficie abiótica, tendrán la capacidad de formar biofilms; por el contrario otras no serán capaz de adherirse, permaneciendo suspendidas en el medio en estado planctónico.

El cristal violeta es un colorante que se utiliza para teñir las bacterias, tanto las que han conseguido adherirse a la superficie, como las que se encuentran en suspensión. Tras sucesivos lavados con agua, únicamente permanecerán teñidas aquellas que se adhirieron y unieron de forma irreversible al pocillo de la placa. Cuanto más intensa sea la coloración presente, más cantidad de bacteria ha conseguido quedar adherida y formar biofilms. Si a las 72 h una cepa muestra más coloración que la que se midió a las 24 h, es porque el biofilm ha conseguido afianzarse y mantenerse, suponiendo que además la cepa ha continuado creciendo.

Como en ensayos anteriores, comenzamos realizando la producción de biofilms sobre las cepas de rizobios aisladas en el estudio con el fin de obtener una primera aproximación del potencial de las bacterias para formar biofilms (gráfica 4).

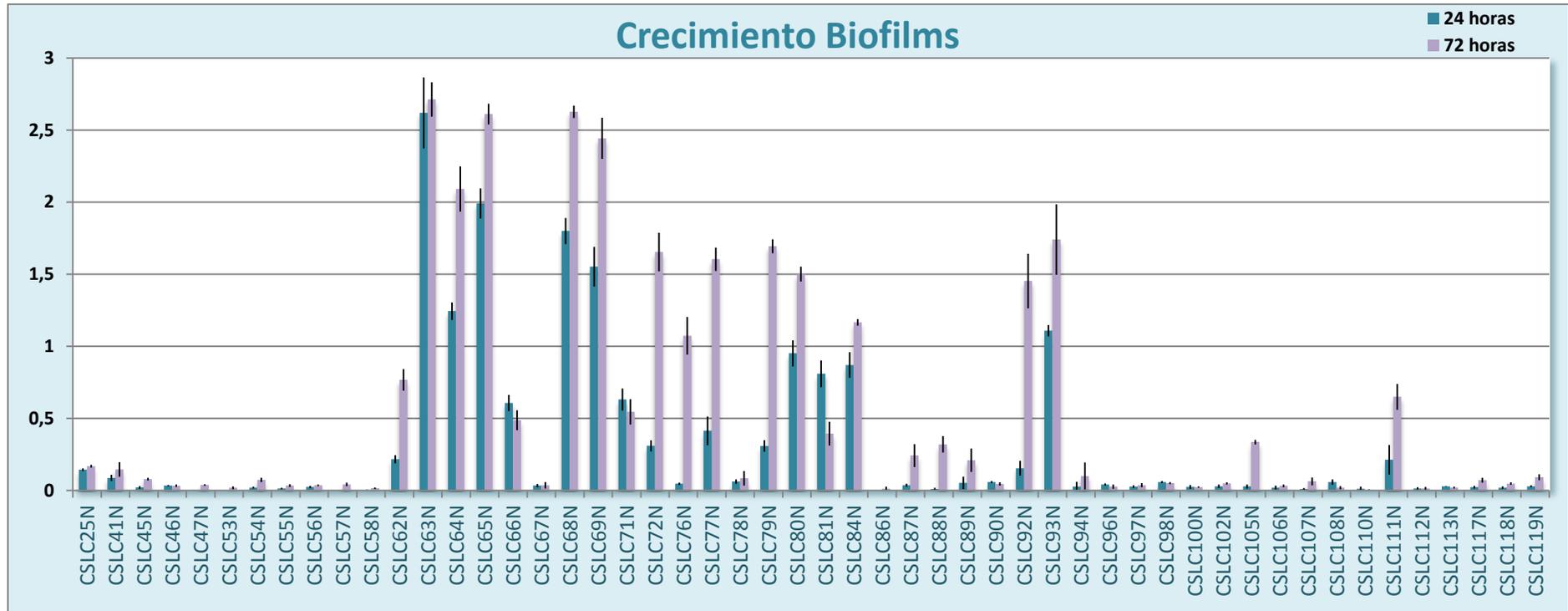


Gráfica 4. Resultados de las absorbancias medias para cada una de las cepas del *Mesorhizobium* a las 24h y 72h de crecimiento a 28°C en YMB. Tanto la media como el error estándar corresponden a 6 medidas diferentes tomadas para cada una de las cep

Los resultados de cada una de las cepas mostraron una clara tendencia positiva de la producción de biofilms a las 72h de su inoculación, excepto en las cepas CSLC07N, CSLC10N y CSLC116N, para las que la absorbancia medida fue inferior. En los tres casos a las 24h vemos una clara y consistente formación de biofilms. El que disminuya a las 72 h puede deberse a que los biofilms han madurado lo suficiente y han comienzan a disgregarse. También puede deberse a que la estructura tridimensional es tan grande que no consigue mantenerse y permanecer adherida, terminando por caer.

De las 38 cepas de *Mesorhizobium* en las que se ha determinado la formación de biofilm, en el 90% de los casos el biofilm aumenta a las 72h. Todas las cepas tienen un patrón común pero las cepas CSLC09N, CSLC26N, CSLC28N y CSLC30N destacan por su producción sobre el resto a las 72h de su incubación.

Por otro lado realizamos el mismo ensayo sobre el resto de las cepas de endófitos aisladas. Los datos se deben de presentar de forma separada a los obtenidos para las cepas de rizobios debido a que son géneros muy diferentes, con distintas velocidades de crecimiento y por ello no se pueden comparar. Para este ensayo realizamos también medidas en dos tiempos distintos de crecimiento. Obtuvimos resultados muy interesantes (gráfica 5) con cepas buenas productoras de biofilms pero, debido a la elevada diversidad de géneros y a las diferencias entre ellas, se hace difícil su comparación. Por ello, solamente hablaremos de los resultados obtenidos entre cepas de los mismos géneros y especies.



Gráfica 5. Resultados de las absorbancias medias para cada una de las cepas a las 24h y 72h de crecimiento a 28°C en YMB. *R. cellulosityticum* CSLC25N, *Bacillus aryabhattai* CSLC41N, *Roseomonas* sp. CSLC45N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Methylobacterium goesingense* CSLC47N, *Micromonospora* sp. CSLC53N, *Paenarthrobacter* sp. CSLC54N, *Streptomyces* sp. CSLC55N, *Streptomyces* sp. CSLC56N, *Streptomyces* sp. CSLC57N, *Streptomyces drozdowiczii* CSLC58N, *Staphylococcus saprophyticus* CSLC62N, *Dermacoccus nishinomiyaensis* CSLC63N, *D. nishinomiyaensis* CSLC64N, *Dermacoccus* sp. CSLC65N, *Pseudoclavivacter helvolus* CSLC66N, *Pseudomona rizosphaerae* CSLC67N, *D. nishinomiyaensis* CSLC68N, *Dermacoccus* sp. CSLC69N, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* CSLC71N, *Lysinibacillus* sp. CSLC72N, *Paenibacillus* sp. CSLC76N, *Bacillus* sp. CSLC77N, *Pseudarthrobacter oxydans* CSLC78N, *B. aryabhattai* CSLC79N, *Paenarthrobacter* sp. CSLC80N, *Acinetobacter radioresistens* CSLC81N, *Bacillus* sp. CSLC84N, *B. aryabhattai* CSLC86N, *Micromonospora* sp. CSLC87N, *M. chokoriensis* CSLC88N, *M. saelicesensis* CSLC89N, *Micromonospora* sp. CSLC90N, *Micromonospora* sp. CSLC92N, *Dermacoccus nishinomiyaensis* CSLC93N, *Micromonospora* sp. CSLC94N, *Micromonospora chokoriensis* CSLC96N, *M. saelicesensis* CSLC97N, *M. palomenae* CSLC98N, *M. saelicesensis* CSLC100N, *Micromonospora* sp. CSLC102N, *Micromonospora* sp. CSLC105N, *Micromonospora* sp. CSLC106N, *Micromonospora* sp. CSLC107N, *M. saelicesensis* CSLC108N, *Micromonospora* sp. CSLC110N, *Micromonospora* sp. CSLC111N, *M. chokoriensis* CSLC112N, *Micromonospora* sp. CSLC113N, *S. succinus* CSLC117N, *Microbacterium* sp. CSLC118N, *Streptomyces* sp. CSLC119N. Tanto la media como el error estándar corresponden a 6 mediciones tomadas para cada una de las cepas.

Como podemos observar los resultados obtenidos son muy heterogéneos y diversos entre las cepas. En base a la media de las absorbancias obtenidas podemos decir que las cepas con mayor producción de biofilm son CSLC63N, CSLC65N, CSLC68N y CSLC69N. Ligeramente por debajo encontramos las cepas CSLC64N y CSLC93N. Fijándonos bien en los resultados obtenidos para estas seis cepas, todas ellas identificadas dentro del género *Dermacoccus*, observamos que el biofilm formado a las 24h, consigue mantener su estructura pasadas 48 horas más, es decir a las 72h de la inoculación. Pero mientras la primera fluctúa entre valores próximos, la cepa CSLC 69N tiene valores más distantes entre sí. De igual modo ocurre con las cepas CSLC65N y CSLC68N, cuya formación de biofilm es similar creciendo de una forma muy similar en los tres periodos de lectura con crecimiento periódico hasta las 72h. Las dos siguientes cepas más productoras, observando la gráfica 5, son CSLC64N y CSLC93N. Estas dos cepas, junto con las 4 anteriores, han sido identificadas como especies del género *Dermacoccus*, por lo que podemos decir que la formación de biofilms es una característica común de las especies del género *Dermacoccus* aisladas de nódulos de *L. corniculatus* de la citada comarca salmantina de Carbajosa de la Sagrada.

En lo que se refiere a las cepas identificadas como *Micromonospora sp.* podemos observar que, en términos generales, no han conseguido adherirse de una forma fuerte a la superficie de la placa y formar un biofilm resistente. La excepción la encontramos en las cepas CSLC92N, CSLC105N y CSLC111N, donde observamos que a las 72 horas las cepas han conseguido adherirse con la suficiente firmeza como para permanecer ancladas a la superficie de la placa. Respecto al resto de cepas de dicho género, es posible que necesiten más tiempo para consolidarse y crecer, por lo que sería interesante repetir el ensayo con tiempos más grandes de lectura. Del mismo modo podemos referirnos a las cepas identificadas como *Streptomyces sp.*

Dentro del género *Bacillus*, destacan las cepas CSLC79N y CSLC84N. En ambos casos observamos que el biofilm consigue mantenerse y afianzarse pasadas 72 de la inoculación. En concreto llama la atención la cepa CSLC79N, con un aumento considerablemente elevado respecto a las 24 horas de la consistencia del biofilm.

En otros géneros como *Staphylococcus* (CSLC62N), *Paenarthrobacter* (CSLC71N y CSLC80N), *Lysinibacillus* (CSLC72N), *Paenibacillus* (CSLC76N) y *Acinetobacter* (CSLC81N), observamos la misma tendencia positiva a las 72 horas desde su inoculación. En todos los casos, a las 24h el biofilm es firme y permanece sin disgregarse y/o caerse hasta las 72 horas.

Es muy importante, por lo tanto, una buena colonización por parte de las bacterias, ya que su formación en estructuras tridimensionales, como son los biofilms, protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y posibilita la transferencia de material genético (Ramey et al. 2004). De esta manera queda patente que la formación de

biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, que les permite establecer interacciones positivas y beneficiosas con la planta que colonizan.

Dentro de todas estas interacciones, la celulosa brinda un papel principal, constituyendo una matriz de unión y adherencia entre los microorganismos y la planta, configurando estructuras de tipo biofilm (Robledo et al. 2012).

## 5.2. Determinación de la formación de biofilms sobre soporte de vidrio.

Los resultados de este experimento permiten obtener una información semicuantitativa de la conformación de biofilms al ser observados con el microscopio de fluorescencia, además de permitir obtener una percepción y observación microscópica del crecimiento de los mismos sobre una superficie vítrea. No obstante, es una clasificación totalmente arbitraria y subjetiva.

La formación de biofilms de las 90 cepas a estudio fue observada a las 72 h con el fin de averiguar si existía alguna correlación con respecto al crecimiento que se había producido de las mismas cepas en placas de poliestireno. En términos generales los resultados obtenidos son positivos aunque, como veremos más adelante, muchos de los biofilms formados por algunas de las cepas están comenzando a formarse y serían necesarias medidas en tiempos posteriores a las 72h para poder ver un biofilm completamente maduro.

Las primeras cepas en ser analizadas fueron las identificadas dentro del género *Mesorhizobium*, cuyos resultados se dividieron en 5 grupos (tabla 36, figura 33) conforme a la madurez y tamaño del biofilm formado por cada una. De esta manera, el grupo I representa aquellos biofilms menos desarrollados y adheridos y el grupo V los más maduros.

**Tabla 36. Agrupación de las 39 cepas analizadas conforme a su capacidad para producir biofilms en la superficie vítrea del portaobjetos.**

Grupo	Cepas
I	CSLC22N
II	CSLC12N, CSLC23N, CSLC24N, CSLC26N, CSLC30N, CSLC35N
III	CSLC06N, CSLC08N, CSLC09N, CSLC11N, CSLC13N, CSLC15N, CSLC27N, CSLC28N, CSLC29N, CSLC31N, CSLC32N, CSLC33N, CSLC36N, CSLC37N, CSLC42N, CSLC116N
IV	CSLC03N, CSLC04N, CSLC07N, CSLC17N, CSLC18N, CSLC38N, CSLC39N, CSLC40N, CSLC115N
V	CSLC01N, CSLC02N, CSLC05N, CSLC10N, CSLC14N, CSLC19N

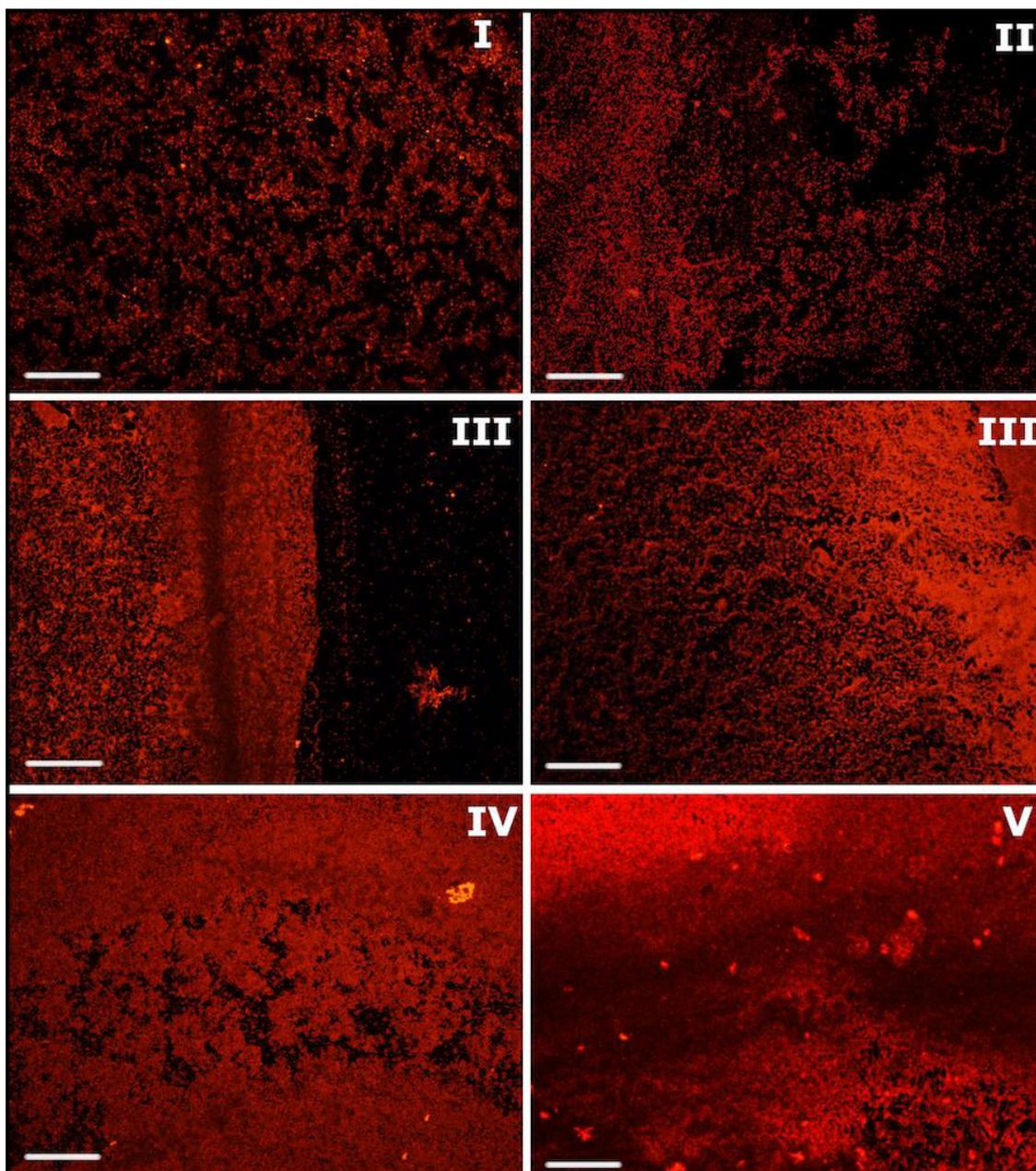


Figura 33. Imágenes del microscopio de fluorescencia, representativas de cada uno de los 5 grupos obtenidos en el análisis de producción de biofilms en vidrio. I: *Mesorhizobium* sp. CSLC22N, grupo I; II: *M. helmanticensis* CSLC23N, grupo II; III (izquierda): *M. jarvisii* CSLC29N, grupo III; III (derecha): *M. helmanticensis* CSLC08N, grupo III; IV: *Mesorhizobium* sp. CSLC17N, grupo IV; V: *M. jarvisii* CSLC01N, grupo V.

Como se puede observar el grupo más numeroso sería el III, donde pudimos ver un biofilm intermedio, con abundantes poros y grietas y en la mayoría de los casos extenso pero no completamente maduro. En él se encontraría casi la mitad de las 38 cepas estudiadas, con un 43,6% de las mismas.

El biofilm que presentan los aislados del grupo IV, con una proporción del 23% respecto del total de cepas estudiadas, es más maduro, presenta mayor volumen de bacterias que se encuentran bastante extendidas y adheridas al portaobjetos.

Los grupos II y V presentarían la misma proporción de cepas incluídas en ellos: alrededor del 15,4%. Mientras que las cepas del grupo II presentan un biofilm poco compacto y adherido al portaobjetos, los biofilms de las cepas del grupo V son densos, extensos, están bien adheridos al portaobjetos y, podríamos decir, que están bastante maduros.

En el grupo I, la cepa CSLC 22N presenta un biofilm que está comenzando a formarse. Las bacterias están medianamente extendidas a lo largo de la superficie, pero sin una buena compactación entre ellas, vislumbrándose importantes huecos a través de los cuales se ve el vidrio del portaobjetos. Habría una adherencia limitada al mismo.

Intentando hacer una comparativa con respecto a la formación de biofilms del estudio anterior (apartado 5.1) podemos decir que 9 de las 10 cepas que presentaron una mayor absorbancia y, por tanto, mayor formación de biofilm en las placas de poliestireno, presentan una correlación inversa a los biofilms producidos sobre portaobjetos. La cepa CSLC26N que presentó la mayor absorbancia al ser medida a las 72h, estaría comprendida en el grupo II, con un biofilm poco maduro y adherido a la superficie. Igual ocurriría con la cepa CSLC30N. En el grupo III están incluídas las cepas CSLC09N y CSLC28N, tercera y cuarta respectivamente en crecimiento de biofilm a las 72h de su inoculación. Las cepas CSLC38N, CSLC39N y CSLC17N, obtuvieron las tres siguientes mayores absorbancias y se encontrarían en el grupo IV. Por último, la cepa CSLC01N, que presentó una absorbancia a las 72 h de su incubación en placas de poliestireno de 0,79 unidades está englobada en el grupo V, como una de las que produce un biofilm más maduro, extenso y compacto sobre la superficie de un portaobjetos.

De estos resultados podemos deducir que las cepas incluídas principalmente en los grupos II, y III, no consiguen mantener la estructura tridimensional del biofilm, el cual termina por caer. No en vano, debemos tener en cuenta que el ensayo en placa de microtitulación resulta interesante e importante para el estudio de las primeras etapas en la formación de un biofilm, debido a que se realiza en condiciones de crecimiento estático, a diferencia de la determinación sobre la superficie de vidrio, la cual lleva asociado un movimiento de flujo y una mayor superficie donde poder adherirse y anclarse la bacteria de forma más prolongada. Es posible, por tanto, que estemos viendo los restos de un biofilm que ha terminado por caer, debido a que hemos observado que en las etapas iniciales sí se mantenía adherido. También es posible que lo que en realidad estamos viendo son los restos de un biofilm que ha madurado lo suficiente y han comenzado a disgregarse.

Las cepas incluídas en los grupos IV y V se ven favorecidas en esta segunda determinación, con una mayor superficie para poder adherirse y afianzarse construyendo la estructura tridimensional que observamos en la figura 33, madura y estable.

Como hemos venido haciendo hasta ahora, primero realizamos el ensayo sobre las cepas del género *Mesorhizobium* y posteriormente sobre las restantes, para tener un análisis de las 90 cepas al completo. Los resultados del crecimiento los dividimos en esta ocasión en 6 grupos en función de la madurez del biofilm formado por cada una de las cepas, correspondiéndose el grupo I con un biofilm ausente y el grupo VI con un biofilm maduro y compacto (tabla 37, figura 34).

**Tabla 37. Agrupación de las cepas endófitas analizadas conforme a su capacidad para producir biofilms en la superficie vítrea del portaobjetos.**

Grupo	Cepas
I	<i>Micromonospora saelicesensis</i> CSLC100N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC102N
II	<i>Roseomonas</i> sp. CSLC45N, <i>Staphylococcus saprophyticus</i> CSLC62N, <i>Paenibacillus</i> sp. CSLC76N, <i>Pseudarthrobacter oxydans</i> CSLC78N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC90N, <i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC96N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC97N, <i>Micromonospora palomenae</i> CSLC98N, <i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC112N
III	<i>Arthrobacter</i> sp. CSLC46N, <i>Methylobacterium goesingense</i> CSLC47N, <i>Paenarthrobacter nitroguajacolicus</i> CSLC71N, <i>Lysinibacillus</i> sp. CSLC72N, <i>Bacillus</i> sp. CSLC77N, <i>Acinetobacter radioresistens</i> CSLC81N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC106N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC107N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC111N, <i>Microbacterium</i> sp. CSLC118N
IV	<i>Rhizobium cellulosityticum</i> CSLC25N, <i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC41N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC53N, <i>Paenarthrobacter</i> sp. CSLC54N, <i>Streptomyces</i> sp. CSLC57N, <i>Pseudomonas rizoosphaerae</i> CSLC67N, <i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC79N, <i>Paenarthrobacter</i> sp. CSLC80N, <i>Bacillus</i> sp. CSLC84N, <i>Micromonospora chokoriensis</i> CSLC88N, <i>Streptomyces rochei</i> CSLC89 N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC94N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC105N, <i>Micromonospora saelicesensis</i> CSLC108N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC113N, <i>Staphylococcus succinus</i> CSLC117N, <i>Streptomyces</i> sp. CSLC119N
V	<i>Streptomyces</i> sp. CSLC55N, <i>Streptomyces</i> sp. CSLC56N, <i>Streptomyces drozdowiczii</i> CSLC58N, <i>Pseudoclavivacter helvolus</i> CSLC66N, <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> CSLC68N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC87N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC92N, <i>Micromonospora</i> sp. CSLC110N
VI	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> CSLC63N, <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> CSLC64N, <i>Dermacoccus</i> sp. CSLC65N, <i>Dermacoccus</i> sp. CSLC69N, <i>Bacillus aryabhatai</i> CSLC86N, <i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i> CSLC93N

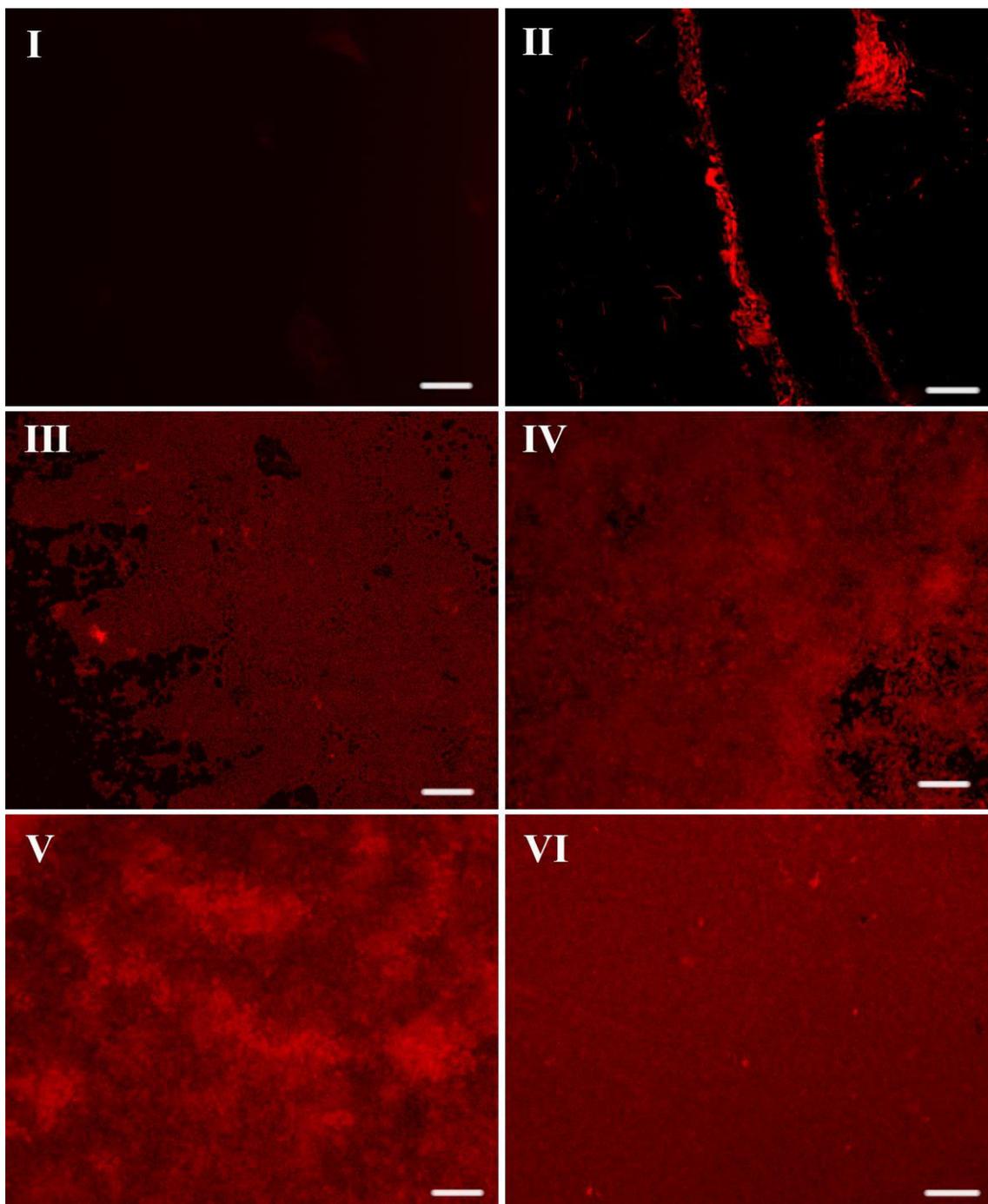


Figura 34. Imágenes del microscopio de fluorescencia, representativas de cada uno de los 5 grupos obtenidos en el análisis de producción de biofilms en vidrio. I: *Micromonospora* sp. CSLC102N, grupo I; II: *Paenibacillus* sp. CSLC76N, grupo II; III: *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* CSLC71N, grupo III; IV: *Paenarthrobacter* sp. CSLC54N, grupo IV; V: *Dermacoccus nishinomiyaensis* CSLC68N, grupo V; VI: *Dermacoccus* sp. CSLC64N, grupo VI.

En el grupo I (figura 34) se situaron las cepas CSLC100N y CSLC102N, ambas identificadas como *Micromonospora*, donde pudimos ver pequeños agrupamientos de células pero insuficientes como para llegar a considerarse el inicio del desarrollo de un biofilm.

El grupo en el que más cepas se concentraron fue el IV (Figura 34), con el 28,6% del total de endófitos, característica en común con los aislados identificados como *Mesorhizbium*. Entre ellos podemos ver un biofilm intermedio, en la mayoría de los casos extenso pero no completamente maduro. Podemos encontrar, además, diversidad de géneros desde *Micromonospora* sp. (CSLC53N, CSLC89N, CSLC94N, CSLC105N, CSLC108N y CSLC113N), *Paenarthrobacter* sp. (CSLC54N, CSLC80N), y *Streptomyces* sp. (CSLC57N y CSLC119N), hasta *Pseudomonas* sp. (CSLC67N), *Bacillus* (CSLC79N y CSLC84N) y la cepa identificada como *Rhizobium cellulosilyticum* (CSLC25N).

En los grupos II y III (figura 34), donde vemos los biofilms más inmaduros y que están comenzando a formarse, se distribuyen el 18,4% y 20,4% respectivamente, de las cepas. En los grupos con los biofilms más maduros, V y VI, se distribuyen el 28,6% de las cepas en conjunto. En rasgos generales, podemos decir que todos los géneros aislados se distribuyen entre todos los grupos establecidos. Sí que llama la atención que en el grupo VI, con biofilms maduros y bien formados, se encuentran cinco de las seis cepas aisladas del género *Dermaococcus* (CSLC63N, CSLC64N, CSLC65N, CSLC69N y CSLC93N). Por lo que podríamos intuir que es una característica en común que poseen las cepas aisladas de esta especie y del suelo en concreto de donde fueron recogidas las plantas de las cuales fueron aisladas. Además, haciendo una comparativa de los resultados obtenidos en el ensayo de formación de biofilms realizado en placas de microtitulación de poliestireno, con respecto a los obtenidos en este, vemos que las cinco cepas se encuentran dentro de las que más absorbancia presentaron.

El mayor número de las cepas endófitas aisladas en este estudio han sido identificadas dentro del género *Micromonospora* y si nos detenemos a observar los resultados vemos que estas se encuentran ampliamente distribuidas entre los grupos I-V, es decir, que no hay un patrón común entre ellas. Además, en todos los casos no consiguieron adherirse con consistencia al pocillo de la placa de poliestireno pasadas 72 horas y como consecuencia no formaron un biofilm óptimo o adecuado. Tan solo hay dos excepciones, las cepas CSLC87N y CSLC105N en las cuales se observó un pequeño incremento de la densidad del biofilm a las 72 horas desde su inoculación.

Dentro de las cepas identificadas de la familia Micrococcaceae, vemos que se distribuyen entre los grupos II-IV. Salvo las cepas CSLC71N y CSLC80N, identificadas dentro del género *Paenarthrobacter*, el resto no consiguen formar un biofilm destacable pasadas 72 horas.

El grupo de las cepas identificadas como *Bacillus*, se encuentra distribuido entre los grupos III, IV y VI. Es destacable que la cepa CSLC86N, que formó un biofilm maduro y compacto sobre la superficie vítrea, apenas consiguió adherirse sobre la superficie de la placa de poliestireno. El resto se distribuye con valores de absorbancias comprendidos entre 0,14 y 1,69, lo que nos lleva a pensar que no hay una correlación entre estas cepas y los grupos establecidos en el presente apartado.

Por último tendríamos el grupo de las cepas identificadas dentro del género *Streptomyces*. Hemos observado que estas cepas son capaces de adherirse con éxito sobre la superficie vítrea del portaobjetos. Sin embargo, no presentan la misma efectividad sobre la superficie de la placa de poliestireno.

Es complejo realizar un estudio comparativo del resto de géneros en los que únicamente han sido identificadas una o dos cepas y que se encuentran distribuidas entre los grupos II-IV. *Dermacoccus nishinomiyaensis* CSLC68N, consigue adherirse de forma muy eficiente sobre la superficie de la placa de poliestireno pasadas 72 horas, destacando claramente entre las demás. Por otro lado tendríamos las cepas *Acinetobacter radioresistens* CSLC81N y *Pseudoclavivacter helvolus* CSLC66N, situadas en los grupos 2 y 4 respectivamente, y que a las 72 horas de su incubación en las placas de poliestireno disminuyen su densidad con respecto a la lectura realizada a las 24 horas. Esto podría deberse a que el biofilm formado no está lo suficientemente adherido entre sí, siendo su unión débil, o bien, que consiguen formar tal cantidad del mismo que la estructura tridimensional no aguanta el volumen y se cae por su propio peso, o bien puede deberse a que los biofilms han madurado lo suficiente y han comienzan a disgregarse, como comentábamos anteriormente.

Analizados los apartados 5.1 y 5.2 en conjunto, los resultados avalan que la formación de biofilms no solamente depende del género de bacteria que lo forme, sino que varía mucho dependiendo de la superficie sobre la que tenga que comenzar a adherirse. Además, también hay que tener en cuenta que la superficie que ofrece el portaobjetos es más grande que la que ofrece cada uno de los pocillos de la placa de poliestireno y que las condiciones de cultivo en cada una de las dos superficies es diferente, ya que la primera se encuentra en condiciones de agitación y la segunda permanece estática. Todo ello son factores que intervienen en el crecimiento y éxito de la adherencia del biofilm, y es algo que se debe tener en cuenta en sucesivos o posteriores ensayos que se vayan a realizar. De ahí radica la conveniencia de realizar la segunda determinación de la formación de biofilms sobre soporte de vidrio, ya que este ensayo nos permite observar y analizar de una manera directa y clara la adherencia de las bacterias a dicha superficie, formando una estructura tridimensional.

## 6. Detección de la actividad celulolítica.

Utilizando la técnica cualitativa de difusión en placas de agar con carboximetilcelulosa como sustrato, se observó que muchas de las cepas analizadas tienen la capacidad en mayor o menor medida de producir celulasas *in vitro*. Los aislados que efectivamente produjeron celulasas, presentaban un halo visible de hidrólisis de carboximetilcelulosa. Aquellas de menor actividad, presentaban un diámetro del halo menor y se calificaron como de producción débil (figura 35).

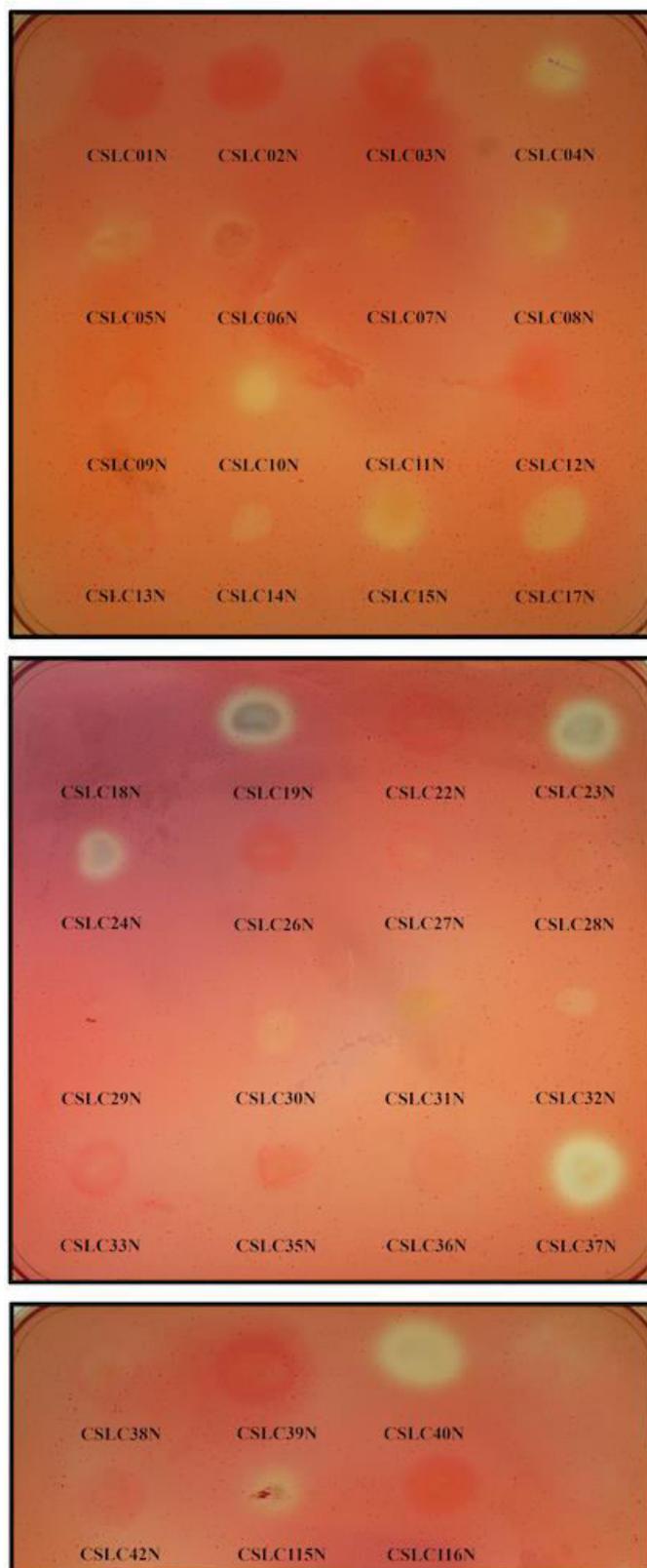


Figura 35. Las cepas del género *Mesorhizobium* que mostraron actividad celulolítica positiva y mayor fueron las siguientes: CSLC04N, CSLC05N, CSLC06N, CSLC08N, CSLC10N, CSLC15N, CSLC17N, CSLC19N, CSLC23N, CSLC24N, CSLC37N, CSLC40N, CSLC115N. Las cepas que mostraron una débil actividad celulolítica fueron: CSLC07N, CSLC09N, CSLC13N, CSLC14N, CSLC30N, CSLC31N, CSLC32N, y CSLC38N.

El porcentaje de aislados del género *Mesorhizobium* que presentaron actividad celulolítica fue aproximadamente del 56,4%, destacando las cepas CSLC19N y CSLC24N con halos más nítidos y claros que con respecto al resto de cepas positivas. Esto demuestra que la presencia de la enzima celulasa en dichas bacterias, no es algo casual o espontáneo, sino muy común. Los rizobios poseen enzimas capaces de degradar la celulosa y otros polisacáridos presentes en la pared celular vegetal (Mateos et al. 1992). El hecho de que las cepas de *Mesorhizobium* produzcan celulasas podría apoyar la hipótesis de una implicación de estos enzimas en la interacción positiva con las plantas.

Así mismo, otros autores han relacionado de una forma directa estos enzimas con el proceso de infección primaria en trébol (Robledo et al. 2008). Como se ha mencionado anteriormente, el proceso de infección que se establece en la mayoría de las leguminosas comienza con la penetración de los rizobios a través de los pelos radicales. La producción de estas enzimas podría estar implicada directamente con la rotura de la celulosa presente en los pelos radicales, siendo una vía de entrada a la planta por parte del microorganismo.

Estas circunstancias pueden ser extrapoladas a las bacterias del género *Mesorhizobium*, constituyendo la presencia de una actividad celulolítica en las mismas una gran cualidad para formar parte de futuros inóculos.

Del resto de aislados, las bacterias endofíticas que no pertenecen al género *Mesorhizobium* y que muestran actividad celulolítica, son el 48%. Algunas de ellas son las cepas CSLC88N, CSLC97N, CSLC110N y CSLC113N, identificadas como *Micromonospora saelicesensis* (figura 36).

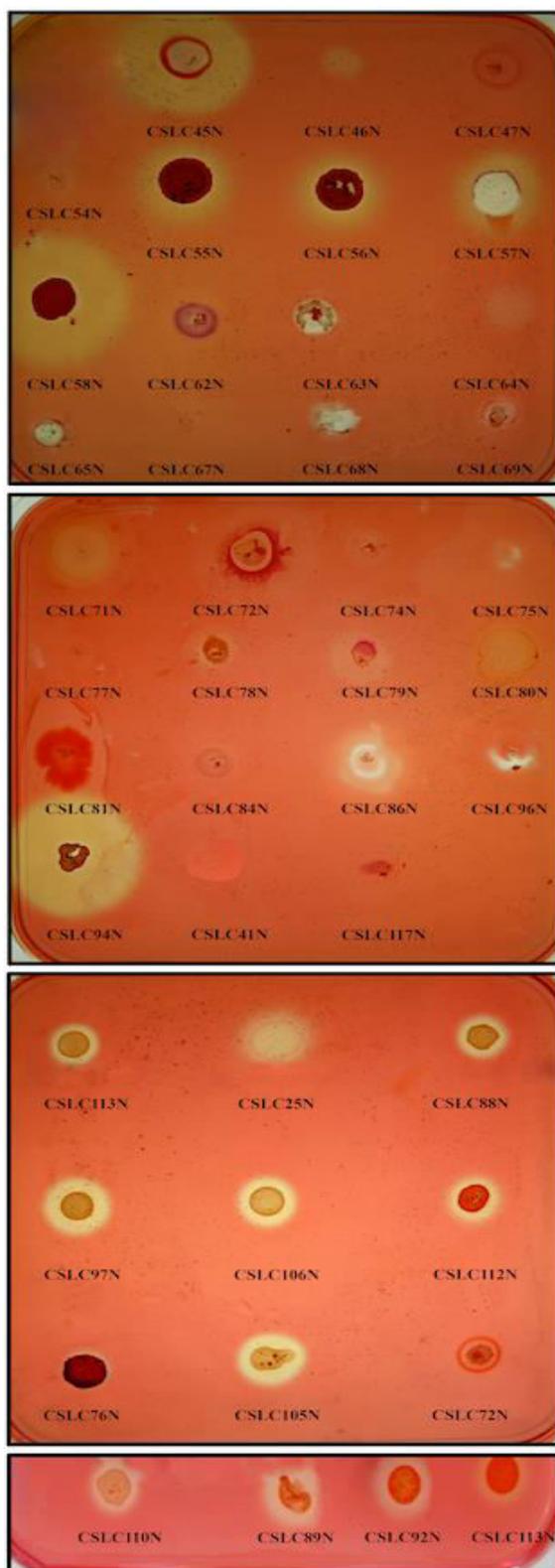


Figura 36. Las cepas que mostraron actividad celulolítica positiva y mayor fueron las siguientes: CSLC25N, *Roseomonas* sp. CSLC45N, *Streptomyces* sp. CSLC55N, *Streptomyces* sp. CSLC56N, *Streptomyces* sp. CSLC57N, *Streptomyces drozdowiczii* CSLC58N, *Micromonospora chokoriensis* CSLC88N, *M. saelicesensis* CSLC89N, *Micromonospora* sp. CSLC92N, *Micromonospora* sp. CSLC94N, *Micromonospora saelicesensis* CSLC97N, *Micromonospora* sp. CSLC105N, *Micromonospora* sp. CSLC106N, *Micromonospora* sp. CSLC110N, *M. chokoriensis* CSLC112N, CSLC113N. Las cepas que mostraron una débil actividad celulolítica fueron: *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Paenarthrobacter nitroguajacolicus* CSLC71N, *Pseudarthrobacter oxydans* CSLC78N, *Bacillus aryabhatai* CSLC79N, *Bacillus aryabhatai* CSLC86N y *Micromonospora* sp. CSLC111N.

La cepa CSLC46N, identificada como *Arthrobacter sp.*, y la cepa CSLC78N, identificada como *Pseudarthrobacter oxydans*, dieron una débil actividad celulolítica.

Dentro de este grupo de bacterias endofíticas se encuentran las cepas *Roseomonas sp.* CSLC45N, *Streptomyces drozdowiczii* CSLC58N y *Micromonospora sp.* CSLC94N con una actividad celulolítica claramente superior al resto de cepas positivas.

Diversos estudios describieron la producción de celulasas, entre otras enzimas, entre las que se encuentran las pectinasas y las hemicelulasas, por parte de los rizobios en cultivo puro (Hubbell et al. 1978; Martínez-Molina et al. 1979; Morales et al. 1984). Por otro lado, las bacterias celulolíticas más comunes son *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacillus sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Clostridium sp.*, *Erwinia chrysanthemi*, *Thermobispora bispara*, *Ruminococcus albus*, *Streptomyces sp.*, *Thermonospora sp.*, y *Thermobifica fusca*. Sin embargo existe un creciente interés actualmente en la búsqueda de nuevas cepas bacterianas celulolíticas (Sadhu y Maiti 2013). A nivel agrícola, las bacterias degradadoras de celulosa que producen celulasas, pueden desempeñar un papel fundamental en la colonización de las plantas, aumentando la competitividad para alcanzar los nichos del interior de las mismas.

Por otra parte, la presencia de bacterias endofíticas, encontradas en nuestro estudio, distintas a *Mesorhizobium* y aisladas en nódulos de *Lotus corniculatus* hace pensar en una posible relación de sinergismo existente entre estos microorganismos. Los rizobios aprovechan su actividad celulolítica para infectar a la planta a través del extremo apical del pelo, estableciendo una simbiosis con ella debido a que le proporciona un suministro de nitrógeno, elemento que ellas no son capaces de sintetizar por sí mismas. Cabe la posibilidad que nuestros aislados endófitos aprovechen la vía de entrada que abren los rizobios en los pelos radicales de la planta para entrar por ella y establecer en los nódulos su nicho, sin suponer ningún perjuicio para la planta. Ha quedado patente que algunos de nuestros aislados tienen actividad celulolítica, abriéndose una segunda posibilidad en la que las cepas aisladas, al igual que los rizobios, rompen la celulosa presente en los pelos radicales, abriéndose una puerta de entrada al interior de la planta. La certeza de la existencia de estos microorganismos en el interior de los nódulos de *Lotus corniculatus* ha quedado evidenciada, averiguar qué función establecen en ellos sería la siguiente cuestión a resolver, pero el potencial papel que estos microorganismos ejercen en estos nódulos como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) o bien cómo control de patógenos, podrían ser algunas de ellas.

Hemos visto que las bacterias PGPR presentan varios mecanismos como la solubilización de fosfato, producción de sideróforos, la producción de fitohormonas, que benefician directamente a las plantas; pero también existen métodos indirectos como la secreción de enzimas líticas, entre las que se encuentran las celulasas, que disminuyen los efectos negativos que los posibles los patógenos pudieran ocasionar en las plantas (Menendez et al. 2015). Las bacterias que presenten este conjunto de

mecanismos, directos e indirectos, podrían ser aplicados como agentes de biocontrol o biofertilizantes, ayudando a la promoción del crecimiento vegetativo de la planta a la vez que le ayuda a mantenerse sana y libre de patógenos perjudiciales. Por tanto podemos concluir que la utilización de bacterias PGPR en la agricultura parece clave para obtener mayores rendimientos agrícolas.



Potencial biotecnológico del género  
*Mesorhizobium*.



CAPÍTULO III



Como vimos en el apartado 5 de la Introducción, vivimos en un mundo cada vez más globalizado que necesita y abusa de los recursos naturales de los que el planeta Tierra dispone. Estos recursos no son infinitos, por eso en las últimas décadas se ha tratado de buscar alternativas más económicas y que además no supongan un perjuicio para el medio ambiente. En este sentido, la biotecnología y los desarrollos biotecnológicos se han erigido como una gran alternativa. Así, algunos microorganismos tienen la capacidad de producir biopolímeros tales como celulosa y ácidos polihidroxialcanoatos (PHAs), que pueden ser utilizados con fines biotecnológicos en la obtención de papel o bioplásticos entre otros productos. En el presente capítulo analizamos y estudiamos algunos de los biopolímeros producidos por las cepas aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus* e identificadas en diferentes especies del género *Mesorhizobium*, documentando de esta forma el enorme potencial tecnológico que proporciona dicho género.

## 1. Determinación y caracterización de biopolímeros.

Aunque la biosíntesis de celulosa es un rasgo característico de las plantas, también se ha descrito esta capacidad en hongos, en urocordados (Matthysse et al. 2004) y en algunas especies de cianobacterias (Nobles et al. 2001). Su biosíntesis ha sido ampliamente detectada, dentro de los procariotas, en bacterias Gram negativas, como vamos a ver a continuación, pero también se ha descrito esta capacidad en la bacteria Gram positiva *Sarcina ventriculi* (Ross et al. 1991; Lasa y Penadés 2006).

La celulosa es un polisacárido insoluble en agua producida por diferentes géneros de bacterias Gram negativas como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Dickeya* y *Rhodobacter* (Deinema y Zevenhuizen 1971; Brown 2004; Jahn et al. 2011; Morgan et al. 2012). La primera celulosa bacteriana de la que se tiene constancia fue descubierta por Adrian Brown en 1886 en la superficie de un medio de fermentación. Esta masa sólida fue posteriormente identificada como celulosa y la bacteria productora de la misma identificada como *Bacterium xylinum*. Desde su descubrimiento, esta bacteria ha recibido diferentes nombres como *Acetobacterium xylinum* (Ludwig 1989) y *Bacterium xylinoides* (Henneberg 1906). Posteriormente en 1925 Bergey la nombró como *Acetobacter xylinum*, convirtiéndose en el nombre oficial de acuerdo al NCBI (International Code of Nomenclature of Bacteria). Finalmente en 2009 Valla *et al.* la denominó como se conoce actualmente, *Gluconacetobacter xylinus*. Según los estudios que se han hecho hasta el día de hoy, las especies de *Gluconacetobacter* pueden producir celulosa a nivel comercial, considerándose a estas bacterias como las mejores productoras de la misma. Más concretamente, la especie *G. xylinus* ha sido estudiada durante más de 100 años (Kongruang 2008) y ha servido como sistema modelo para el estudio de la biosíntesis de celulosa bacteriana (Ito et al. 2005).

En este capítulo describimos la producción de celulosa por parte de seis cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y que previamente fueron seleccionadas, de un total de 38 aislados pertenecientes también a este género, por la intensidad de su coloración roja al incubarlas en medio YMA con Rojo Congo (capítulo 2, apartado 4).

### 1.1. Ensayos de floculación.

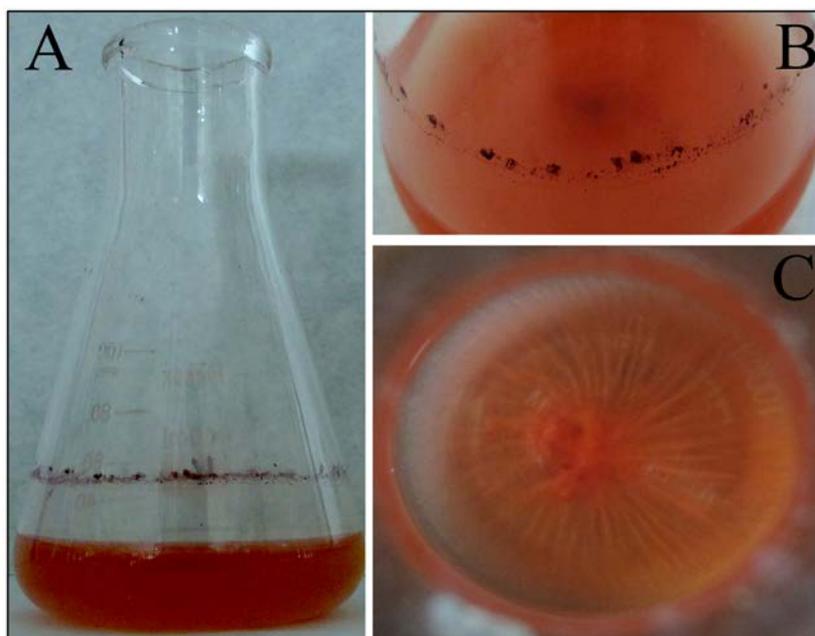
Como previamente hemos mencionado, las cepas seleccionadas para la realización de este ensayo fueron elegidas en función de la intensidad de coloración rojiza que presentaron al realizar la determinación cualitativa de la producción de celulosa (apartado 3.1. Materiales y Métodos).

De esta manera, se seleccionaron tres cepas cuyas colonias presentaron la mayor intensidad rojiza, CSLC19N, CSLC23N y CSLC24N, lo que nos estaría indicando que, *a priori*, serían productoras de celulosa. Y, en contraposición, elegimos tres cepas, CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N, cuyas colonias no se unieron tan fuertemente al colorante Rojo Congo durante la tinción, presentando una coloración rosácea apagada, tirando a blanquecina, y que por consiguiente no serían buenas productoras de dicho biopolímero.

El objetivo de estudiar estas 6 cepas era poder comparar su diferente comportamiento, y así comprobar si efectivamente las tres que presentaron mayor intensidad rojiza eran debido a la producción de celulosa, o a la formación de algún otro biopolímero con enlaces  $\beta$ -1,4 de estructura similar a la celulosa.

Como control negativo realizamos el mismo procedimiento que para las cepas, pero dejando los matraces, tanto con Rojo Congo como sin él, sin inocular. Como control positivo utilizamos la cepa ANU843 (Rolfe et al. 1980) de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, productora de celulosa, seleccionada por estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación (Robledo et al. 2012) (figura 37).

Podemos observar tras 5 días de incubación, la cual fue llevada a cabo en medio líquido YMB con Rojo Congo a 28°C y 180 rpm, y uno de reposo que la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* ANU843 en presencia de Rojo Congo presenta abundantes flóculos, que observamos depositados en el fondo. Así mismo, observamos un anillo rojo y homogéneo alrededor de la pared del matraz. Este color rojizo tanto de los flóculos como del anillo, es indicativo de la unión de los mismos al colorante, así como de un pH neutro del medio (figura 37).

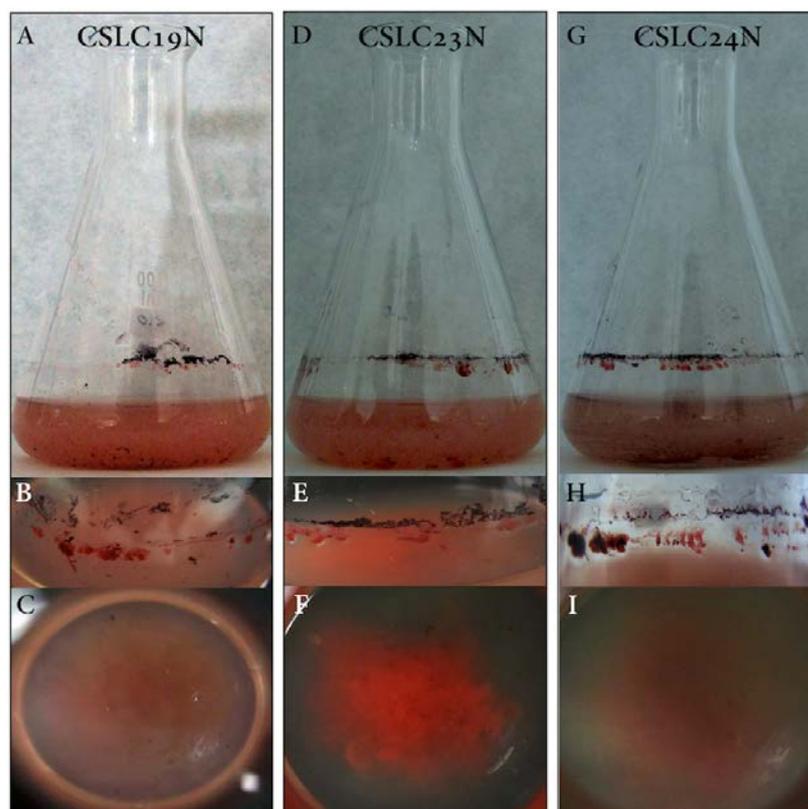


**Figura 37. Ensayo de floculación realizado para la cepa ANU843. A) Imagen realizada tras 5 días de incubación en medio YMB + Rojo Congo a 28°C y 180 rpm. B) Anillo formado por la bacteria sobre la pared del matraz. C) Flóculos depositados al fondo del matraz tras 5 días de incubación y 1 de reposo.**

La cepa *M. helmanticense* CSLC19N forma flóculos que, al igual que el control, se unen al Rojo Congo presentando también un pH neutro (figura 38A). El anillo de crecimiento no es homogéneo en toda la pared del matraz, pero en esta ocasión se pueden distinguir con total claridad dos anillos de diferente color, uno de color azul-purpúreo de pH ácido y un segundo de color rojizo y pH neutro (figura 37B). Observamos flóculos de pH neutro depositados en el fondo del matraz (figura 38C).

Observamos bastantes agregados formados por *Mesorhizobium* sp. CSLC23N, nítidos y rojizos y depositados en el fondo del matraz (figura 38F). Al igual que para *M. helmanticense* CSLC19N, también observamos un anillo azul purpúreo en la pared del matraz, y restos de un segundo anillo de color rojizo. Es muy probable que este segundo anillo se haya caído después de varios días de crecimiento (figura 38E).

Observamos un caso similar a los dos vistos hasta ahora con la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC24N, aunque con menor cantidad de flóculos formados. Estos agregados que distinguimos depositados en el fondo del matraz, son capaces de unirse al colorante Rojo Congo, manteniendo un pH neutro. De la misma forma, se formaron dos anillos de coloración diferente. Uno más nítido de color azul-violáceo alrededor de toda la pared del matraz y un segundo anillo de color rojizo, pero de menor grosor que el observado en los casos anteriores para las cepas CSLC19N y CSLC23N (figura 38H).

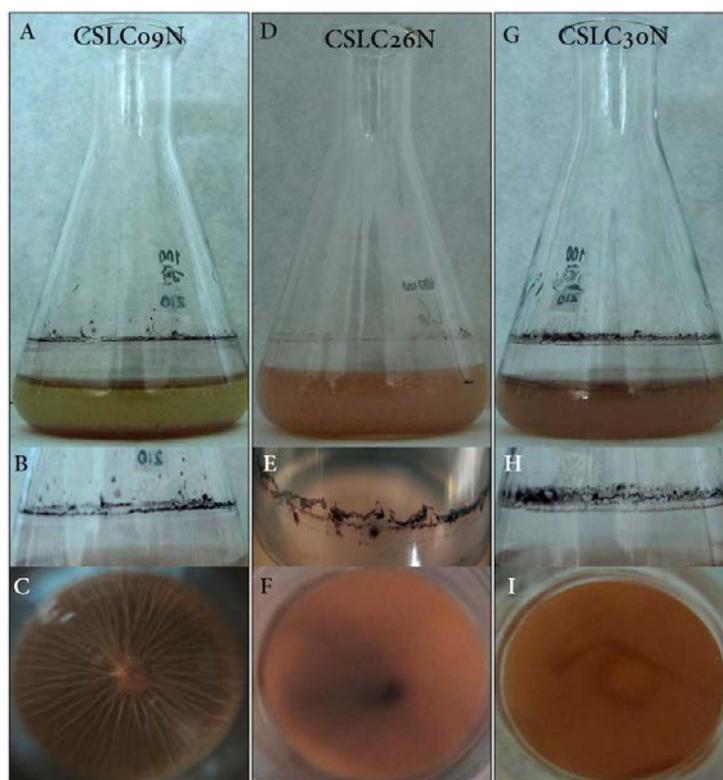


**Figura 38.** Ensayo de floculación realizado para las cepas *M. helmanticense* CSLC19N y *Mesorhizobium* sp. CSLC23N y CSLC24N. A) D) Y G) Imagen realizada tras 5 días de Incubación en medio YMB + Rojo Congo a 28°C y 180 rpm. B) E) Y H) Anillos formado por las tres cepas sobre la pared del matraz. C) F) e I) Flóculos depositadas al fondo del matraz tras 5 días de incubación y 1 de reposo.

Con la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC09N, observamos un cambio notable (figura 39A). La bacteria es capaz de crecer en el medio YMB con Rojo Congo y de unirse a él, pero el pH en esta ocasión cambia, virando a ácido. Sin embargo, aunque pudiera parecer por la imagen que la bacteria consigue formar flóculos, en realidad es densidad de crecimiento (figura 39C). Al agitar el matraz el crecimiento se difundía con el medio de cultivo, al contrario que sucedía para las tres cepas vistas hasta ahora. Sí distinguimos un anillo azul-violáceo claramente visible alrededor del matraz y de aspecto similar al primero de los dos anillos observados en las tres cepas anteriores. Por el contrario, no observamos rastro alguno de formación de un segundo anillo de color rojizo y pH neutro, como sí vimos anteriormente (figura 39B).

Similiar comportamiento a *Mesorhizobium* sp. CSLC09N tienen *Mesorhizobium* sp. CSLC26N y CSLC30N. En esta ocasión observamos un crecimiento bacteriano completamente difundido en el medio y un cambio de pH mucho más acusado y visible al observado con la cepa CSLC09N. También se observa un anillo azul-violáceo muy fino que denota el cambio de pH del medio a ácido (figura 39E y H). No observamos en esta ocasión restos de un segundo anillo de color rojizo. Pero, a diferencia con las cepas

CSLC09N y CSLC26N, en la cepa CSLC30N observamos un doble anillo de color azul-violáceo, uno de mayor grosor que el otro (figura 39H).



**Figura 39.** Ensayo de floculación realizado para las cepas *Mesorhizobium* sp. CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N. A) D) Y G) Imagen realizada tras 5 días de Incubación en medio YMB + Rojo Congo a 28°C y 180 rpm. B) E) Y H) Anillos formado por las tres cepas sobre la pared del matraz. C) F) e I) Flóculos depositados al fondo del matraz tras 5 días de incubación y 1 de reposo.

En base a los resultados obtenidos podemos agrupar las 6 cepas en dos grupos claramente diferenciados:

- En el primer grupo tendríamos las cepas CSLC19N, CSLC23N y CSLC24N las cuales vemos que tienen similitud con la cepa control ANU843, capaz de producir celulosa. Podríamos decir que estas cepas son capaces de formar dos biopolímeros diferentes, ambos con la capacidad de adherirse al vidrio. Uno de ellos es insoluble, capaz de unirse al Rojo Congo, manteniendo un pH neutro; el otro exopolisacárido es soluble, también posee la capacidad de unirse al Rojo Congo, pero es de pH ácido.
- En un segundo grupo tendríamos las cepas CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N. Estas cepas producen únicamente el exopolisacárido ácido, de color azul-violáceo, que previsiblemente estará formado por enlaces  $\beta$ -1,4 razón por la cual es capaz de unirse al Rojo Congo.

## 1.2. Tinción con Blanco de Calcoflúor.

El Blanco de Calcoflúor (SIGMA) es un colorante que se utiliza ampliamente en la industria para blanquear telas y papeles. Además, también es utilizado en microscopía de epifluorescencia para el diagnóstico, identificación y detección de parásitos fúngicos. Este colorante ofrece un método muy sensible y rápido para determinar muestras mediante microscopía directa, debido a que se une a enlaces  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 presentes en los polisacáridos, como por ejemplo la celulosa y la quitina (Harrington et al. 2003; Rasconi et al. 2009)(Flores-Félix et al. 2015). Otra propiedad de este fluorocromo es que fluoresce cuando es expuesto a luz ultravioleta de longitud de onda larga en un rango de 300-412 nm, presentando un pico de absorbancia a 347 nm, y a la luz visible de longitud de onda corta. Ha sido ampliamente utilizado como un marcador biológico no tóxico para detectar celulosa en microorganismos y para teñir la pared celular de las plantas (Hageage y Harrington 1984), permitiendo observar de esta manera la estructura de las mismas (Flores-Félix et al. 2015).

Tras observar cada una de las cepas con el microscopio de fluorescencia observamos que en cada una de dichas muestras hay fluorescencia, con mayor o menor intensidad, porque lo que podemos suponer que las seis cepas tienen la capacidad para producir exopolisacáridos de glucosa con enlaces  $\beta$  (figura 40).

También observamos que algunos de estas cepas, independientemente de que pertenezcan a uno de los dos grupos previamente establecidos en el apartado anterior (apartado 1), producen microfibrillas externas. Este es el caso de las cepas CSLC09N (figura 40A), CSLC23N (figura 40E) y CSLC30N (figura 40C). Por otro lado, las seis muestras observadas representativas de cada una de las 6 cepas producen un exopolisacárido unido a la celulosa, que fluoresce asociado a ella (figura 40).

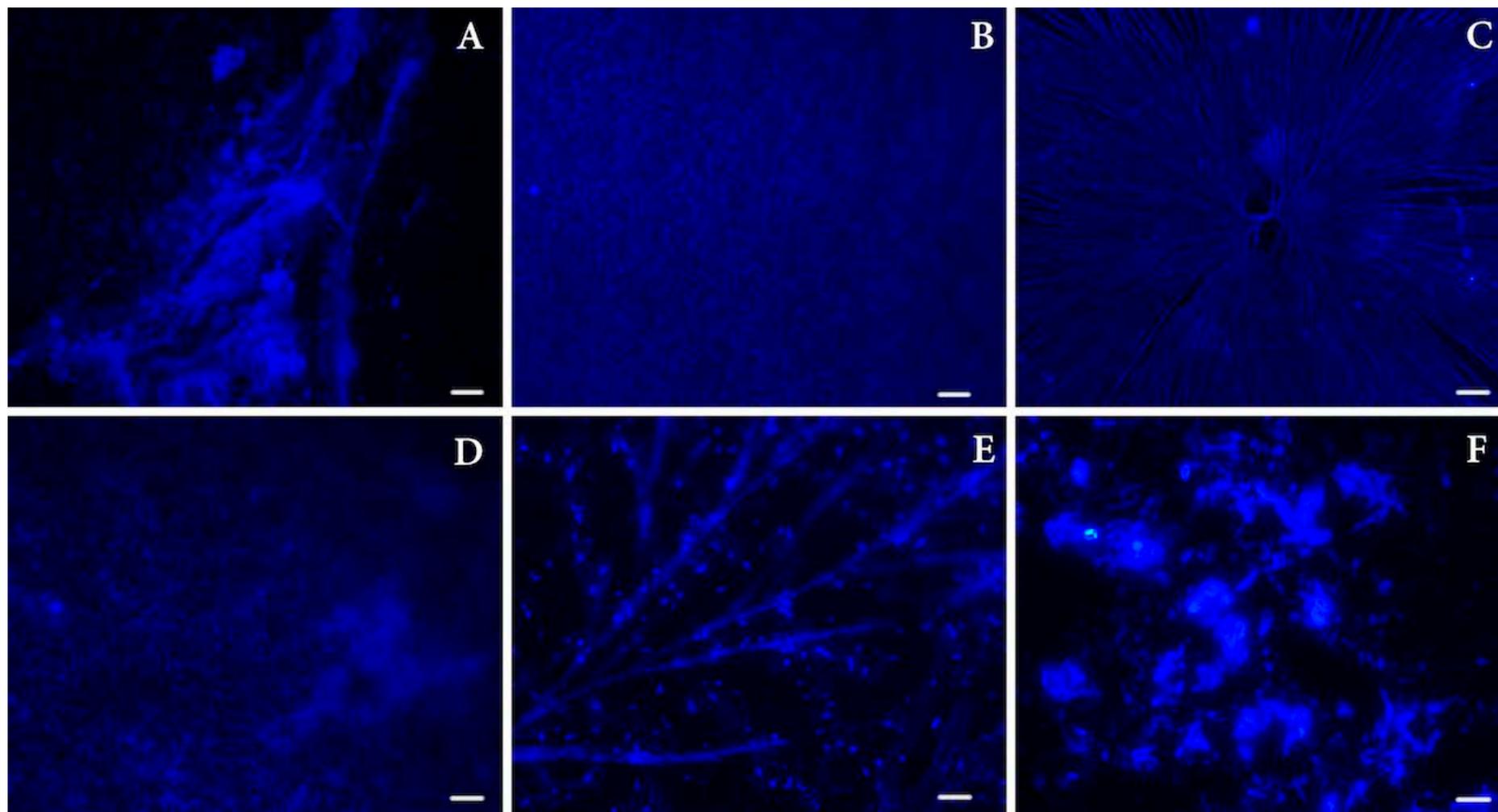


Figura 40. Fotografías realizadas con el microscopio de fluorescencia en el que se puede observar la tinción realizada con Blanco de Calcoflúor. a) CSLC09N, b) CSLC26N, c) CSLC30N, d) CSLC19N, e) CSLC23N y f) CSLC24N. Correspondencia de las escalas: 100  $\mu\text{m}$  (A, B y D); 200  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (E y F).

En los 6 casos pudimos observar como el Blanco de Calcoflúor se une a las 6 cepas. Pero los resultados hacen que tengamos que analizar cada una de ellas por separado.

- ❖ En la cepa CSLC19N no observamos microfibrillas externas de biopolímero. En cambio, una capa homogénea cubría la superficie, de una forma similar a la estructura que anteriormente habíamos visto de biofilm sobre la superficie vítrea de un portaobjetos. De hecho esta cepa fue introducida en el grupo 5 de formación de biofilms (apartado 5.2, Capítulo 2). Podríamos decir entonces que esta bacteria es capaz de producir un biopolímero asociado a las células.
- ❖ En la cepa CSLC23N pudimos observar producción de microfibrillas, alrededor de las cuales se disponían bacterias con acumulaciones fluorescentes en su interior celular. También se pudo observar acumulación de lo que podría ser un segundo biopolímero.
- ❖ En la siguiente cepa, CSLC24N, tampoco se observaron microfibrillas, pero sí acúmulos fluorescentes, externos a las bacterias.
- ❖ En la cepa CSLC09N observamos la presencia de microfibrillas, además de un segundo exopolisacárido asociado a las células. Este último aparece acumulado en cantidad y con una apariencia bastante compacta. Recuerda a la estructura vista anteriormente para la cepa CSLC24N.
- ❖ En el caso de la cepa CSLC26N no observamos presencia de microfibrillas externas, como sí observamos en la cepa CSLC09N. En esta ocasión lo que sí visualizamos fueron acúmulos de biopolímeros, repartidos de forma dispersa. Esto podría indicarnos que la bacteria acumula biopolímero que no deriva en la formación de microfibrillas externas, pero sí en la expulsión de este hacia el exterior de la misma.
- ❖ La cepa CSLC30N también produce microfibrillas, como la cepa CSLC09N, como así pudimos constatar. En este caso, observamos microfibrillas fluorescentes en una estructura ordenada, a la vez que sorprendente, que parte del centro y se ramifica hacia fuera. Algo que parecen tener en común las tres cepas clasificadas dentro del grupo 2, es la formación de un biopolímero asociado las células.

Los resultados nos revelan fenotipos diferentes entre las seis cepas analizadas. Parece claro que las seis son capaces de sintetizar biopolímeros insolubles con enlaces  $\beta$ -1,4. Tres de estas seis cepas, CSLC09N, CSLC23N y CSLC30N parece que son capaces de producir un biopolímero en forma de microfibrillas y bien este mismo biopolímero, o bien un segundo biopolímero y diferente al primero, asociado a la célula. Es esta segunda morfología la que observamos de forma única en las otras tres cepas en las cuales no observamos rastro de microfibrillas: CSLC19N, CSLC24N y CSLC26N. Por la complejidad de los resultados obtenidos, decidimos continuar en los siguientes ensayos con la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N, en la cual observamos la presencia

de lo que, en principio, parecen ser dos biopolímeros diferentes.

### 1.3. Purificación de los biopolímeros.

En base a los resultados obtenidos hasta ahora decidimos realizar la purificación de estos biopolímeros insolubles y así proceder a su caracterización. Elegimos para un primer ensayo la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N porque presentó una coloración roja intensa en el ensayo de producción de celulosa tanto en medio YMA, como en medio líquido YMB, con Rojo Congo, así como la capacidad de producir lo que, *a priori*, parecen dos biopolímeros diferentes.

Tras realizar el correspondiente protocolo de purificación mediante hidrólisis alcalina y ácida (apartado 3.2 Materiales y Métodos) y después de la segunda liofilización, obtuvimos un peso seco de aproximadamente 0,5g/L (Figura 41).



Figura 41. Muestra del biopolímero obtenido de la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N.

Los rendimientos que se han obtenido de celulosa bacteriana, concretamente de diferente cepas de la especie *G. xylinus* en diversos estudios son bastante heterogéneos si los comparamos entre sí. Si bien es cierto que la preparación de la biomasa bacteriana varía, en función del material de partida de crecimiento de la bacteria, así como del medio de cultivo utilizado (Kongruang 2008; Keshk 2014).

Tabaai M. J. y Emtiazi G. (Tabaai y Emtiazi 2016) estudiaron el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de celulosa bacteriana de la cepa *G. xylinus* PTCC 1734 y dos cepas, también dentro del género *Gluconacetobacter*, y aisladas a partir de vinagre (S y A (2)), en condiciones de cultivo estático. Los resultados mostraron que el rendimiento y las características de la celulosa bacteriana fueron influenciados por el tipo de fuente de carbono, obteniendo un mayor rendimiento en presencia de glicerol, en todas las cepas estudiadas. Más específicamente, los

rendimientos obtenidos fueron del 6%, 9,7% y 3,8% para las cepas S, A (2) y *G. xylinus* PTCC 1734, respectivamente. Respecto al peso seco de celulosa bacteriana, en el caso de la cepa A (2), se obtuvo un peso seco de celulosa bacteriana de 1,9 g/L, en comparación con la cepa de *G. xylinus*, utilizada como cepa de referencia, de la que se obtuvo un 0,76 g/L.

En estos estudios, la incubación se llevó a cabo en 100 mL de cultivo que se mantuvo bajo condiciones estáticas durante 3 días a 28°C. En nuestros estudios se partió de 400 mL de YMB (con manitol como fuente de carbono), y la incubación se realizó a 120 rpm, a 28°C durante 3 días. Aunque los datos no se pueden comparar, porque se trata de especies diferentes y las condiciones de cultivo, así como el medio de cultivo empleado varían, vamos a intentar extrapolar los datos y realizar una pequeña comparativa. Empleando la ecuación empleada por Tabaii M. J. y Emtiazi G. (Tabaii y Emtiazi 2016) en sus estudios para calcular el rendimiento obtenido ( $\text{Rendimiento (\%)} = (\text{peso seco celulosa bacteriana (g)} / \text{peso fuente de carbono (g)}) \times 100$ ), obtenemos un rendimiento del 12,5% en nuestra cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N y una producción de 0,5 g/L, como ya se mencionó con anterioridad.

Debemos tener en cuenta que en los estudios realizados por Tabaii M. J. y Emtiazi G. cada una de las tres cepas empleadas obtuvo su máxima producción en diferentes fuentes de carbono. En el caso de las dos cepas aisladas del vinagre, se observó la máxima producción cuando el medio contenía, como fuente de carbono, manitol y fructosa. En cambio, para la cepa de *G. xylinus* se observó con glucosa.

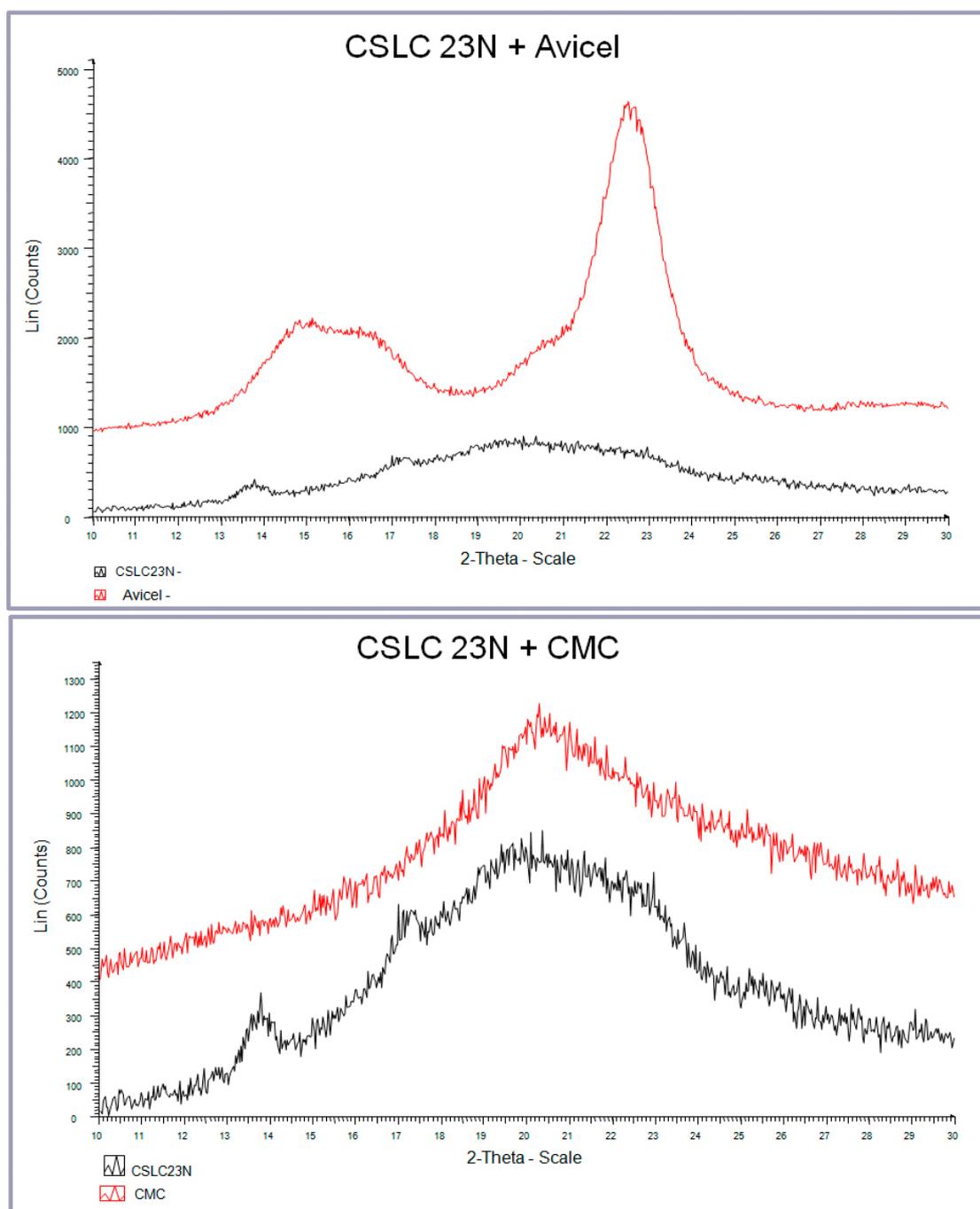
Podemos por tanto concluir que sería necesario, en estudios futuros, seleccionar la fuente de carbono más apropiada para esta cepa con el objetivo de encontrar aquella que nos proporcione una mayor producción de celulosa bacteriana. Volvemos a hacer referencia a Tabaii M. J. y Emtiazi G. (Tabaii y Emtiazi 2016) para decir que no existe un patrón similar del comportamiento bacteriano por la diferente utilización de fuentes de carbono empleadas en la composición del medio de cultivo, siendo necesario detectar la mejor fuente de carbono según la cepa a emplear. No obstante, los resultados obtenidos en nuestros estudios con *Mesorhizobium* sp. CSLC23N son satisfactorios; sobre todo si tenemos en cuenta que nuestro objetivo inicial no era obtener mucha producción de celulosa, sino averiguar si lo que realmente nuestra cepa estaba produciendo era celulosa o si se trataba de otro biopolímero similar o diferente a la celulosa. Es por ello que en los siguientes apartados nos centramos en averiguar esta premisa y no en obtener una mayor producción o rendimiento del biopolímero producido por nuestra cepa.

A continuación, la muestra purificada y liofilizada, obtenida por nuestra cepa, se sometió a distintas pruebas físicas y biológicas con el objeto de profundizar en su caracterización.

#### **1.4. Determinación física de la celulosa (Difracción de rayos X).**

Para poder conocer la identidad específica del material recuperado después de los procesos de purificación, se hizo una determinación física en el servicio de difracción de rayos X de la Universidad de Salamanca tanto de los biopolímeros purificados como de dos controles, Avicel (celulosa cristalina insoluble) y CMC (carboximetilcelulosa; celulosa amorfa y soluble).

Una vez obtenidos los difractogramas correspondientes a cada una de las muestras y después de haber sido superpuestos y analizados en conjunto, pudimos comprobar que estos biopolímeros eran amorfos, por lo que podemos decir que la difracción de Rayos X no es una prueba concluyente (figura 42).



**Figura 42.** Difractogramas de identificación obtenidos como resultado de las pruebas de difracción de Rayos X. Arriba) Difractogramas superpuestos de las muestras de la cepa CSLC23N y Avicel (celulosa cristalina). Abajo) Difractogramas superpuestos de las muestras de la cepa CSLC23N y CMC (celulosa amorfa). Resultados obtenidos por el servicio de difracción de rayos X de la Universidad de Salamanca.

Al comparar los difractogramas de la muestra estudiada *Mesorhizobium* sp. CSLC23N, con uno de los patrones de referencia, Avicel, vemos que no coinciden las posiciones de los picos de difracción correspondientes a la celulosa cristalina. Sin embargo, al comparar el difractograma de nuestra muestra con respecto al de CMC,

vemos que se asemejan bastante, pero no coinciden con exactitud, ya que nuestra muestra presenta dos picos que el difractograma del control no tiene.

La difracción de Rayos X es una determinación física en la que se mide la cristalinidad o los puntos cristalinos de las muestras, mediante difracción. Esto quiere decir que cada molécula tiene un perfil típico y característico.

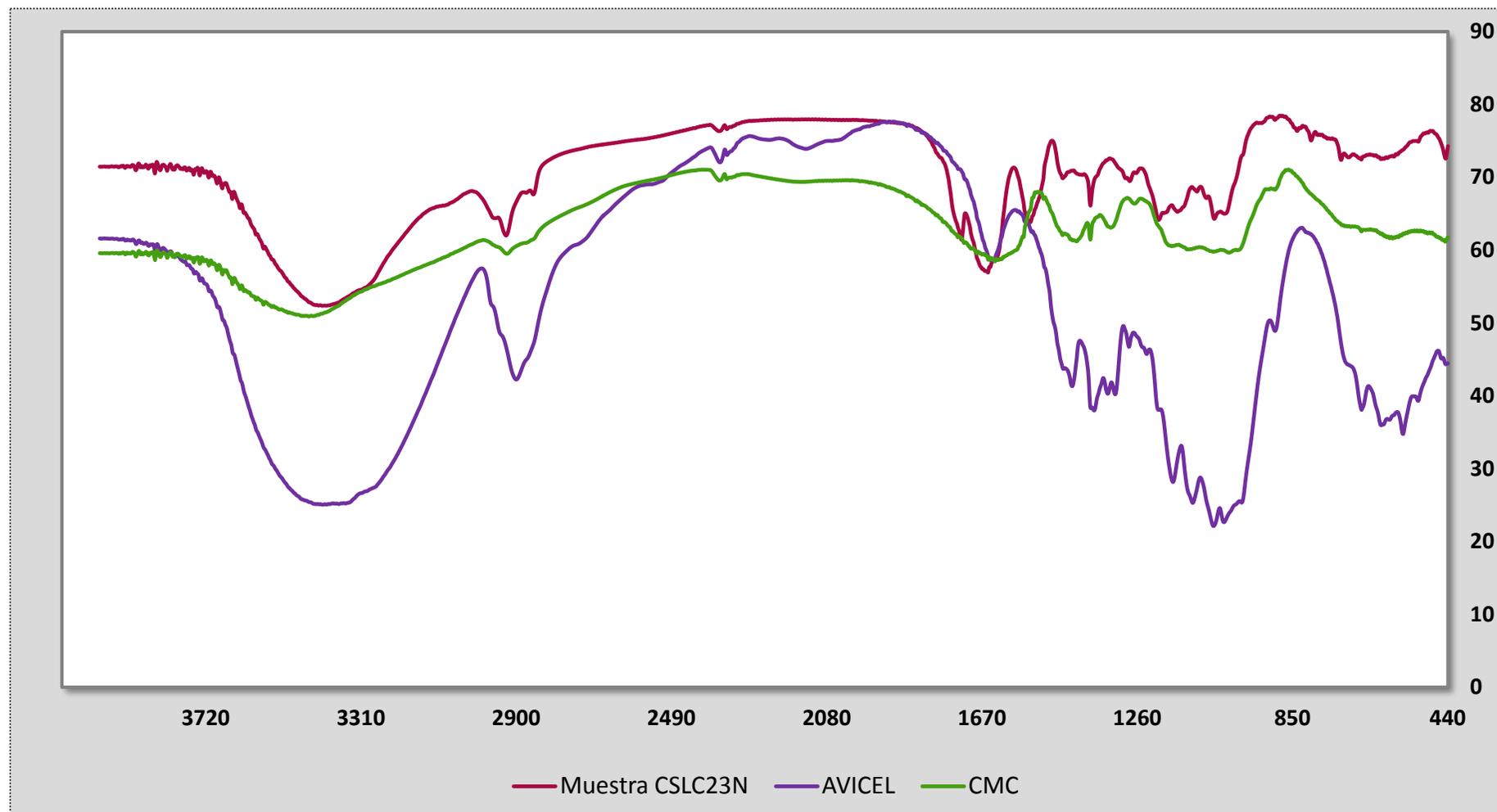
Con estos resultados deducimos que hay una mezcla de un exopolisacárido insoluble y amorfo, con dos picos cristalinos en 13,8 y 17, que no se corresponden con el perfil del difractograma obtenido para la celulosa cristalina y que podría corresponder a la señal del segundo exopolisacárido presente en la muestra. Es decir, que el perfil de la muestra se está viendo enmascarado por lo que *a priori* parece la mezcla de dos biopolímeros diferentes, razón por la cual aparecen picos en el difractograma que no se corresponden con ningún compuesto en concreto.

Por tanto y para tratar de determinar la naturaleza molecular del biopolímero que forma *Mesorhizobium* sp. CSLC23N, llevamos la muestra a analizar al servicio de espectroscopia infrarroja (FTIR) de la Universidad de Salamanca.

### **1.5. Espectroscopía Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR).**

La energía IR produce vibraciones moleculares, de tal manera que cada tipo de enlace químico vibra a una frecuencia específica de manera natural. Cuando la frecuencia de la luz IR alcanza la frecuencia de vibración del enlace, se produce la absorción. La cantidad de energía absorbida es proporcional a la fortaleza del enlace. El conjunto de absorbancias IR para una muestra está referida como su espectro IR, y cada muestra tiene un espectro IR único, de manera que un espectro IR puede servir como una huella dactilar de un compuesto.

Para tratar de determinar qué tipo de enlaces conforman el biopolímero formado por *Mesorhizobium* sp. CSLC23N, mandamos una muestra purificada al servicio de espectroscopía infrarroja de la Universidad de Salamanca. Así mismo, junto con la muestra a estudiar, mandamos una muestra representativa de cada control: CMC y Avicel, del mismo modo que anteriormente se hizo para el servicio de difracción de Rayos X (gráfica 6).



Gráfica 6. Espectros FTIR superpuestos de la cepa de estudio *Mesorhizobium* sp. CSLC23N y de los controles Avicel y CMC.

En la gráfica 6 podemos observar que el espectro obtenido para la muestra de estudio no se asemeja al espectro correspondiente al patrón de Avicel. Respecto al espectro del patrón de CMC, podemos decir que en rasgos generales puede tener una tendencia similar, pero que analizando detalladamente los picos, vemos como nuestra muestra de estudio presenta más picos y más marcados que el espectro de CMC en el intervalo comprendido entre  $1688$  y  $440\text{ cm}^{-1}$ . Nuestra muestra de estudio tiene, por tanto, un perfil muy parecido a la celulosa amorfa, pero no es exactamente igual.

### 1.6. Tratamiento de los agregados con celulasas.

Para tratar de averiguar la composición de los agregados producidos por cada una de las seis cepas a estudio, decidimos realizar un tratamiento enzimático con dichos agregados producidos tras 5 días de incubación en medio YMB a  $28^{\circ}\text{C}$  y  $180\text{ rpm}$ . Los resultados obtenidos fueron comparados de nuevo con la cepa control ANU483 (Figuras 43 y 44).

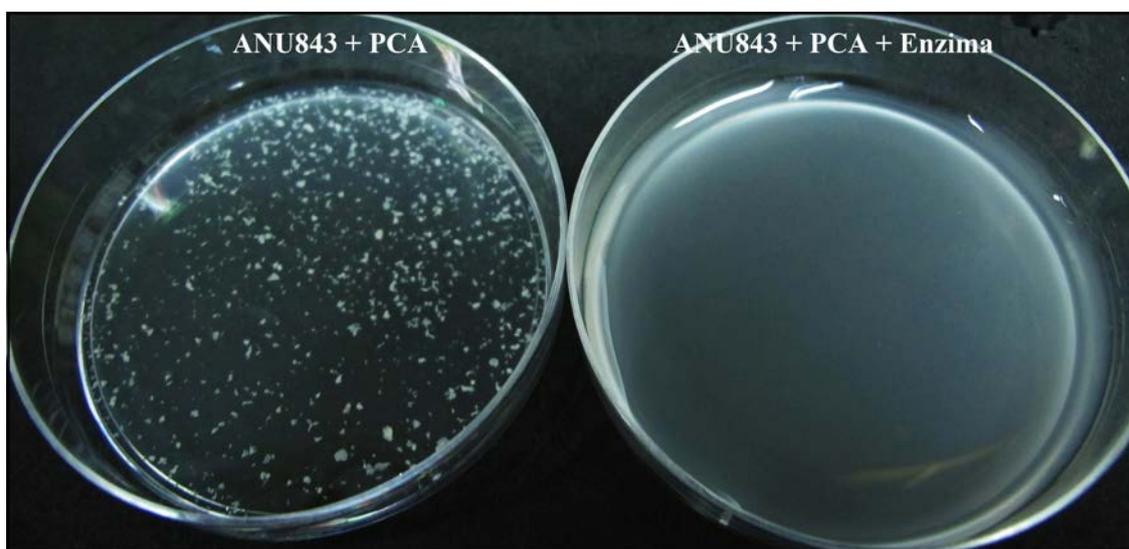
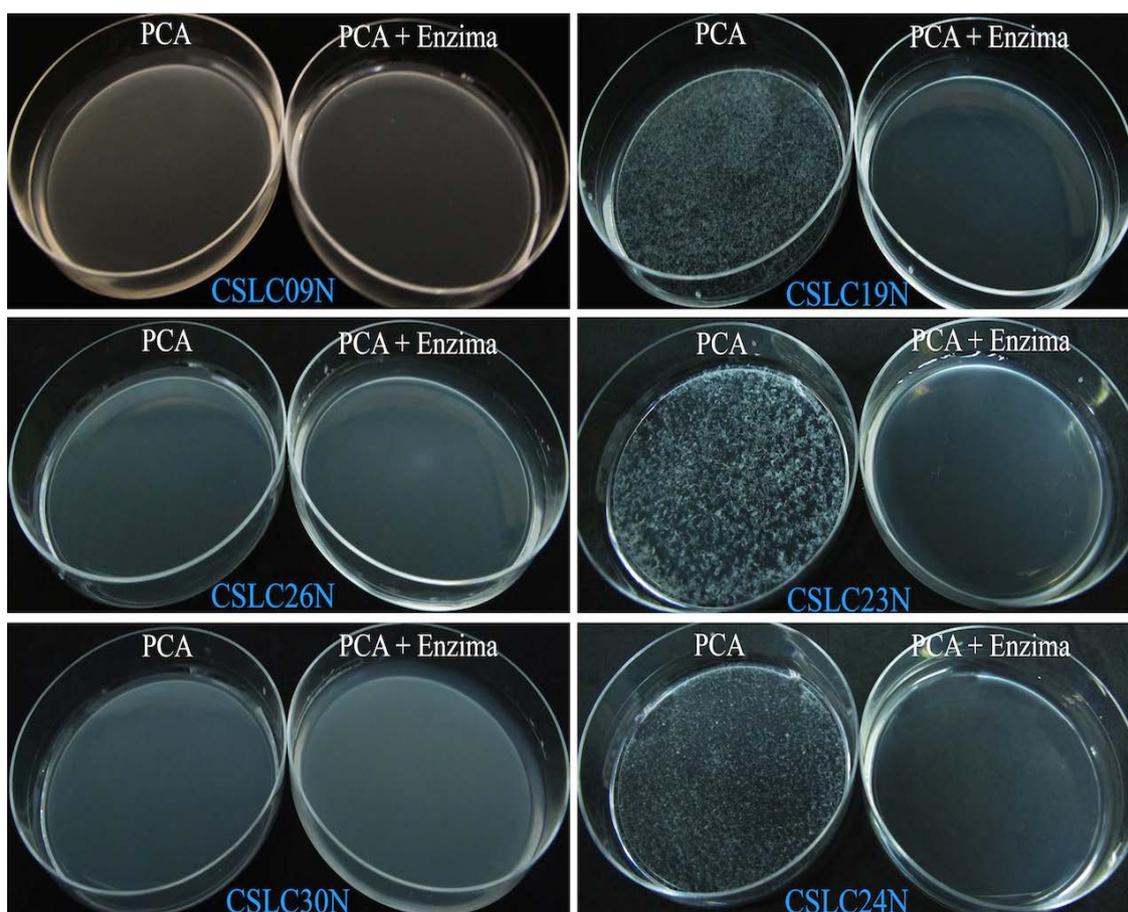


Figura 43. En la izquierda de la imagen podemos ver los flóculos que presenta la cepa ANU843 tras 5 días de incubación en medio YMB a  $28^{\circ}\text{C}$  y  $180\text{ rpm}$ . A la derecha observamos cómo tras 2 horas del tratamiento con celulasa de *Trichoderma viridae* esos flóculos han desaparecido, difundiéndose en el medio.



**Figura 44.** En cada una de las imágenes podemos ver el tratamiento realizado para cada una de las cepas tras 5 días de incubación en medio YMB a 28°C y 180 rpm. A la izquierda observamos el tratamiento sin la adición de celulasa; a la derecha observamos el tratamiento con la adición de la celulasa y tras 2 horas de incubación a 37°C.

Podemos observar que las cepas englobadas dentro del grupo 1, antes del tratamiento con la enzima presentaban flóculos dispersos y abundantes, en mayor medida la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N. Después del tratamiento con celulastas, los flóculos en los tres casos se disgregaron y se homogeneizaron con el medio. Este comportamiento es similar al que pudimos observar con el control ANU843, lo que nos podría indicar que se trataría de cepas productoras de celulosa, de un derivado de la misma o, al menos, de algún biopolímero con enlaces  $\beta$ -1,4, razón por la cual se usó el Rojo Congo en ensayos previos.

Respecto a las cepas del grupo 2, CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N no observamos mucha diferencia antes y después del tratamiento con celulastas de *Trichoderma viridae*, debido a que las cepas no presentaban flóculos en la suspensión. Tomando en conjunto estos datos con los mencionados con anterioridad, podemos decir que estas tres cepas tienen un comportamiento similar: las tres produjeron de manera débil celulosa en el ensayo de la determinación cualitativa de la misma (apartado 4, Capítulo II) presentaron una buena formación de biofilms en placa (apartado 5.1, Capítulo II), y produjeron biofilms de maduración intermedia en vidrio (apartado 5.2, Capítulo II). Las tres acidificaron el medio en el ensayo de floculación, produciendo

poca cantidad de los mismos tanto en el tratamiento con Rojo Congo como en el tratamiento sin él. Podríamos estar por tanto ante la formación de un nuevo biopolímero o polisacárido insoluble por parte de estas tres cepas, del cual sería interesante tratar de determinar su estructura en un futuro.

Tomados por tanto todos los datos en conjunto, podríamos decir que las cepas del grupo 1 CSLC19N, CSLC23N y CSLC24N son capaces de formar dos biopolímeros simultáneamente. Por un lado, uno más abundante de pH neutro, al que se une el Rojo Congo y el Blanco de Calcoflúor y con capacidad para formar abundantes flóculos que son disgregados por la enzima de *T. viridae*. El segundo biopolímero formado de naturaleza acídica, menos abundante pero con la capacidad suficiente de adherirse a una superficie vítrea.

El biopolímero formado por la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC23N no tienen exactamente la misma estructura que los controles Avicel y CMC, como así hemos podido ver gracias al difractograma de difracción de Rayos X y al espectro FTIR. Estos datos podemos extrapolarlos a las cepas CSLC19N y CSLC24N, ya que ambas presentan el mismo comportamiento que la cepa CSLC23N.

Estos resultados hacen que nos planteemos dos hipótesis:

- Que sí se está produciendo celulosa, pero que su determinación se ve enmascarada por la presencia de proteínas o elementos que generan distorsión en su identificación; o bien que se está produciendo un derivado de la celulosa, con sustituciones en algún enlace de la cadena de glucano o en el propio monómero de glucosa.
- La segunda posibilidad es que se está produciendo celulosa, pero su correcta identificación se está viendo directamente afectada o enmascarada por la formación de un segundo biopolímero soluble y de pH ácido. Con lo cual podríamos estar viendo una mezcla de los dos, tanto en el difractograma de Rayos X, como en el espectro FTIR.

En el caso de las tres cepas restantes, CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N, podemos decir que el biopolímero que forman es totalmente soluble, aunque con cierta capacidad de adherirse a la superficie vítrea, como así hemos podido ver en ensayos previos, incluida la formación de Biofilm. Además, es de naturaleza acídica y presenta también la capacidad de unirse al Blanco de Calcoflúor, lo que nos da una pequeña pista de los enlaces que forman su estructura,  $\beta$ -1,3 y/o  $\beta$ -1,4.

En cualquiera de los casos sería necesaria la realización de pruebas adicionales que confirmen con exactitud si el biopolímero formado por las cepas englobadas en el grupo 1 (CSLC19N, CSLC23N y CSLC24N) es celulosa o, por el contrario y no menos atractivo, que se trate de un derivado de la celulosa, ya que sería un compuesto muy interesante para estudiar en profundidad. También sería muy interesante seguir estudiando para tratar de averiguar la identidad del segundo biopolímero formado de

color azul-violáceo, que a todas luces parece ser el mismo en las seis cepas, y que podría ser de gran importancia, ya que como hemos visto tiene capacidad para adherirse y fijarse a las superficies.

## **2. Determinación y caracterización de Ácidos Polihidroxicanoicos.**

Los materiales plásticos son ampliamente utilizados en nuestros días, debido a que son materiales muy resistentes y baratos que presentan múltiples y diversas aplicaciones industriales. Sin embargo, los plásticos fabricados a partir de petróleo no son biodegradables y sus residuos han conllevado una gran cantidad de contaminantes plásticos en todo el mundo. Es por ello que la búsqueda de alternativas a los plásticos derivados del petróleo se ha convertido en algo prioritario. Los ácidos polihidroxicanoicos (PHAs) ofrecen una alternativa altamente recomendable al ser poliésteres naturales que pueden ser utilizados como bioplásticos, con la ventaja de que además son biodegradables.

En las últimas décadas se ha incrementado el número de estudios con microorganismos capaces de producir estos bioplásticos, con el propósito principal de obtener altos rendimientos de estas moléculas.

### **2.1. Selección de bacterias productoras de PHAs.**

El análisis de la producción de PHAs fue llevado a cabo nuevamente sobre las 38 cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium*. Estas cepas fueron incubadas en 6 medios de cultivos diferentes suplementados con el colorante Rojo Nilo (ver apartado 3.6 de Materiales y Métodos) para comprobar la posible producción de PHAs.

Después de 5 días de incubación a 28°C, 20 de las 38 cepas fueron positivas en la producción de PHAs (figura 45). Las 38 cepas fueron capaces de crecer en los seis medios de cultivo, pero la fluorescencia naranja, indicativa de producción positiva, únicamente fue observada en el medio descrito por Bazinger et al. (Banziger et al. 2001).

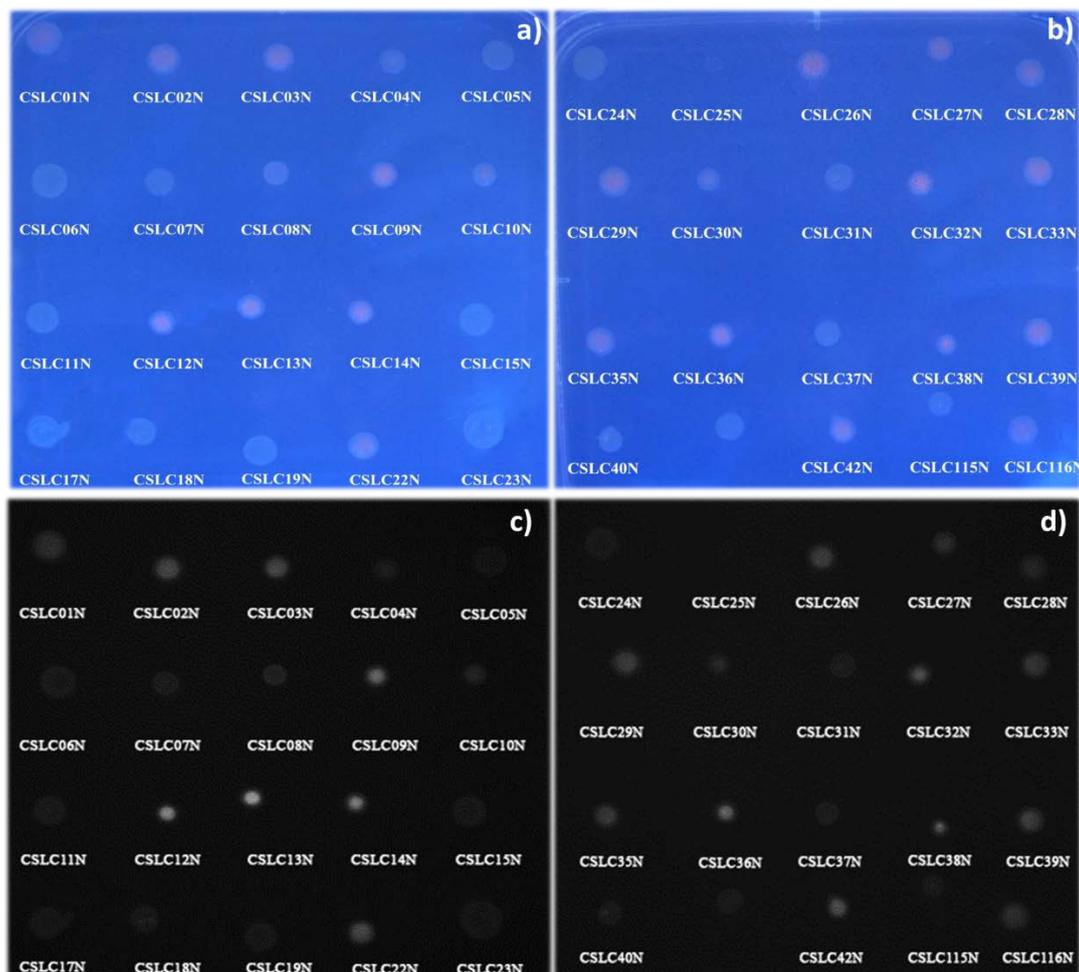


Figura 45. a) y b) Fluorescencia naranja observada en las placas correspondientes al medio 1. Las cepas CSLC01N, CSLC02N, CSLC03N, CSLC09N, CSLC10N, CSLC12N, CSLC13N, CSLC14N, CSLC22N, CSLC26N, CSLC27N, CSLC29N, CSLC32N, CSLC33N, CSLC35N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N, CSLC42N, CSLC116N, mostraron producción positiva. La cepa CSLC04N, también fue positiva, pero tuvo una producción más débil. c) y d) Fluorescencia observada de la tinción con rojo Nilo de células acumuladoras de PHAs de cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium*.

Después de 8 días de incubación, observamos en el microscopio de fluorescencia las células de cada una de las cepas productoras de PHAs, para verificar la presencia de gránulos citoplasmáticos en todas las muestras (figura 46).

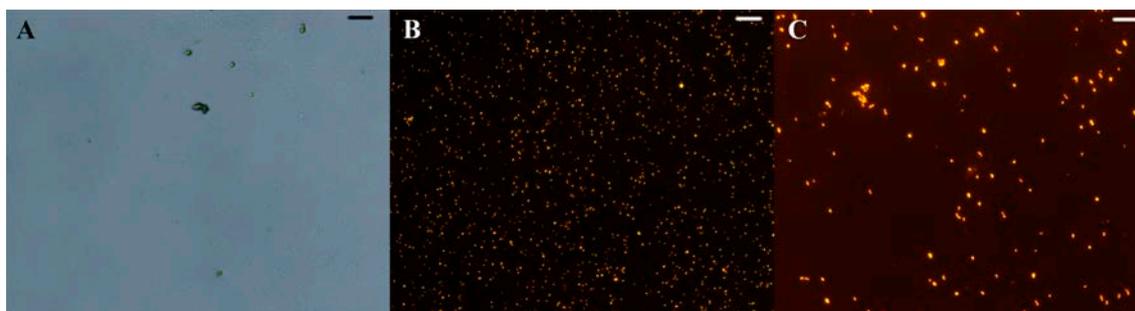


Figura 46. PHAs formados por la cepa CSLC26N observados con el microscopio de fluorescencia. A) Gránulos citoplasmáticos observados con luz visible; B) y C) fluorescencia observada de gránulos citoplasmáticos. Correspondencia de las escalas: 500  $\mu\text{m}$  (A y B); 100  $\mu\text{m}$  (C).

## 2.2. Identificación de ácidos polihidroxicarboxílicos (PHAs).

Los resultados obtenidos en el apartado anterior muestran que las 20 cepas del género *Mesorhizobium* son capaces de producir PHA en medio mínimo, con sacarosa como única fuente de carbono. Sin embargo, los medios testados únicamente permiten una medida cualitativa de la producción total de PHAs. Por ello, el siguiente paso fue realizar una identificación de los monómeros concretos que constituyen los PHAs así, como la cuantificación de cada uno de ellos (tabla 38).

**Tabla 38. Producción de monómeros de ácidos polihidroxicarboxílicos (PHAs). 3HB (3-hidroxi-butírico); 3HV (3-hidroxi-valérico; C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>); 3HDD (3-hidroxi-dodecanoato; C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>); 3HHD (3-hidroxi-hexadecanoico, C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>). Nd: no detectado.**

Cepa	3HB ng/mg	3HV ng/mg	3HDD ng/mg	3HHD ng/mg
<i>M. jarvisii</i> CSLC01N	113350	1150	589	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC26N	18588	706	nd	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC03N	113209	674	209	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC29N	129894	1423	498	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC38N	151259	1796	542	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC116N	149468	1038	316	nd
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC09N	130133	1069	450	nd
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC14N	119856	1174	568	nd
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC22N	144995	1665	731	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC36N	43054	620	406	499
<i>M. jarvisii</i> CSLC33N	75125	nd	nd	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC42N	172214	1385	395	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC02N	83559	830	520	nd
<i>M. caraganae</i> CSLC04N	132925	1774	907	nd
<i>M. caraganae</i> CSLC10N	224529	3821	483	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC12N	177724	1524	461	nd
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC27N	89239	1081	396	nd
<i>Mesorhizobium</i> sp. CSLC32N	108726	862	315	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC13N	164012	1639	509	nd
<i>M. jarvisii</i> CSLC39N	85313	1095	491	nd

Como muestran los datos de la tabla 38, todas las cepas productoras son capaces de producir ácido 3-hidroxi-butírico (3HB; C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), es decir, el monómero que constituye poli-3-hidroxi-butirato, el PHA de cadena corta que con mayor frecuencia producen los microorganismos (Spiekermann et al. 1999; Luengo et al. 2003). Además, 19 produjeron el monómero 3-hidroxi-pentanoico, también llamado 3-hidroxi-valerato o ácido 3-hidroxi-valérico (3HV; C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>). Como podemos observar, todas las cepas que producen monómeros de 3HV son también productoras de monómeros de 3HB, lo que podría sugerir que estas cepas son capaces de producir el valiosísimo copolímero poli-

(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), también conocido como poli(3HB-co-3HV). Este copolímero ofrece aplicaciones muy diversas en la industria, comercializándose por ejemplo para implantes médicos y empaquetamientos especiales, entre otros (Kaplan 1998; Bordes et al. 2009). Su importancia radica en su baja cristalinidad y punto de fusión, lo cual confiere a este biomaterial mayor resistencia, flexibilidad y un procesamiento más fácil. Las propiedades del copolímero varían en función del ratio en la composición de los monómeros que lo constituyen. El monómero 3HB proporciona rigidez y, por el contrario, el monómero 3HV flexibilidad (Suriyamongkol et al. 2007).

Por otro lado, la tabla 38 también nos muestra que 18 de las 20 cepas productoras son capaces de formar el monómero 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD;  $C_{16}H_{32}O_3$ ). Este PHA de cadena media tiene gran valor como potencial farmacéutico (Takahashi et al. 1994), razón por la cual el desarrollo de tecnología para su producción ha comenzado a ser cada vez más atractiva. Los PHAs de cadena media que contienen más del 15% del monómero 3HDD en su composición, mejoran de manera significativa sus propiedades térmicas y mecánicas sobre el PHA de cadena media convencional (Ouyang et al. 2007; Chen 2009; Ma et al. 2009). No es la primera vez que se observa la producción de ácido 3-hidroxi-dodecanoico por una bacteria del género *Mesorhizobium*. Choma y Komanięcka (Choma y Komanięcka 2002) realizaron un estudio comparativo químico e inmunológico de los lipopolisacáridos formados por diferentes cepas identificadas como *M. huakuii* y/o *M. ciceri*. En este estudio encontraron el monómero 3-hidroxi-dodecanoico dentro de la muestra del lipopolisacárido formado por la cepa *M. huakuii* IFO 15243<sup>T</sup>, aislada de nódulos de *Astragalus sinicus* en China.

La cepa *M. caraganae* CSLC10N es la cepa que presenta la mayor capacidad, de entre las 20 cepas productoras de PHAs analizadas, de formar los monómeros PHB y PHV, siendo capaz también, de forma moderada, de producir monómeros de 3HDD. Resulta muy interesante que *M. jarvisii* CSLC36N sea la única cepa capaz de producir monómeros de ácido 3-hidroxi-hexadecanoico (3HHD,  $C_{16}H_{32}O_3$ ). Pero es que, además, esta cepa es capaz de producir los monómeros PHB, PHV y 3HDD, lo cual le confiere un elevado potencial para la formación de diferentes copolímeros, que son de los tipos de polihidroxicanoatos bacterianos más deseados e interesantes que hasta ahora se han descubierto (Takahashi et al. 1994).

Una de las primeras especies rizobianas en ser detectada como productora de PHAs fue *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti*. De esta especie se han identificado los genes responsables de la producción de PHB (Tombolini et al. 1995), así como la producción del copolímero poli(3HB-co-3HV) (Anil Kumar et al. 2007). Según los resultados que hemos obtenido en este estudio, varias cepas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* e identificadas dentro del género *Mesorhizobium* tienen la posibilidad de formar este valioso copolímero, debido a que son capaces de formar los dos monómeros que lo constituyen.

Existe un interesante incremento de la producción de polihidroxicanoatos por los microorganismos, más específicamente por cepas bacterianas capaces de producir diferentes tipos de monómeros que con toda probabilidad conformarán copolímeros. Muchos de los estudios hasta ahora realizados se han centrado en la búsqueda de bacterias productoras de PHAs en sustratos de bajo coste como los residuos obtenidos en las fábricas de papel y pulpa, residuos agrícolas, lodos de las plantas de tratamientos, sitios contaminados con hidrocarburos o efluentes industriales, entre otros. En este estudio hemos hallado cepas pertenecientes a varios linajes diferentes, dentro del género *Mesorhizobium* y aisladas de nódulos de una leguminosa, como potenciales productores de PHAs.

Muchas de las cepas aisladas son filogenéticamente cercanas a *M. jarvisii*, siendo esta la primera vez que se demuestra la capacidad de producir PHAs en esta especie. Sin embargo, podemos concluir y afirmar que la capacidad para sintetizar PHAs es dependiente de cepa y no de especie. Además, nuestros hallazgos sugieren que los nódulos de las leguminosas son una fuente potencial de bacterias productoras de PHAs, cumpliendo las normas de bioseguridad, con lo cual merece la pena realizar más estudios sobre sus posibles aplicaciones.

En general, creemos que las cepas del género *Mesorhizobium* analizadas en este estudio, particularmente la cepa *M. jarvisii* CSLC36N, deberían ser consideradas para realizar estudios más exhaustivos basados en la optimización de la producción de PHAs. La optimización de las condiciones de crecimiento y la adición de otras fuentes de carbono, especialmente fuentes de carbono de bajo coste, en el diseño de nuevos medios mínimos para la mejor producción de estas cepas de *Mesorhizobium* productoras de PHAs, aumentaría las concentraciones de polihidroxicanoatos formados y, además, aumentaría las posibilidades de formar copolímeros con alto potencial biotecnológico para su posible aplicación en la industria de la biotecnología.

Estudio de la capacidad  
para formar nódulos en raíces de  
*Lotus corniculatus*.



CAPÍTULO IV



Desde hace años se conoce como el endosimbionte natural de *Lotus corniculatus* a *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al. 1997), reclasificado de *Rhizobium loti* (Jarvis et al. 1982). Pero en estudios realizados con posterioridad (Martínez-Hidalgo et al. 2015) se ha averiguado que la cepa tipo de esta especie estaba guardada en diferentes colecciones de cultivo y que realmente representaba tres especies diferentes: *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii*. Por lo que hay que sumar a la especie tipo inicial de este género, *M. loti*, otras dos especies más como endosimbiontes de *L. corniculatus*.

Como vimos en el Capítulo I, el análisis filogenético de los genes *recA* y *atpD* concatenados nos mostró que las cepas aisladas en este estudio pertenecen a varios clusters, dos de ellos muy próximos a *M. jarvisii*. Las cepas restantes fueron filogenéticamente divergentes de los tres endosimbiontes de *L. corniculatus*, repartiéndose entre las especies *M. helmanticense*, *M. caraganae* y *Mesorhizobium* sp.

Por ello nuestro siguiente objetivo fue hacer ensayos de nodulación con las 38 cepas aisladas pertenecientes al género *Mesorhizobium*, así como con las tres cepas tipo endosimbiontes de *L. corniculatus* para estudiar el desarrollo nodular de cada una de ellas y poder compararlas entre sí.

Para determinar qué es lo que ocurre en el proceso de nodulación de *Lotus corniculatus*, se realizaron diferentes ensayos de nodulación en condiciones axénicas (en cultivo hidropónico, en tubo). Ello nos ayudó a averiguar y conocer la cinética de nodulación que siguen las plantas inoculadas con las cepas aisladas del género *Mesorhizobium*, así como la cantidad de nódulos efectivos (Fix+), y la morfología de los mismos en cada caso.

Decidimos analizar los resultados obtenidos agrupando a las cepas por grupos según la identificación final realizada en el capítulo I. De esa manera nos permite discernir las posibles diferencias y/o similitudes existentes entre las diferentes especies aisladas.

## **1. Ensayos de nodulación con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> y *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.**

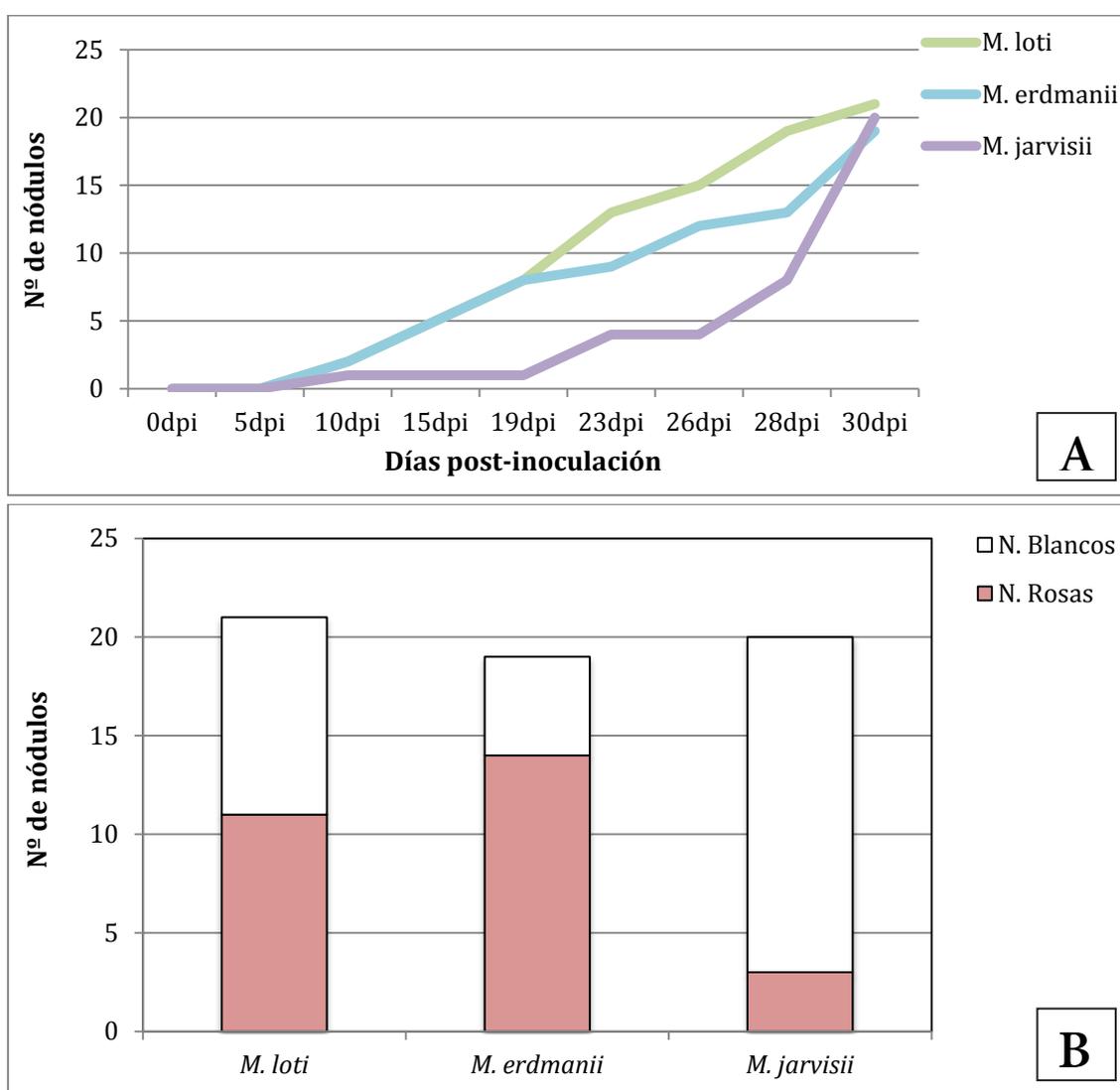
Comenzamos analizando los resultados obtenidos en los ensayos de nodulación realizados con las cepas tipo endosimbiontes de *L. corniculatus*: *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> y *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.

### **1.1. Cinética de nodulación.**

A lo largo del transcurso del experimento, se fueron observando cada 3-4 días las plantas de cada tratamiento, contando el número de nódulos que se iban formando.

Es decir, se siguió una cinética de nodulación de cada una de las cepas, desde el momento de su inoculación hasta pasados 30 dpi (días post inoculación).

Como se puede observar en la figura 47A en la cinética de nodulación, el número de nódulos totales es ligeramente superior en las plantas inoculadas con la cepa tipo *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>, que en las restantes inoculadas con las otras dos cepas endosimbiontes. Donde se observa más diferencia es durante el transcurso de la nodulación, en la cual observamos que los nódulos presentes en las plantas inoculadas con la cepa tipo *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup> presentan un incremento lineal a lo largo del ensayo; al igual que prácticamente en las plantas inoculadas con la cepa tipo *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. Sin embargo, observamos un retraso en la formación de nódulos de las plantas inoculadas con la cepa tipo *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, donde además apreciamos un incremento notable de la formación de nódulos prácticamente en los dos últimos días.



**Figura 47.** Cinética de nodulación (A) y número total de nódulos a los 30 dpi (B) de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con sus endosimbiontes naturales: *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> y *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>. N. Rosas: nódulos efectivos; N. Blancos: nódulos inefectivos.

En la figura 47B, podemos ver una gráfica representativa del número total de nódulos formados por las plantas inoculadas con los diferentes endosimbiontes de *L.*

*corniculatus*. No hay diferencias entre ellas si nos referimos al número total de nódulos formados, ya que prácticamente alcanzan el mismo valor a los 30 dpi. Sin embargo, sí que existen diferencias en cuanto al número de nódulos efectivos (de color rosáceo) e inefectivos (de color blanquecino), de tal manera que podemos hablar de una mejor efectividad en la nodulación en aquellas plantas inoculadas con la cepa *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. A pesar de que *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> induce un total de 20 nódulos, únicamente 3 de ellos son efectivos; por lo que la efectividad de nodulación de esta cepa podemos decir que es inferior y más retardada que *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. Por último observamos los resultados obtenidos para las plantas inoculadas con *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>, con un total de 21 nódulos inducidos, 11 de los cuales fueron efectivos. Se encontraría en una situación intermedia entre las dos cepas tipo mencionadas con anterioridad en lo concerniente a la efectividad en la nodulación.

## 1.2. Morfología nodular.

Los nódulos formados en dichas plantas presentaron una morfología característica de nódulo determinado, de aspecto globular (figura 48). Los nódulos determinados se originan en los primordios formados en la corteza media o externa de la raíz. Su aspecto globular se debe a que, a diferencia de los nódulos indeterminados, no presentan un meristemo persistente.

Se tomaron varias fotografías con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800), tanto de nódulos efectivos, como inefectivos. Además, se realizaron cortes transversales a los nódulos para observar su morfología y aspecto interior. De esta manera, y cómo podemos observar en la figura 47D, los nódulos cuyo aspecto exterior era rosáceo, sinónimo de que se está fijando Nitrógeno en su interior, presentaban una coloración rosácea también en su interior.

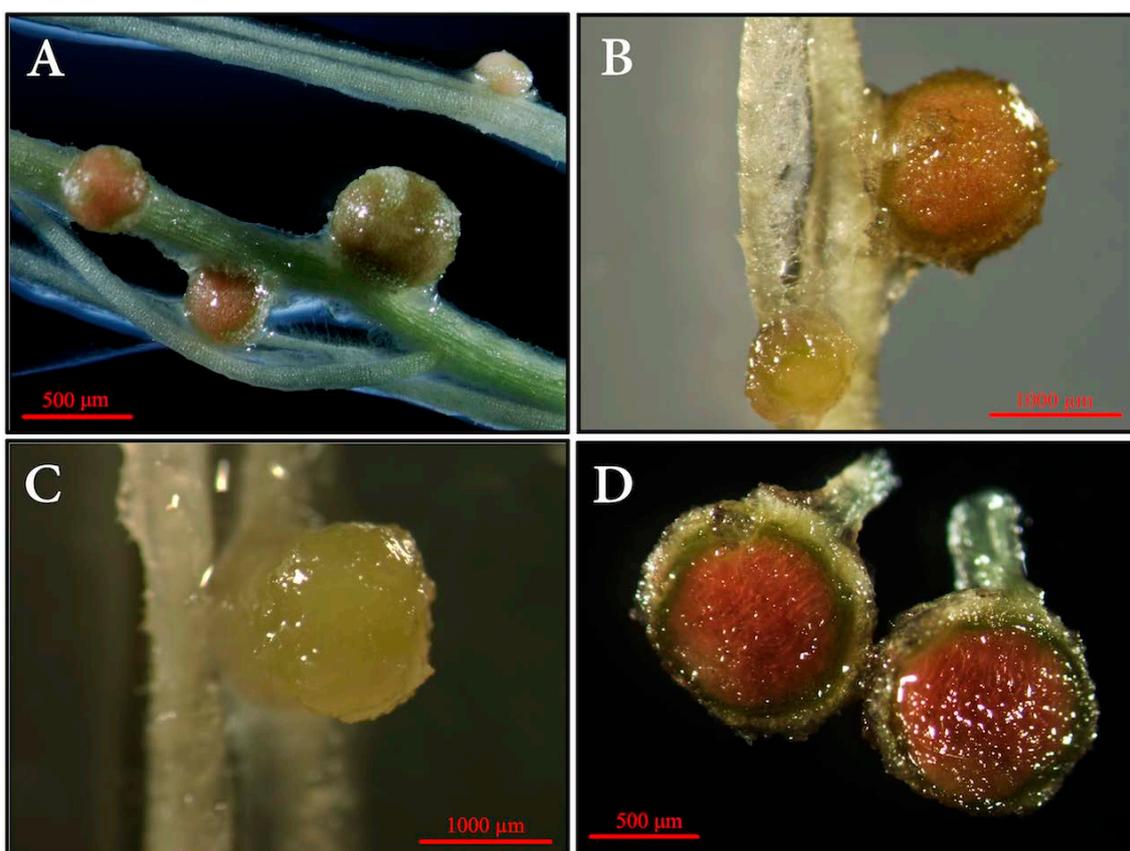


Figura 48. Fotografías realizadas con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800). En las imágenes vemos nódulos determinados efectivos (rosáceos) e inefectivos (blancos) formados en plantas de *L. corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* ATTC 33669T (A), *M. loti* NZP 2213T (B) y *M. erdmanii* USDA 3471T (C). D) Corte transversal de un nódulo efectivo formado en una planta inoculada con *M. erdmanii*.

### 1.3. Histología nodular.

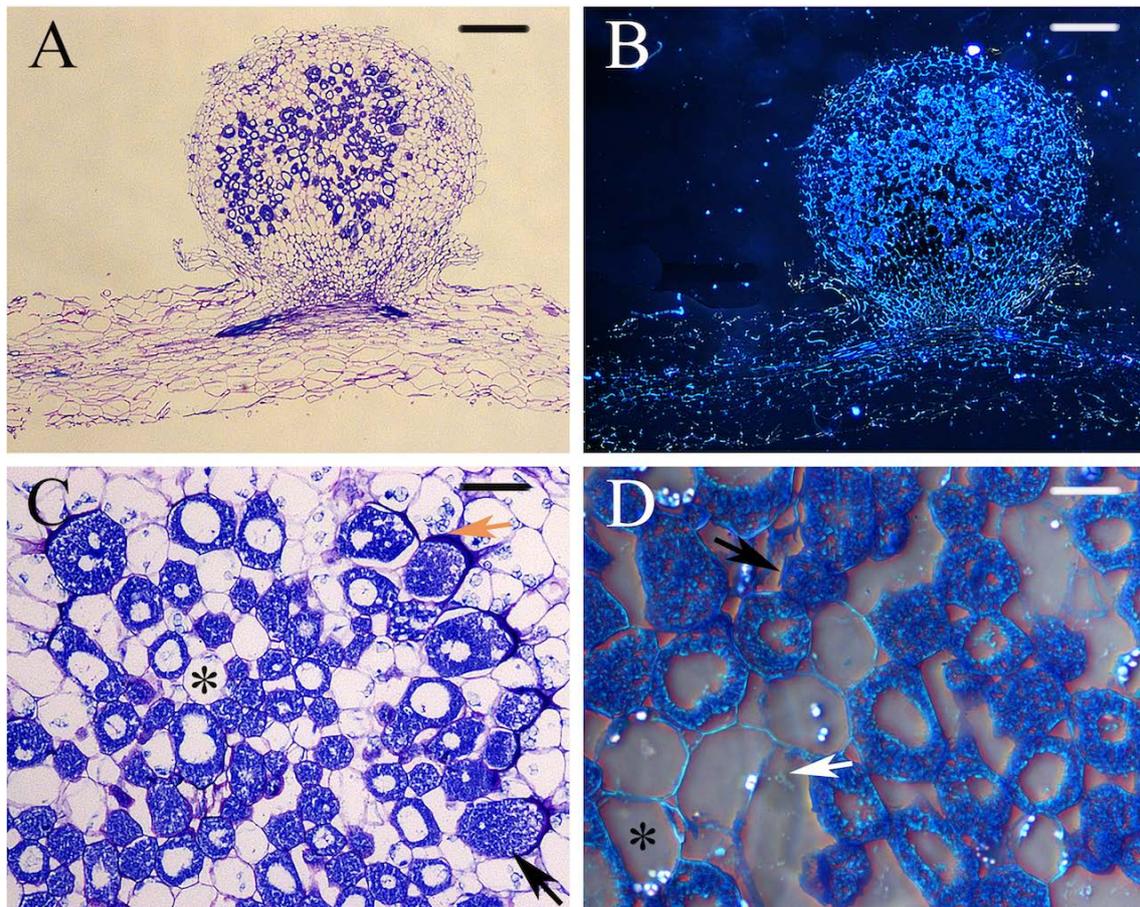
A continuación se enviaron una serie de nódulos representativos de cada uno de los tratamientos al Servicio de Patología Diagnóstica/Banco de Tumores del Centro de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca, donde se realizaron cortes histológicos de 2-3 micras y se tiñeron con azul de toluidina al 0,01%. Posteriormente, y con ayuda de un microscopio Nikon Eclipse 80i, observamos las estructuras nodulares internas mediante microscopía óptica utilizando distintos aumentos (figuras 49-51).

La pared celular de las células que constituye la parte exterior del nódulo posee celulosa cristalina. Sin embargo, respecto a las células interiores del nódulo solamente observamos celulosa cristalina en las paredes celulares de aquellas células no invadidas o infectadas. En las fotografías realizadas con luz polarizada (figuras 49B, 50B y 51B), observamos zonas brillantes en la pared celular del nódulo y en algunas zonas del interior del mismo, debido a la presencia de la mencionada celulosa cristalina.

Primero observamos los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> (figura 49), cuyo interior está organizado, observando los

típicos simbiosomas que distinguimos de color azul. En contraste vemos células vacías, no infectadas, las cuales predominan sobre las células infectadas/ocupadas. Existen algunas zonas de crecimiento bacteriano en los espacios intercelulares que podemos observar en la figura 48C, así como algunas bacterias dispersas, fuera de las células infectadas (figura 49D). A pesar de ello, la estructura interna está bastante organizada, manteniéndose la integridad del nódulo.

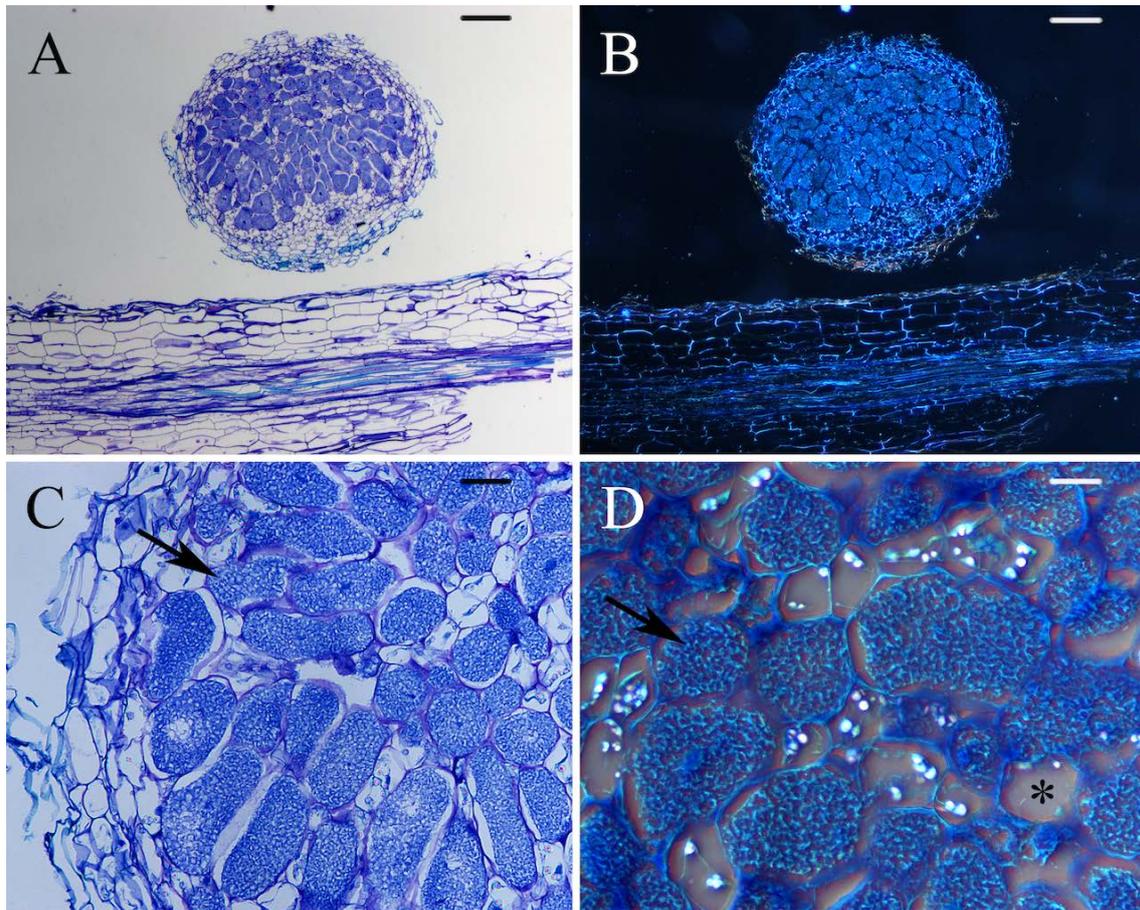
\*En todas las figuras de cortes histológicos nodulares que aparecen en este capítulo las imágenes A y C están realizadas en campo claro, la imagen B con luz polarizada y la imagen D está realizada en interferencia o contraste de fases.



**Figura 49.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. Tienen una buena organización interna, pero presentan bastantes células vacías. También se observan células ocupadas por simbiosomas y zonas de infección intercelular. Flecha negra: célula infectada; asterisco: célula no infectada; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: zona de crecimiento en espacios intercelulares. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

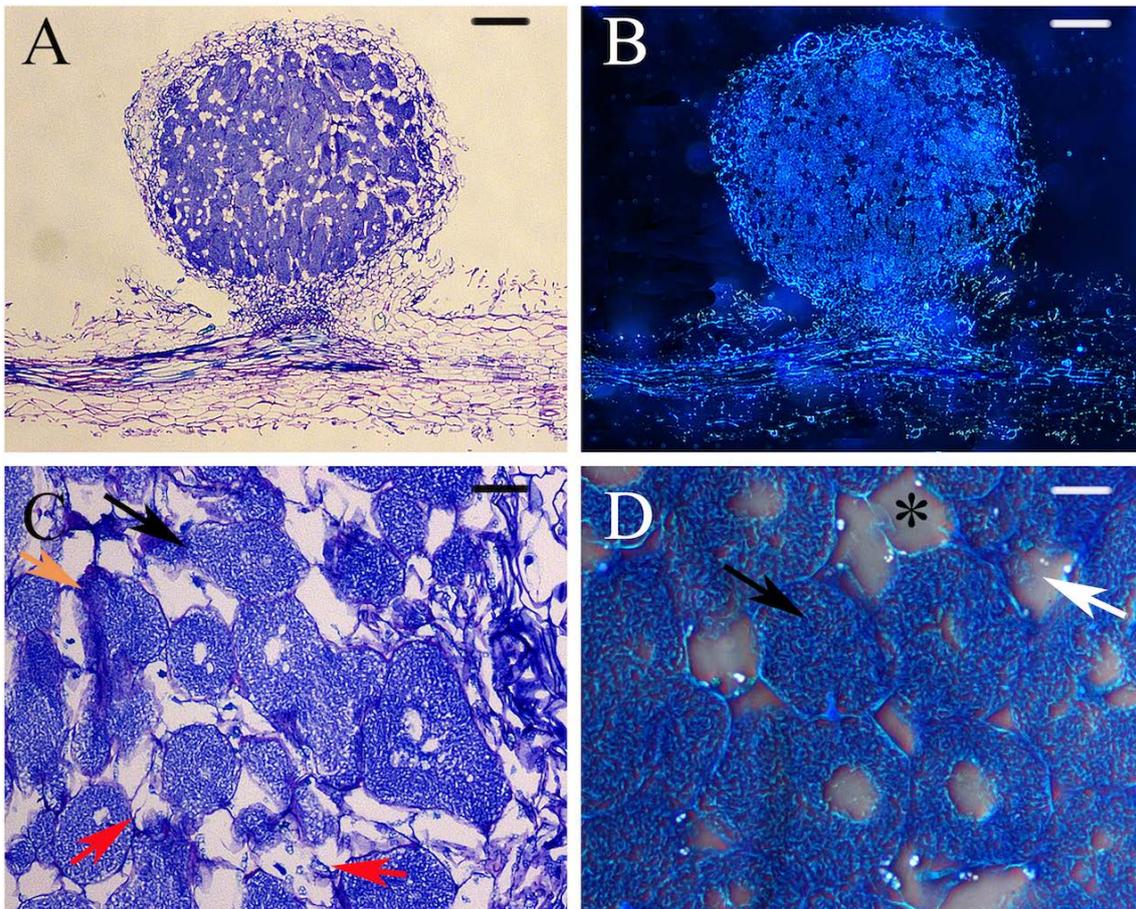
En el caso de la histología nodular correspondiente a las plantas de *L. corniculatus* inoculadas con *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup> (figura 50), vemos que es similar a lo observado en la figura 48 para *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. También observamos una

buena organización interna pero con mayor porcentaje de células ocupadas en comparación *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> (figura 49).



**Figura 50.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>. Tienen una buena organización interna, con un porcentaje alto de células ocupadas. Flecha negra: célula infectada; asterisco: célula no infectada. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

A continuación observamos los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> (figura 51). Observamos un interior nodular similar al observado en los nódulos de las plantas inoculadas con *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>, también con mayor proporción de células invadidas que con respecto a lo observado en los nódulos de las plantas inoculadas con *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup>. En esta ocasión podemos distinguir en la figura 5C canales de infección.



**Figura 51.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>. Tienen una buena organización interna, con pocas células sin invadir. También se observan células ocupadas por simbiosomas, zonas de infección intercelular y canales de infección. Flecha negra: célula infectada; asterisco: célula no infectada; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: zona de crecimiento en espacios intercelulares; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

De esta manera pudimos comprobar que a pesar de la escasez de nódulos formados durante el transcurso del ensayo, la nodulación fue correcta no presenciando estructuras anormales en ningún caso. Observamos un interior bien organizado con los simbiosomas claramente visibles. A destacar las plantas inoculadas con *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> con una ocupación visiblemente menor de las células, quedando las células infectadas heterogéneamente distribuidas en el nódulo. En rasgos generales podemos decir que el número total de nódulos obtenidos en las plantas inoculadas con los 3 endosimbiontes es bajo y el tamaño de los mismos es pequeño, como así pudimos observar en los apartados 1.1 y 1.2 del presente capítulo, pero a pesar de ello la integridad de los nódulos se mantiene, con una buena organización interna de los mismos.

## **2. *Mesorhizobium jarvisii* CSLC01N, CSLC02N, CSLC03N, CSLC11N, CSLC12N, CSLC13N, CSLC28N, CSLC29N, CSLC33N, CSLC36N, CSLC38N, CSLC39N y CSLC116N.**

### **2.1. Cinética de nodulación.**

A continuación realizamos una comparativa entre los resultados obtenidos y observados en los nódulos inducidos en las plantas inoculadas con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> y los de aquellas plantas inoculadas con cada una de las cepas aisladas en este estudio e identificadas como *M. jarvisii*.

Como podemos observar en la figura 51, todas las cepas identificadas en este estudio como *M. jarvisii* fueron capaces de volver a nodular su planta hospedadora *L. corniculatus*. Las cepas más noduladoras (figura 52A) fueron *M. jarvisii* CSLC28N con 86 nódulos, *M. jarvisii* CSLC36N con 69 nódulos, *M. jarvisii* CSLC02N con 56 nódulos y *M. jarvisii* CSLC39N con 53 nódulos. Muy por debajo se encuentra la cepa *M. jarvisii* CSLC11N con tan solo 17 nódulos. Donde vemos un retraso en el número de nódulos formados, es en las plantas inoculadas con la cepa tipo *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, en las que se observó un incremento notable de la formación de nódulos prácticamente en los dos últimos días, como ya vimos en el apartado 1.1.

Si atendemos por tanto al número total de nódulos formados con respecto a la cepa tipo, podemos decir que no siguen el mismo patrón. Ya que a excepción de *M. jarvisii* CSLC11N, el resto son más noduladoras que la cepa tipo.

Respecto al número de nódulos efectivos inducidos, podemos decir que en general todos los tratamientos resultaron muy superiores respecto al tratamiento realizado con la cepa tipo. Las cepas anteriormente mencionadas como las más noduladoras, poseen además un porcentaje de células invadidas elevado, en proporción con las que se mantuvieron sin ocupar o vacías.

Si observamos la cinética de nodulación (figura 52A y 52B), vemos que en rasgos generales todas siguen un crecimiento lineal. En la gráfica podemos observar la aparición de nódulos hasta el día 30 post-inoculación. Destaca nuevamente la cepa más noduladora CSLC28N, observando un incremento notable de formación de nódulos entre los 21-26 dpi.

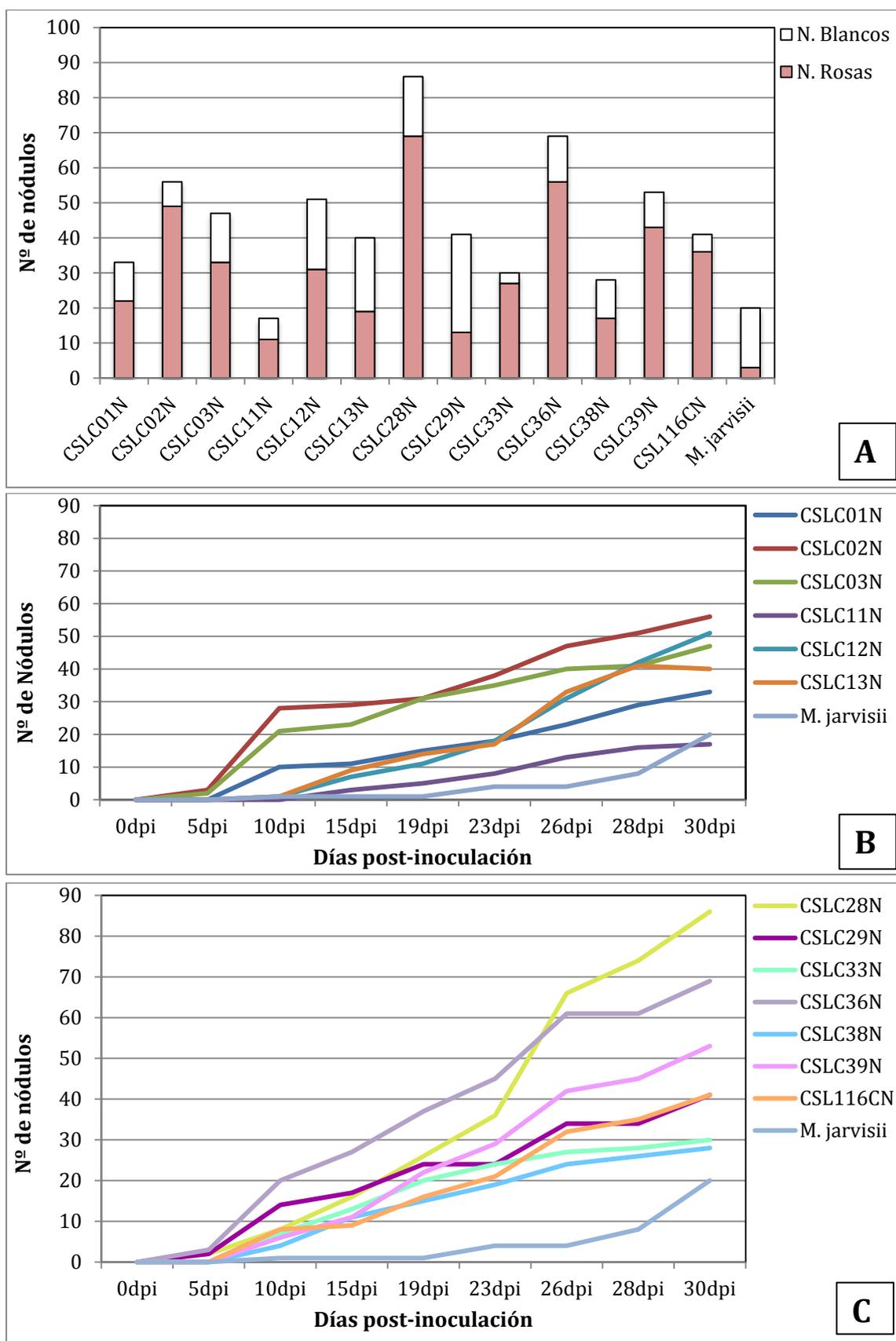


Figura 52. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B y C) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con diferentes cepas identificadas como *M. jarvisii* y en ausencia de Nitrógeno.

## 2.2. Morfología nodular.

Con el objetivo de observar la morfología de los nódulos determinados característicos de *L. corniculatus*, realizamos fotografías de diferentes nódulos representativos de cada uno de los tratamientos con una cámara fotográfica Nikon DS-Fi1 acoplada a una lupa estereoscópica (Nikon SMZ800). Se realizaron cortes a los nódulos y los observamos también con la lupa, para ver las diferencias entre los diferentes nódulos efectivos (rosáceos) e inefectivos (blanquecinos) (figura 53).

Como se puede observar en la imagen anterior, los nódulos de las plantas inoculadas con las cepas a estudio tienen una morfología normal, determinada y rosácea en el caso de nódulos efectivos. En el caso de los tratamientos realizados con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. jarvisii* CSLC36N, vemos un tamaño de los nódulos mayores, comparados con el tamaño medio observado para el resto de los tratamientos. Los nódulos inefectivos, en términos generales, mostraron una morfología determinada aunque en la mayoría de los casos y como es lógico, de tamaño menor al observado para los nódulos efectivos.

Comparando estos tratamientos con las plantas inoculadas con la cepa tipo de *M. jarvisii* vemos que los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa tipo presentaron una morfología determinada característica, si bien el tamaño de los mismos era notablemente inferior que el observado en las plantas inoculadas con nuestras cepas a estudio. Además, en esta cepa tipo aparecen un gran número de nódulos inefectivos que supera en número a los nódulos efectivos, característica en común con las plantas inoculadas con las cepas *M. jarvisii* CSLC13N y *M. jarvisii* CSLC29N.



Figura 53. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculados con las diferentes cepas de la especie *M. jarvisii*. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea, como nódulos blancos inefectivos. CSLC01N (A), CSLC02N (B), CSLC03N (C), CSLC11N (D), CSLC12N (E), CSLC28N(F), CSLC36N (G), CSLC29N (H), CSLC39N (I), CSLC116N (J), CSLC33N (K), CSLC38N (L) y CSLC13N (M).

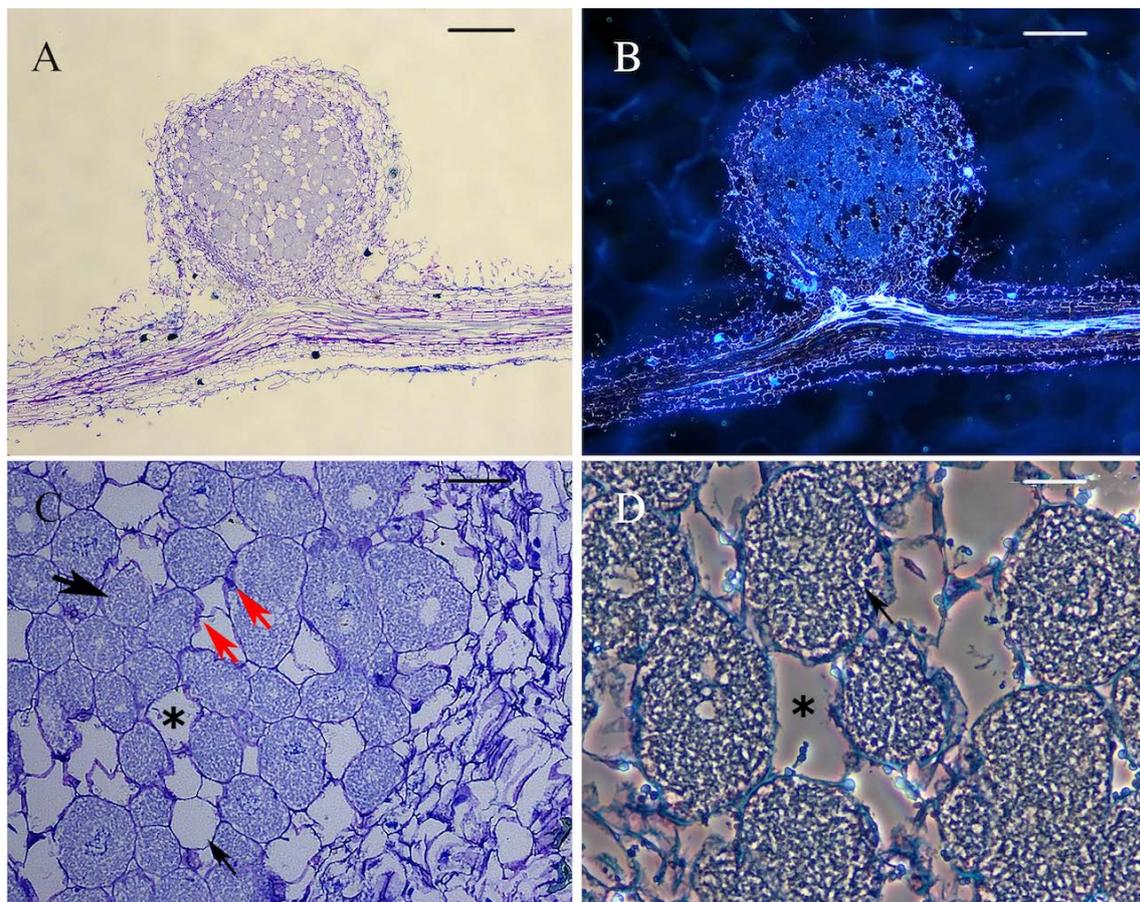
### 2.3. Histología nodular.

Para poder determinar la estructura interior de los diferentes nódulos con el objetivo de observar posibles diferencias entre los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con las diferentes cepas a estudio, se procedió a realizar una serie de cortes histológicos, tal y como se realizó con anterioridad en el apartado 1.3. Así mismo, realizamos una comparativa de dichos nódulos con los resultados observados para la cepa tipo *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>.

Al observar los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> vimos que el interior de los nódulos estaba organizado, observando los típicos simbiosomas de color azul. Estas células están fijando Nitrógeno, a diferencia de las células en las que vemos que no hay simbiosomas y aparecen de color blanco, ya que no han conseguido ser invadidas. En rasgos generales no observamos muchas células sin invadir, manteniéndose la integridad interna del nódulo.

En las los nódulos de las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC01N (figura 54) observamos similares características que anteriormente observamos en los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>. Los nódulos presentan una estructura interna organizada, con mayor proporción de células invadidas que sin invadir, en las cuales podemos distinguir algún canal de infección. No observamos en ningún caso zonas de crecimiento bacteriano en espacios intercelulares ni bacterias dispersas fuera de las células invadidas. Se mantiene la integridad del nódulo.

A continuación observamos los cortes nodulares correspondientes a cada una de las diferentes cepas identificadas como *M. jarvisii* (figuras 55-62) y que presentan la misma estructura y organización que *M. jarvisii* CSLC01N (figura 54).



**Figura 54.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC01N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Se observan células vacías y también ocupadas por simbiosomas, así como canales de infección. Flecha

negra: célula infectada; asterisco: célula no infectada; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

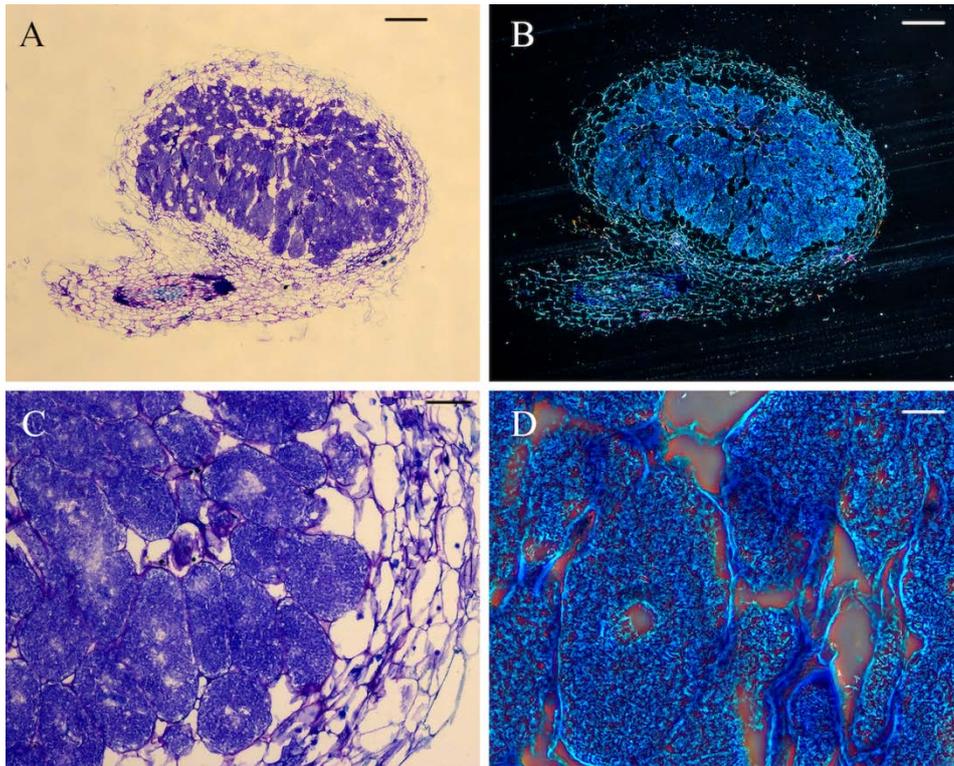


Figura 55. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC02N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

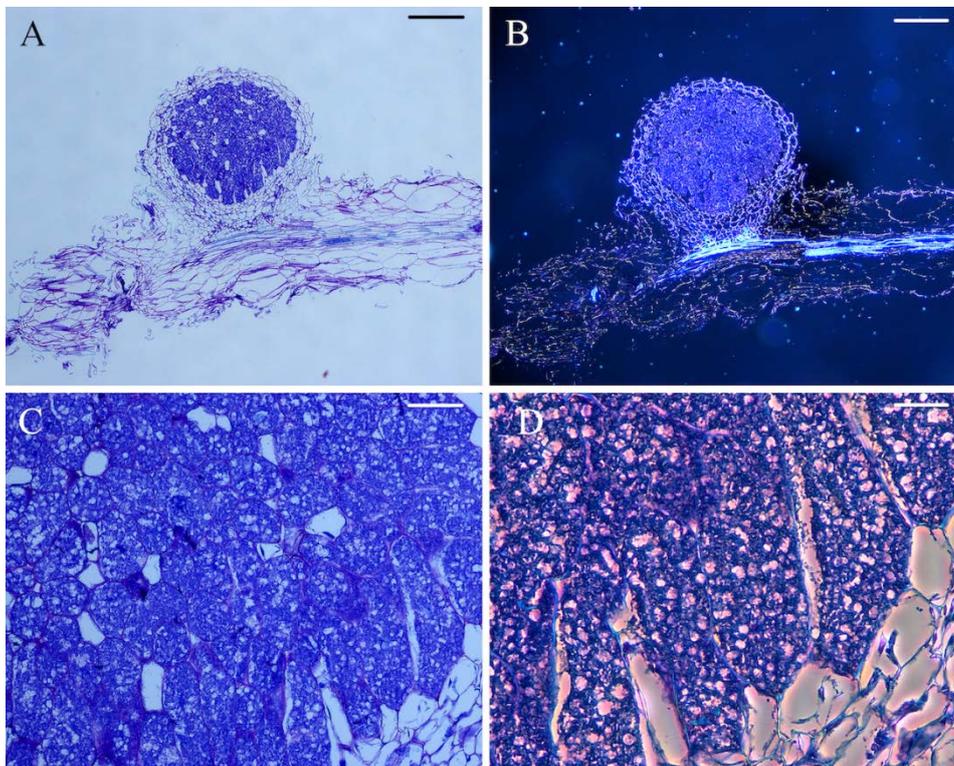


Figura 56. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC11N. Los nódulos presentan una buena

organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

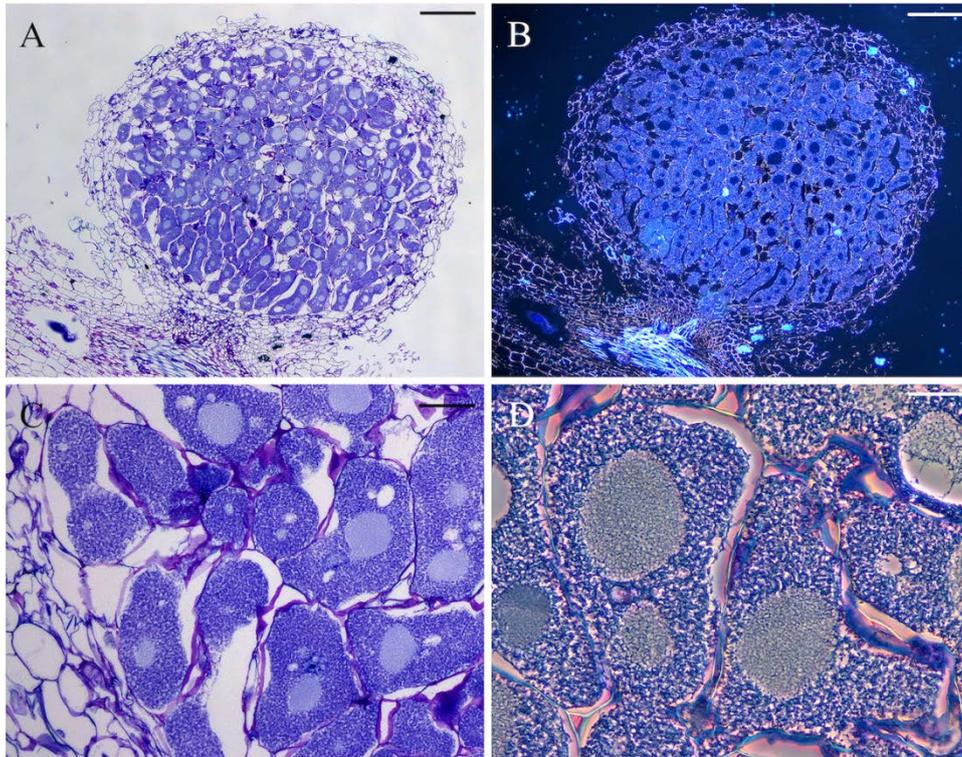


Figura 57. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC12N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

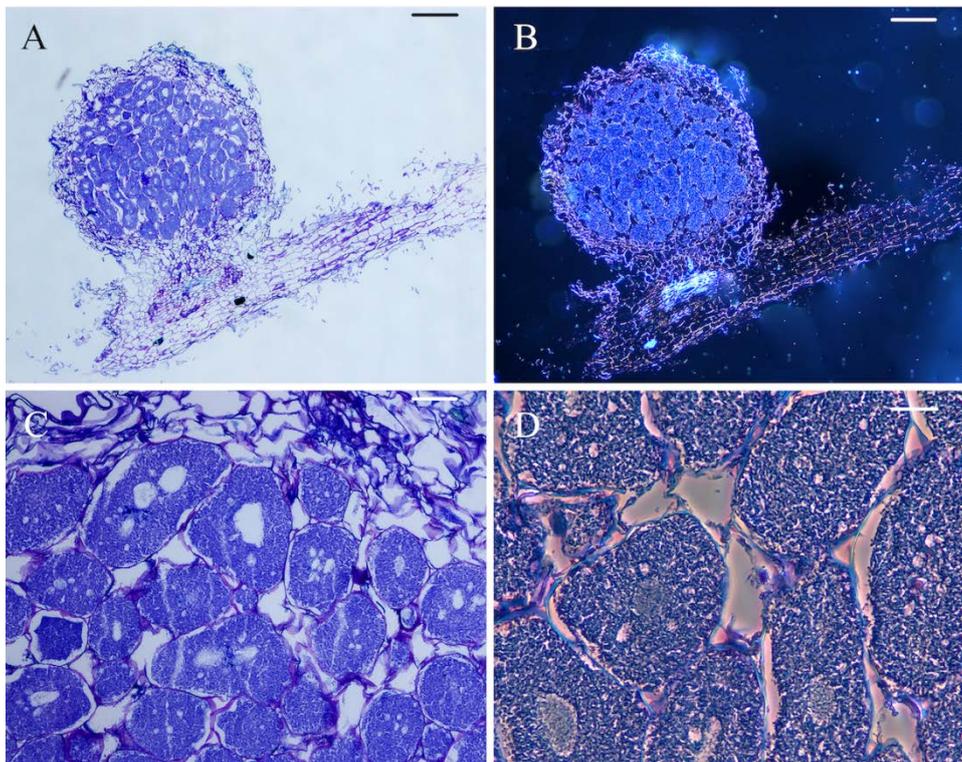


Figura 58. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC13N. Los nódulos presentan una buena

organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

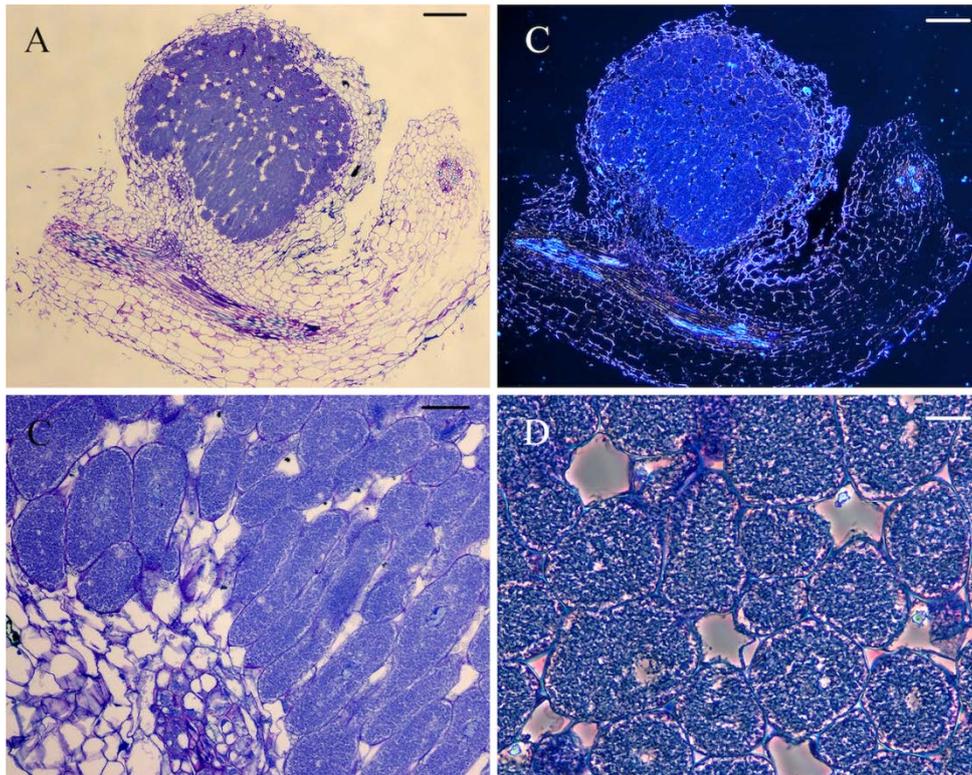


Figura 59. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC29N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

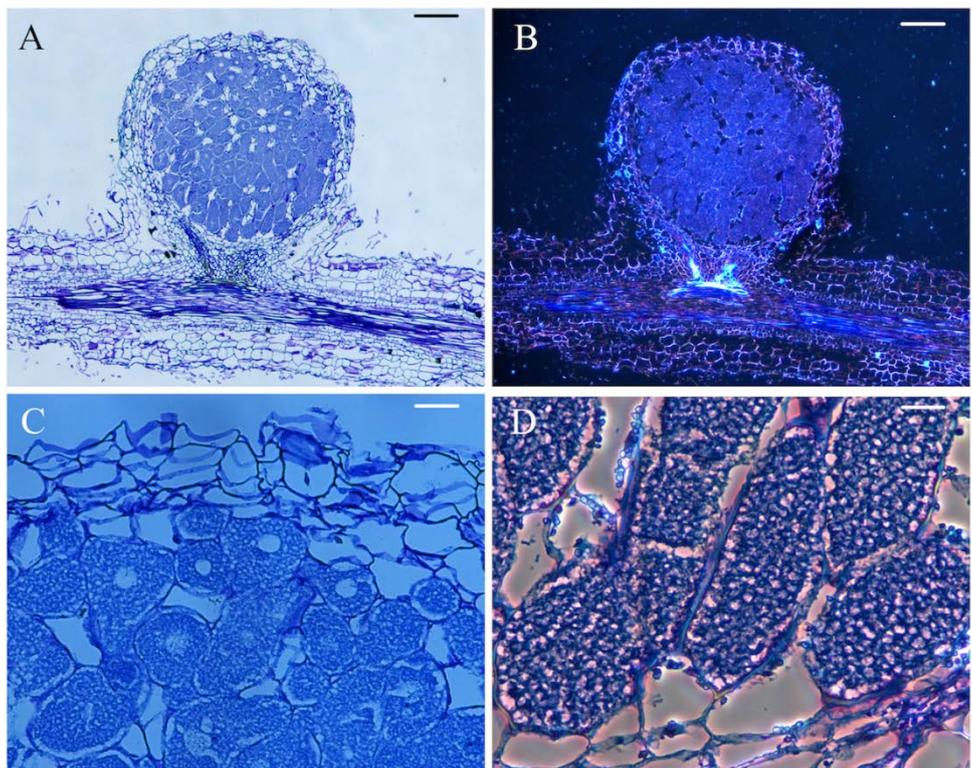


Figura 60. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC33N. Los nódulos presentan una buena

organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

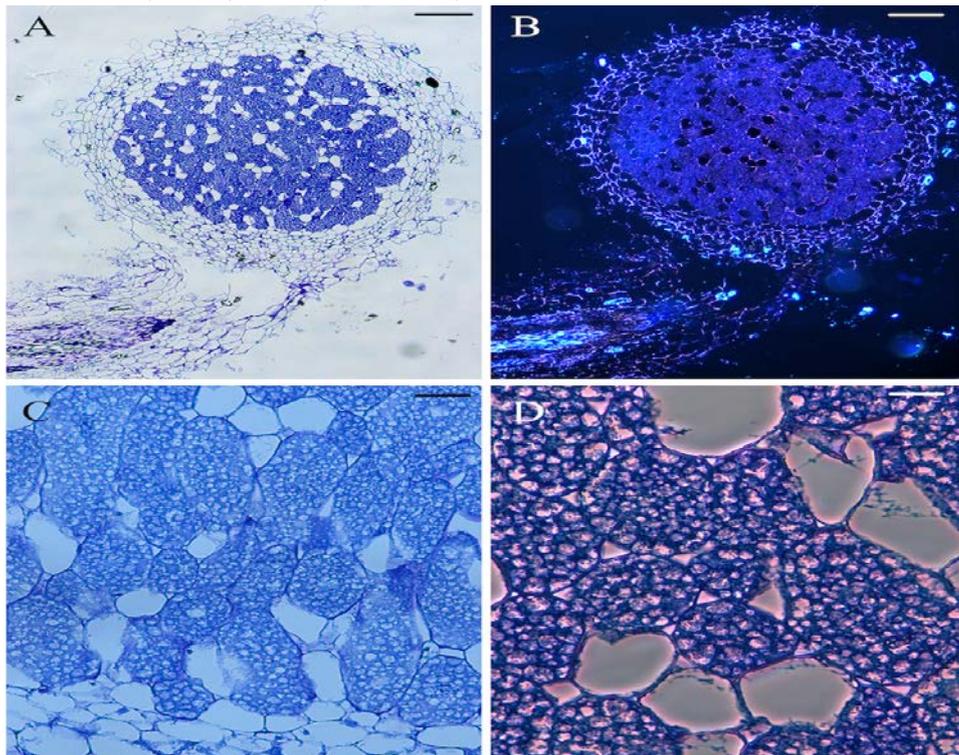


Figura 61. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC39N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

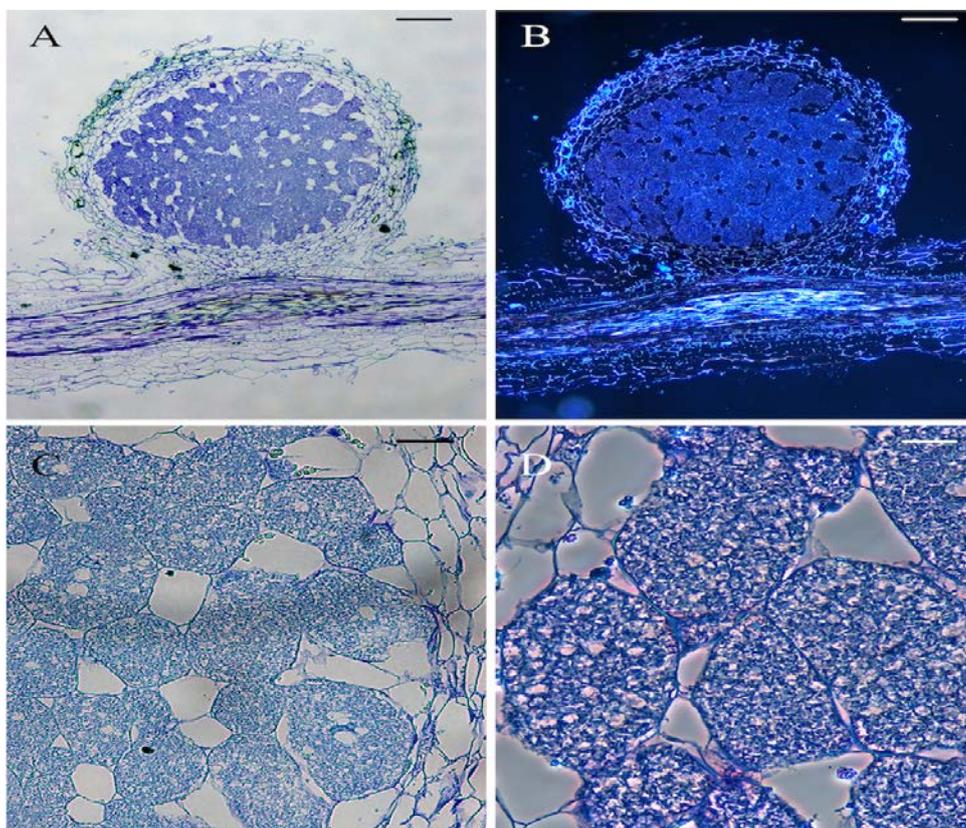


Figura 62. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC116N. Los nódulos presentan una buena

organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

En los nódulos correspondientes a las plantas inoculadas con las cepas CSLC03N, CSLC28N y CSLC38N, e identificadas como *M. jarvisii* apreciamos algunas diferencias respecto a lo visto hasta ahora (figuras 63-65). Observamos células invadidas, pero muchas de ellas no están delimitadas por paredes celulares, dispersándose los simbiosomas por el interior del nódulo. Además, también observamos bacterias dispersas en el interior de las células vacías, claramente visibles y a diferencia de los cortes nodulares correspondientes a los tratamientos anteriormente vistos, donde se observaron las células vacías sin resto aparente de ninguna bacteria.

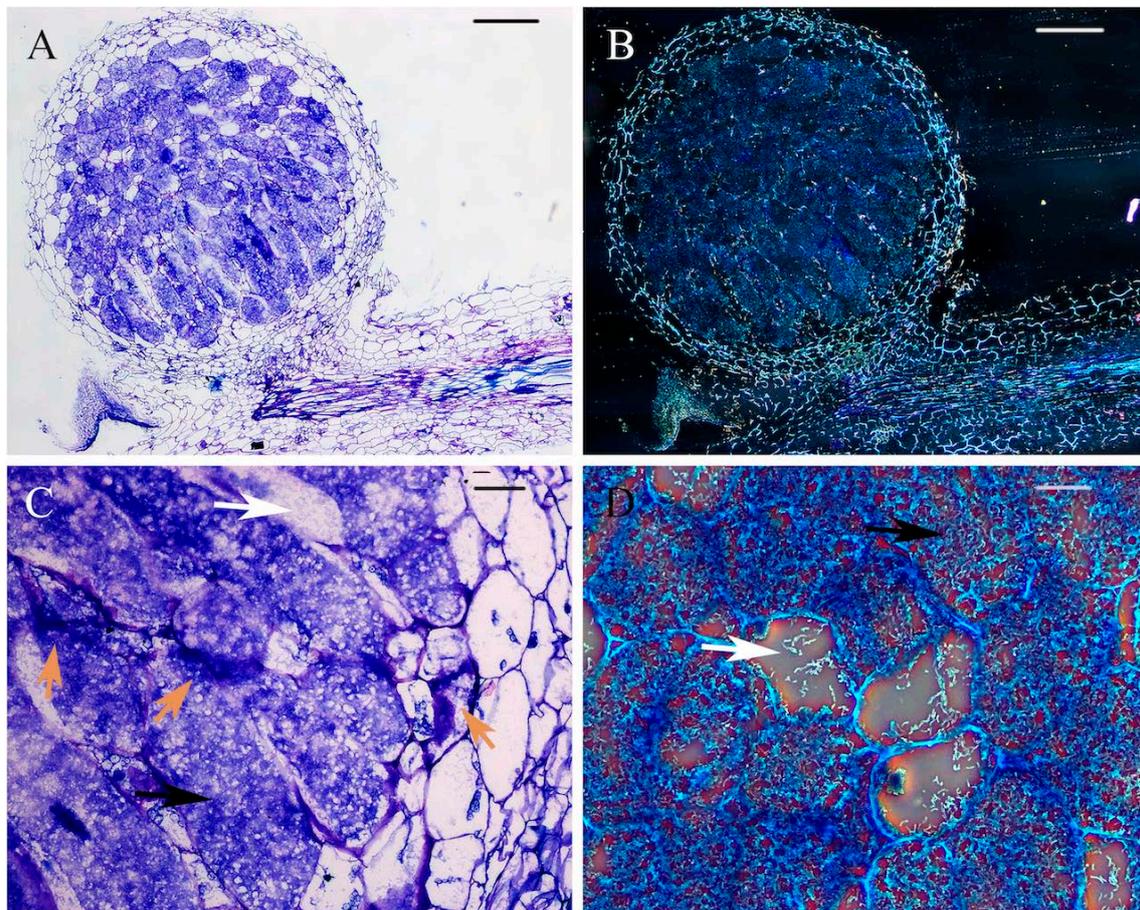


Figura 63. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC03N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC01N, pero con agrupaciones de bacterias en el interior de las células no ocupadas por simbiosomas, así como zonas de crecimiento en espacios intercelulares. Flecha negra: célula infectada; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: zona de crecimiento en espacios intercelulares. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

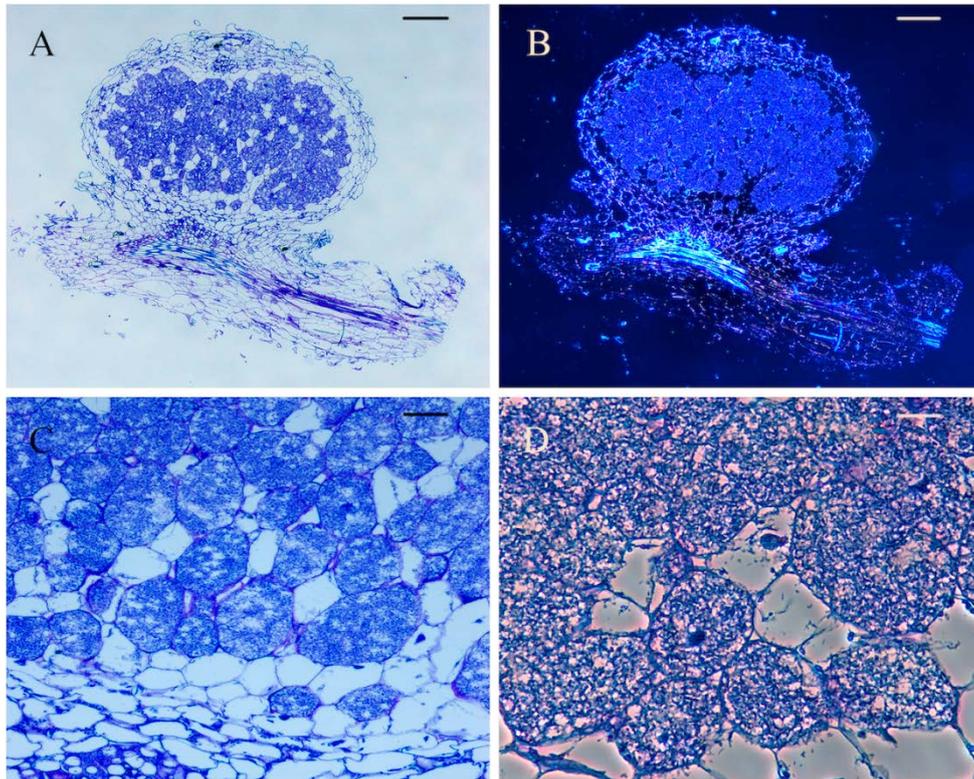


Figura 64. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC03N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

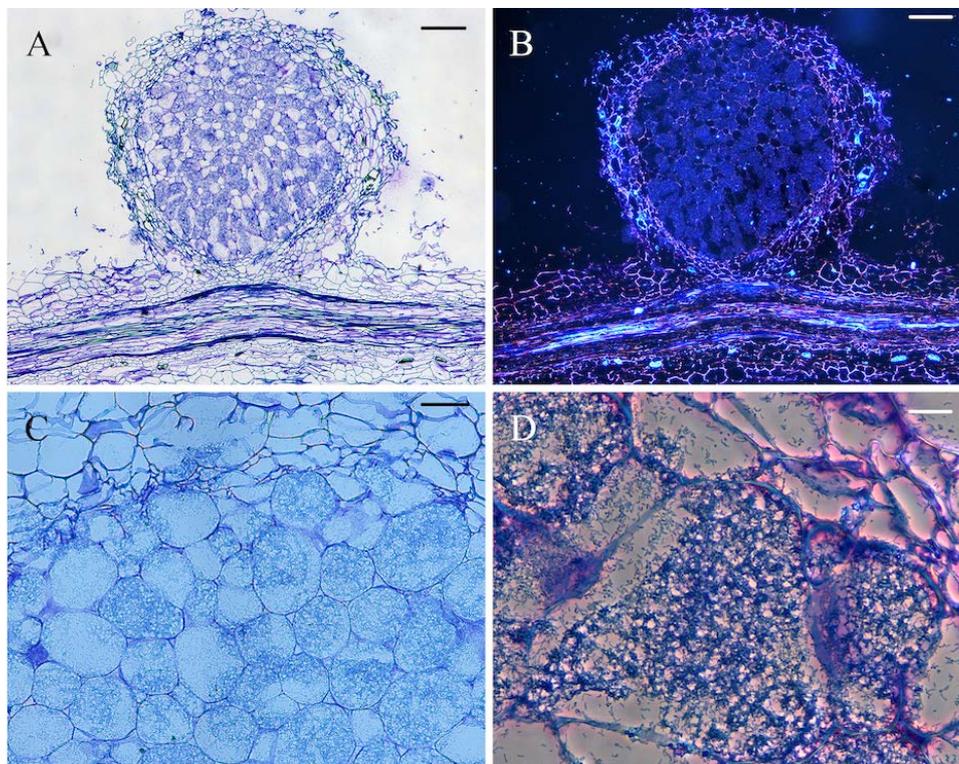


Figura 65. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. jarvisii* CSLC03N. En este caso vemos muchas más bacterias dispersas por el interior del nódulo. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

En cualquier caso lo que parece evidente es que en todas las inoculaciones realizadas, la nodulación se desarrolló de forma correcta, ya que no presenciamos estructuras raras o anormales en ningún caso. Además la ocupación o infección del interior del nódulo fue en rasgos generales muy buena, con pocas células sin invadir.

### **3. *Mesorhizobium* sp. CSLC22N, CSLC26N, CSLC35N y CSLC42N.**

En este grupo hemos comparado los resultados obtenidos con las plantas de *L. corniculatus* inoculados con las cepas *Mesorhizobium* sp. CSLC22N, *Mesorhizobium* sp. CSLC26N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Mesorhizobium* sp. CSLC42N con los resultados obtenidos, y ya plasmados en el apartado 1, con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> por su proximidad a dicha cepa (capítulo I).

#### **3.1. Cinética de nodulación.**

En este caso las cuatro cepas fueron capaces, al igual que las ya estudiadas, de volver a renodular su hospedador. Las plantas con mayor cantidad de nódulos a los 30 dpi fueron las inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, con 75 nódulos, 50 de los cuales eran efectivos, y solo por debajo de *M. jarvisii* CSLC28N (apartado 2.1). Las plantas de las que se obtuvo menor recuento de nódulos fueron las inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC22N. Por otro lado, encontramos que las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC42N, tuvieron un total de 36 nódulos de los cuales tan solo 8 eran efectivos, mostrando el típico color rosáceo (figura 66A).

Si observamos la cinética de nodulación (figura 66B), observamos que en rasgos generales todas siguen un incremento final hasta los 30 dpi. En esta ocasión también destaca nuevamente la cepa más noduladora *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, observando un incremento notable de la formación de nódulos en los tres últimos días. Además, destaca por encima de las demás desde los primeros días en los se comenzó a hacer recuento de nódulos. En cualquier caso, la nodulación de las plantas inoculadas con las 4 cepas sigue una cinética superior a la especie endosimbionte de *L. corniculatus* filogenéticamente más próxima *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup> a estas cepas.

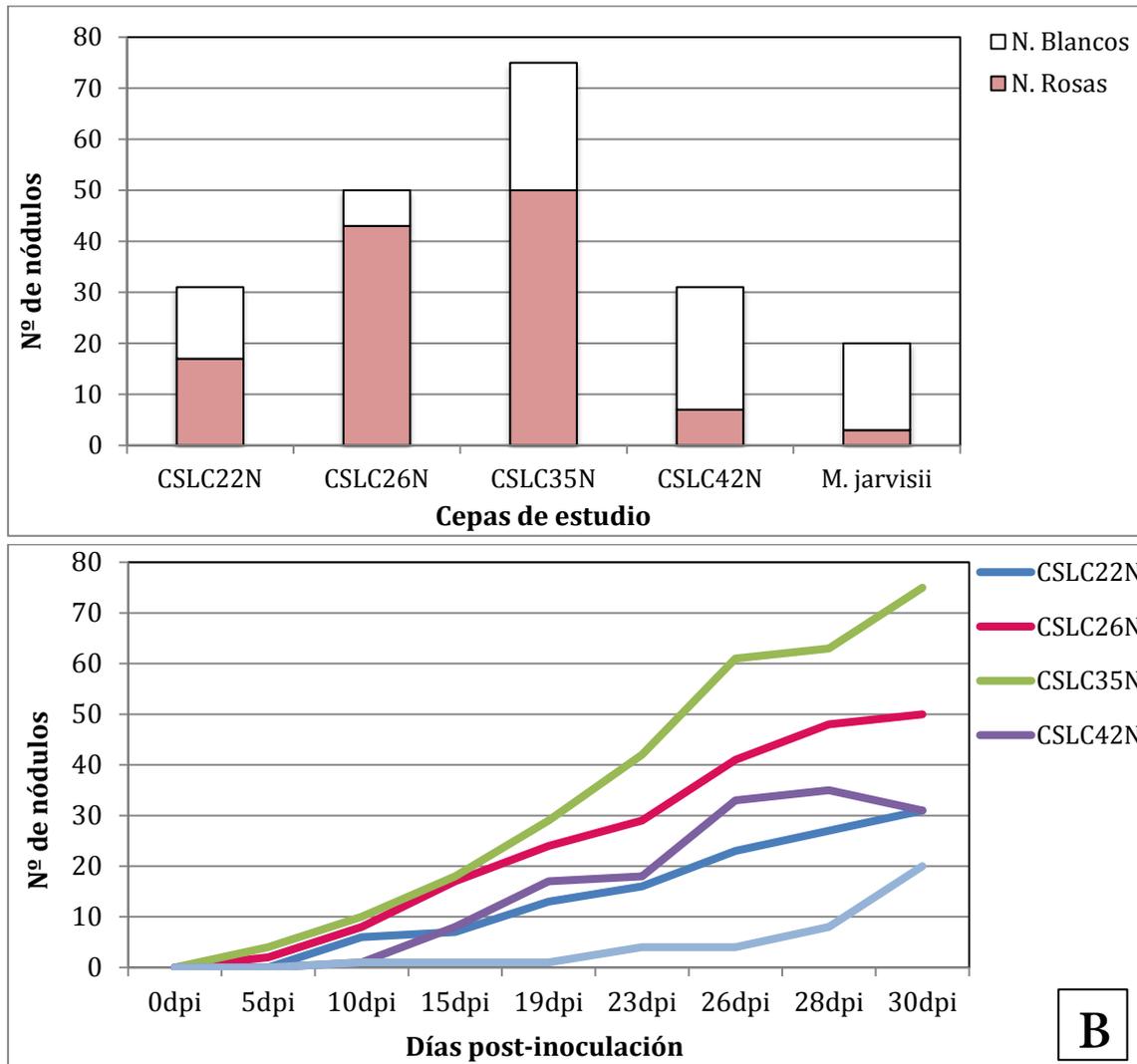


Figura 66. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con diferentes cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y en ausencia de Nitrógeno.

### 3.2. Morfología nodular.

Nuevamente observamos diferentes nódulos representativos obtenidos para cada uno de las 4 cepas con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800). En este caso los nódulos observados presentaron una morfología normal, determinada y rosácea (figura 67). Aunque también observamos nódulos inefectivos, de color blanquecino e inmaduros. El tamaño de los nódulos obtenidos en las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N es mayor, destacando entre los tres tratamientos y sobre todo por encima de los nódulos obtenidos al inocular las plantas con *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>.

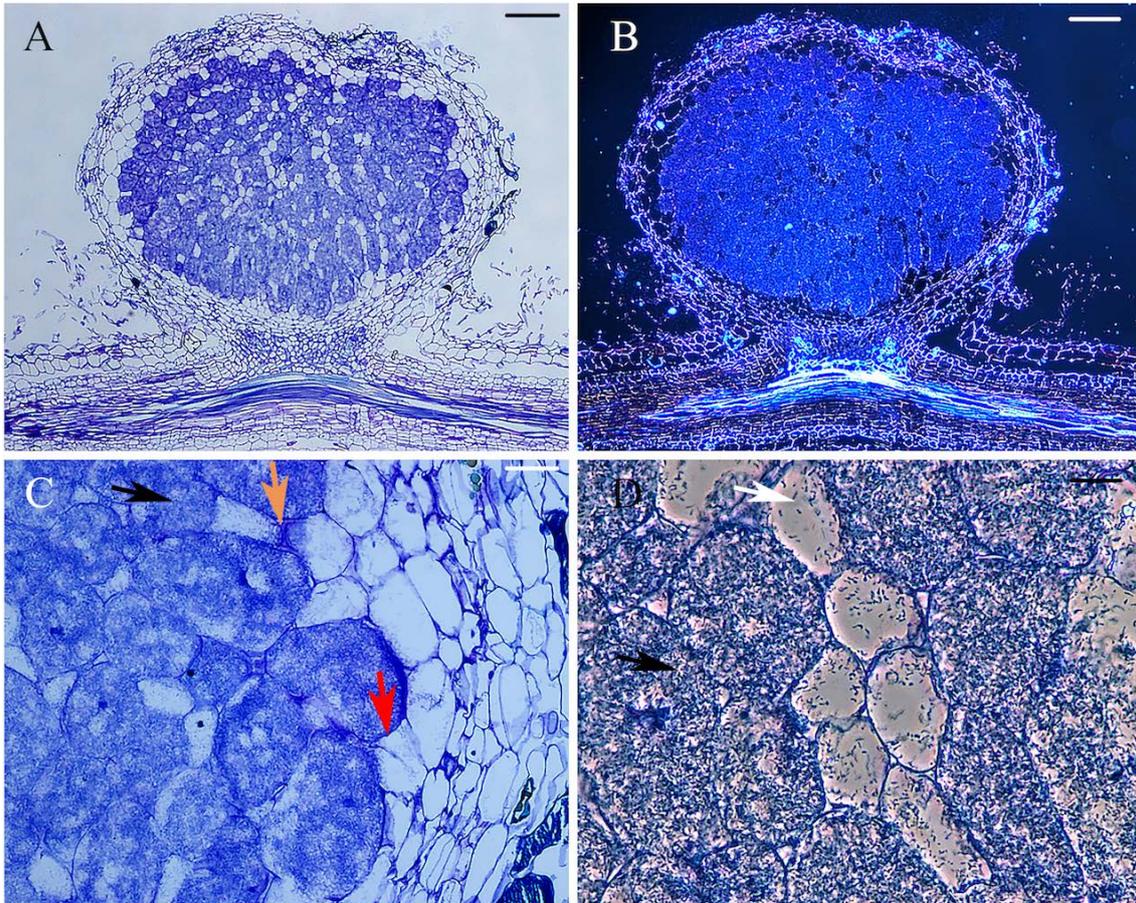


Figura 67. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con 4 cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium*. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea (A, C), como nódulos blancos inefectivos (B, D). *Mesorhizobium* sp. CSLC22N (A), *Mesorhizobium* sp. CSLC26N (B), *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (C) y *Mesorhizobium* sp. CSLC42N (D).

### 3.3. Histología nodular.

Se observaron los diferentes cortes histológicos de los nódulos de los diferentes ensayos llevados a cabo, como previamente se había descrito (apartados 1.3 y 2.3).

*Mesorhizobium* sp. CSLC22N (figura 69), *Mesorhizobium* sp. CSLC26N (figura 70) y *Mesorhizobium* sp. CSLC42N (figura 71) tuvieron una organización nodular interna similar a la vista en el apartado 2.3. Es decir, el interior del nódulo en cada caso estaba organizado, con pocas células sin invadir. En el caso de los nódulos de las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (figura 68) podemos distinguir algún canal de infección, así como bacterias dispersas por las células no invadidas. Observamos alguna zona de crecimiento en espacios intercelulares, pero en cualquier caso se mantiene la integridad del nódulo.



**Figura 68.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Flecha negra: célula invadida; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: zona de crecimiento en espacios intercelulares; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

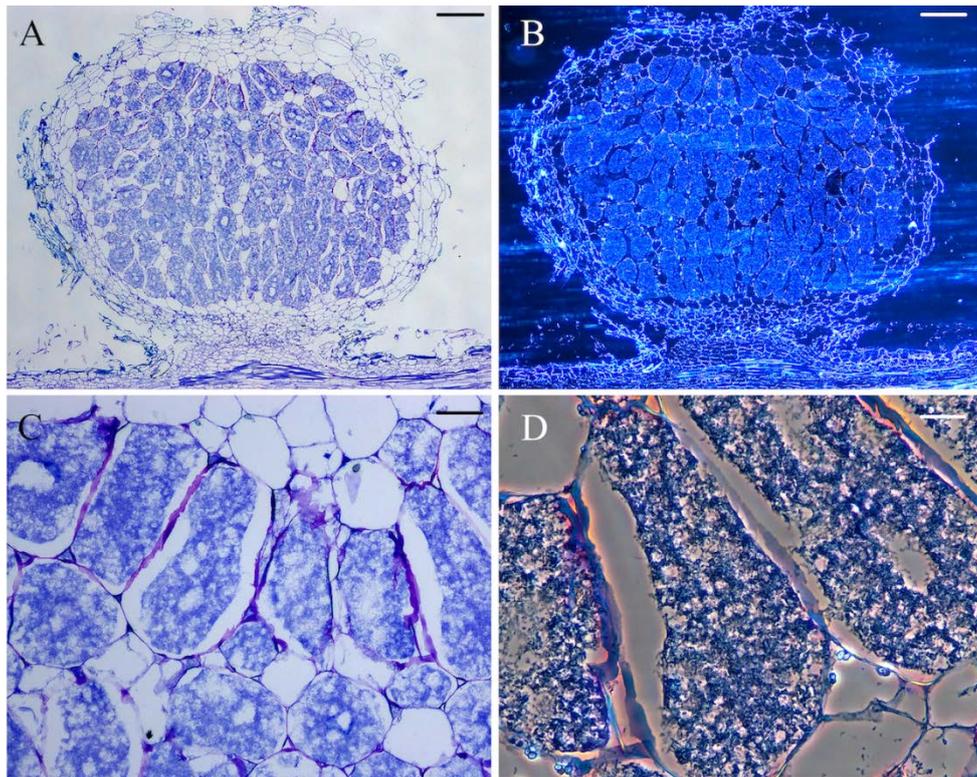


Figura 69. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC22N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a CSLC35N pero sin observar bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

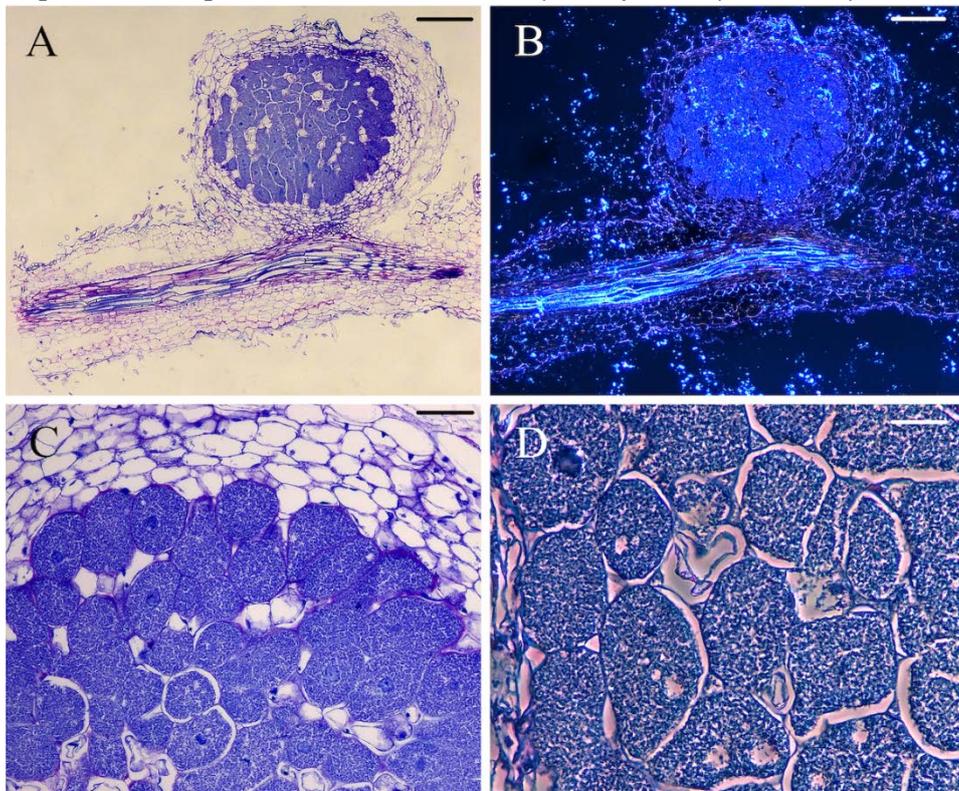


Figura 70. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC26N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a CSLC35N pero sin observar bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

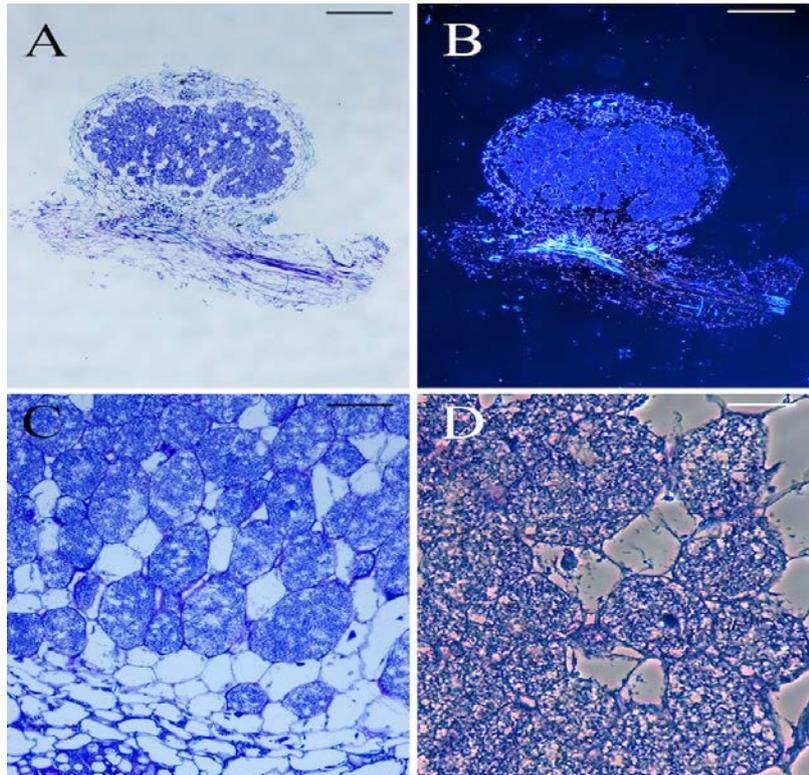


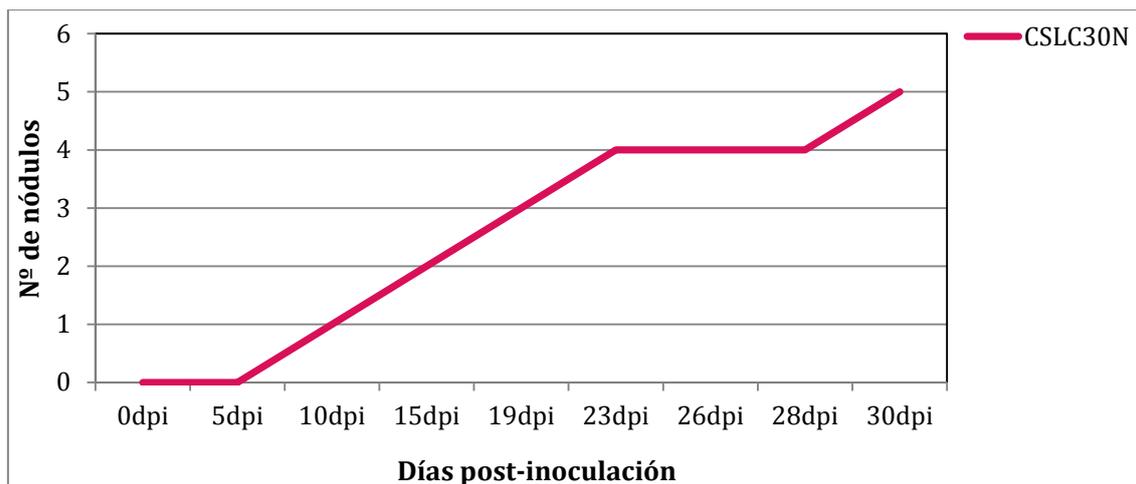
Figura 71. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC42N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a CSLC35N pero sin observar bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

#### 4. *Mesorhizobium* sp. CSLC30N.

##### 4.1. Cinética de nodulación.

*Mesorhizobium* sp. CSLC30N tan solo fue capaz de inducir 5 nódulos en un total de 15 plantas, de los cuales 3 fueron efectivos y 2 inefectivos.

Como es de esperar la cinética de nodulación (gráfica 7) es prácticamente estacionaria durante los 30 días que duró el ensayo. Hasta los 21 dpi tan solo fue capaz de inducir 4 nódulos, manteniéndose así hasta los 29 dpi. Esto hace que sea la cepa peor noduladora de entre todas las cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium* aisladas y estudiadas en este estudio.



Gráfica 7. Cinética de nodulación de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC30N y en ausencia de Nitrógeno.

#### 4.2. Morfología nodular.

A pesar de la deficiente nodulación de las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC30N, los nódulos formados tuvieron una morfología normal determinada, sin presencia de aberraciones. Los nódulos rosáceos efectivos tuvieron además un tamaño normal, proporcional al visto para anteriores ensayos. Eran por tanto nódulos totalmente funcionales y fijadores de Nitrógeno (figura 72).

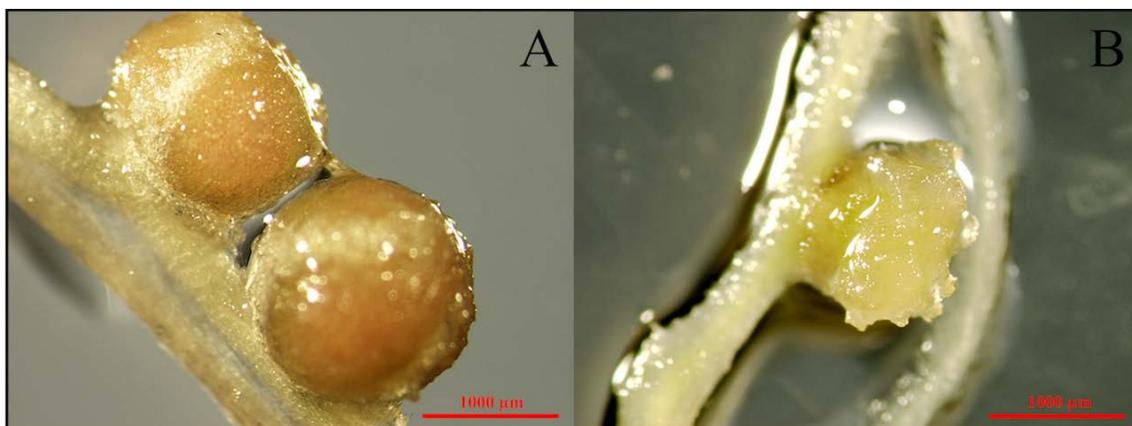
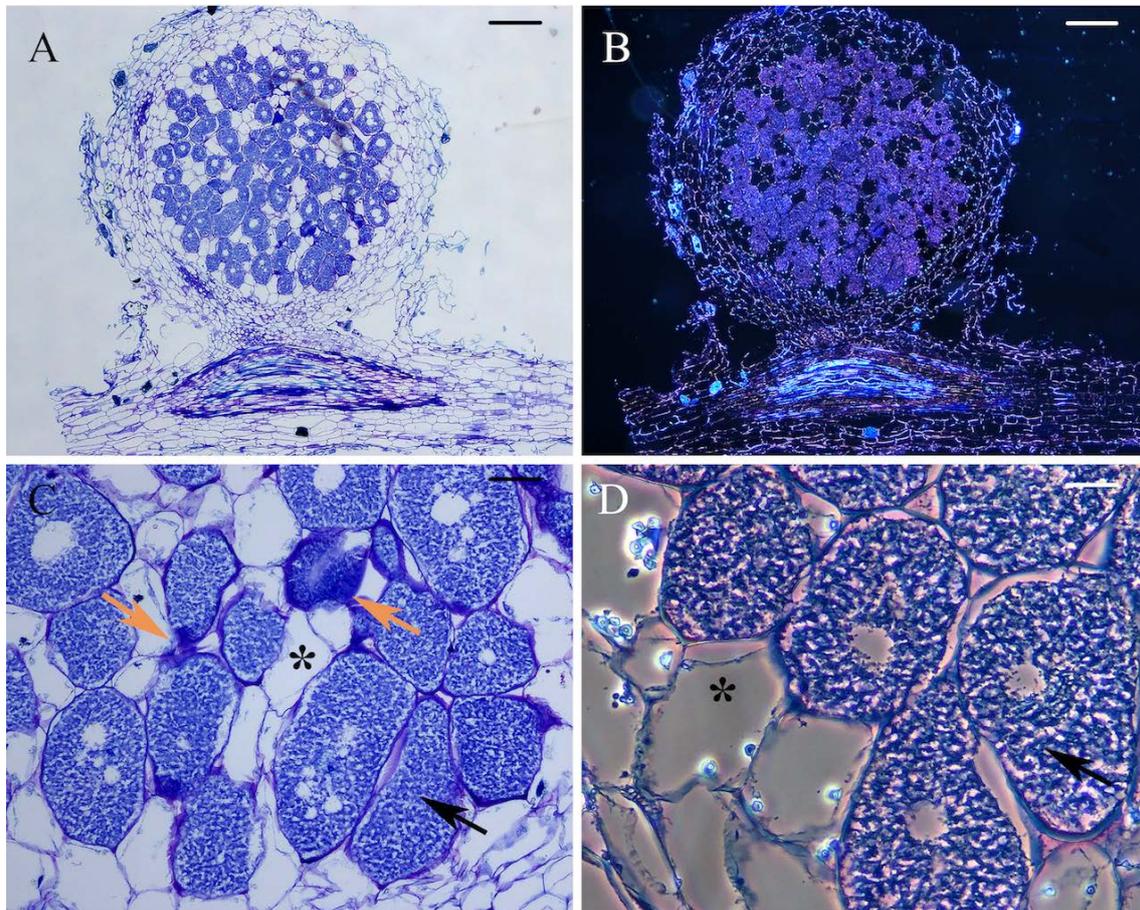


Figura 72. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con la cepa CSLC30N (A y B) identificada como *Mesorhizobium* sp. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea (A), como nódulos blancos inefectivos (B).

#### 4.3. Histología nodular.

Observando el interior los nódulos mediante los diferentes cortes histológicos (figura 73) observamos que el interior de los mismos está perfectamente organizado. Esta cepa es menos invasiva, presentando un mayor número de células sin invadir, vacías, respecto al resto de nódulos correspondiente a cada uno de los aislados vistos hasta

ahora, incluyendo las tres cepas tipo endosimbiontes *M. jarvisii* ATTC 33669<sup>T</sup>, *M. erdmanii* USDA 3471<sup>T</sup> y *M. loti* NZP 2213<sup>T</sup>.



**Figura 73.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC30N. Los nódulos presentan una buena organización interna, pero con una proporción elevada de células sin invadir. Se observan zonas de infección intercelular. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula no invadida; flecha naranja: zona de infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

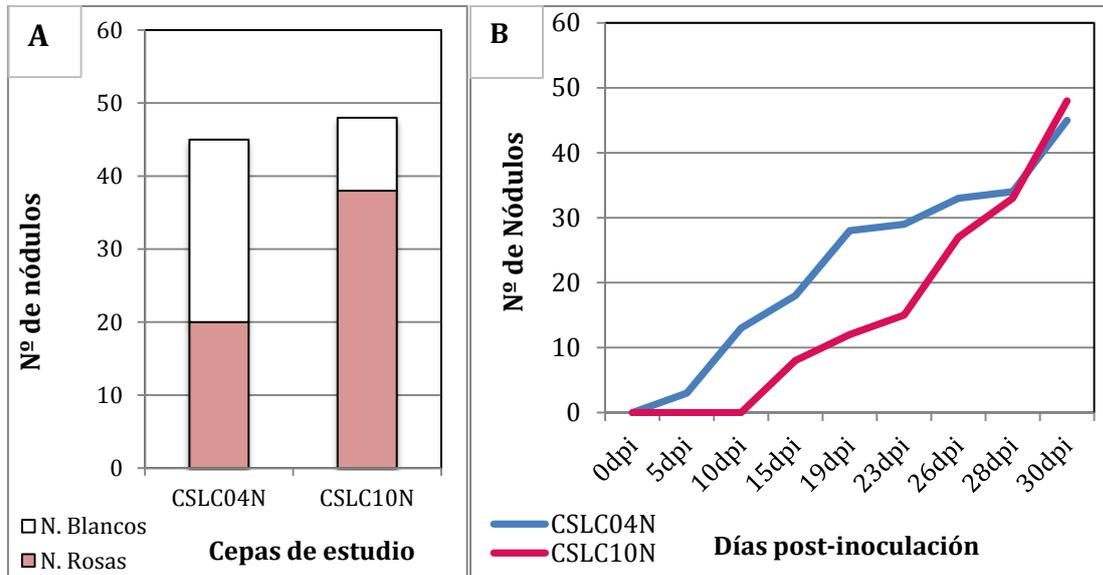
## 5. *Mesorhizobium caraganae* CSLC04N y CSLC10N.

### 5.1. Cinética de nodulación.

Las siguientes plantas en analizar fueron las inoculadas con las cepas CSLC04N y CLSC10N, identificadas como *M. caraganae*.

Hasta pasados los 10 dpi *M. caraganae* CSLC10N no induce formación de nódulos en las plantas de *L. corniculatus* (figura 74B). Sin embargo, a partir de los 10 dpi tiene una cinética de nodulación lineal ascendente, hasta el final del ensayo con un total de 48 nódulos inducidos, de los cuales 38 eran efectivos (figura 74A). *M. caraganae* CSLC04N induce la formación de nódulos desde los primeros días tras su inoculación y aunque al final presenta 45 nódulos totales, mantiene la cinética de nodulación por

encima de la cepa CSLC10N. Si bien es cierto que 25 de los mismos eran inefectivos y los 20 restantes efectivos (figura 74A).



**Figura 74.** Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con *M. caraganae* CSLC04N y CSLC10N y en ausencia de Nitrógeno.

## 5.2. Morfología nodular.

Los nódulos correspondientes a estas dos cepas mostraron una morfología redondeada, característica de los nódulos determinados (figura 75A). Los nódulos que fueron seccionados por la mitad presentaron una coloración rosácea típica de los nódulos efectivos que están fijando nitrógeno en su interior (figura 75B). Como en los ensayos anteriores, también observamos nódulos blanquecinos. Estos nódulos eran redondeados y de pequeño tamaño, inmaduros, ya que presentaban poco tiempo de formación.



**Figura 75.** Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con las diferentes cepas identificadas como *M. caraganae*. En la figura vemos nódulos con una coloración rosácea característica de un nódulo fijador de Nitrógeno totalmente funcional. CSLC04N (A) y CSLC10N (B).

### 5.3. Histología nodular.

En la figura 76 observamos cortes histológicos correspondientes a CSLC04N *M. caraganae*, con una estructura interna algo desorganizada. Observamos bastantes células vacías, así como degradación de paredes celulares. Aun así, no vemos bacterias dispersas, sino que se encuentran agregadas, bien en los espacios intercelulares, bien en el interior de las células diferenciadas en simbiosomas.

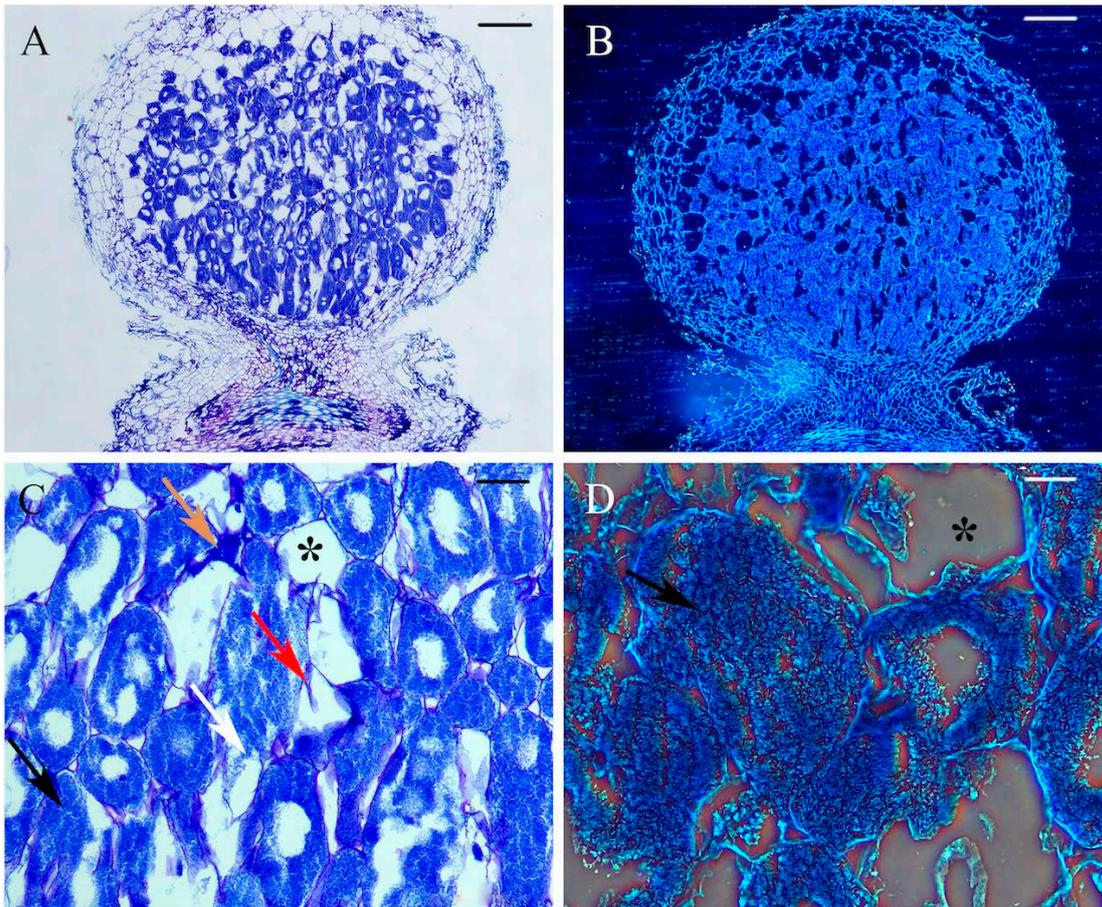


Figura 76. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. caraganae* CSLC04N. Los nódulos presentan una estructura interna no muy definidas. Observamos zonas de infección intercelular, bacterias dispersas entre las células y canales de infección que finalizan en células vacías. Flecha negra: célula invadida; asterisco: células no invadidas; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: zonas de infección intercelular; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

En cambio, en la figura 77 observamos que los nódulos inducidos por la cepa *M. caraganae* CSLC10N tienen una estructura interna bien organizada. Las células están perfectamente definidas, conteniendo los simbiosomas en su interior. Observamos zonas de infección en espacios intercelulares, característica en común con nódulos inducidos por la cepa CSLC04N. También encontramos en común con lo observado en la figura 76 que hay algunas zonas con degradación de las paredes vegetales y bacterias ocupando espacios intercelulares, pero no observamos bacterias dispersas por el nódulo.

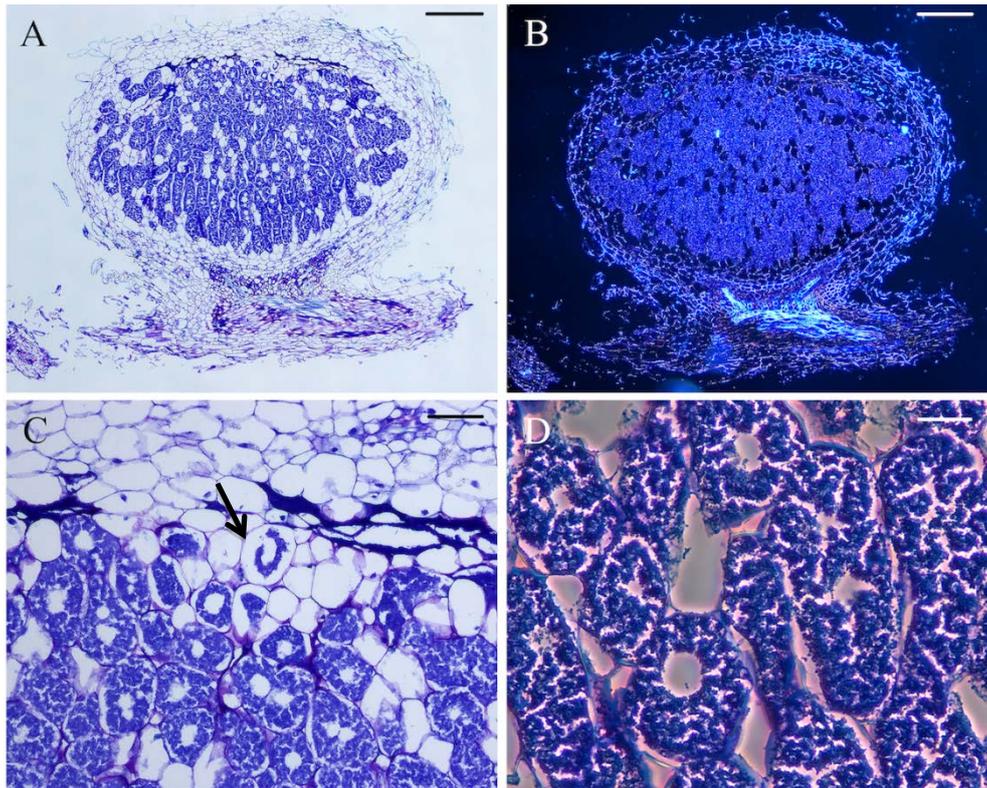


Figura 77. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. caraganae* CSLC10N. Nódulos organizados con buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

## 6. *Mesorhizobium* sp CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N.

### 6.1. Cinética de nodulación.

En este linaje nos encontramos el siguiente grupo de cepas: CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N (capítulo I). Nuevamente son capaces de nodular su planta hospedadora, al igual que las cepas vistas hasta ahora. Como observamos en la figura 78A, las cepas CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N prácticamente inducen la misma cantidad de nódulos en las plantas de *L. corniculatus*. Hay que señalar que los 30 nódulos que fue capaz de inducir la cepa CSLC32N eran efectivos. Sin embargo, la cepa más eficiente de este grupo fue CSLC09N induciendo un total de 64 nódulos en las 15 plantas donde fue inoculada. 54 de los 64 nódulos fueron efectivos, por lo que el porcentaje de efectividad, en rasgos generales, es bastante alto. Nuevamente las cepas CSLC14N, CSLC27N y CSLC84), siendo prácticamente la misma hasta el final del ensayo. Por encima de ellas nuevamente destaca la cepa CSLC09N, con una cinética exponencialmente positiva hasta los 30 dpi (figura 78).

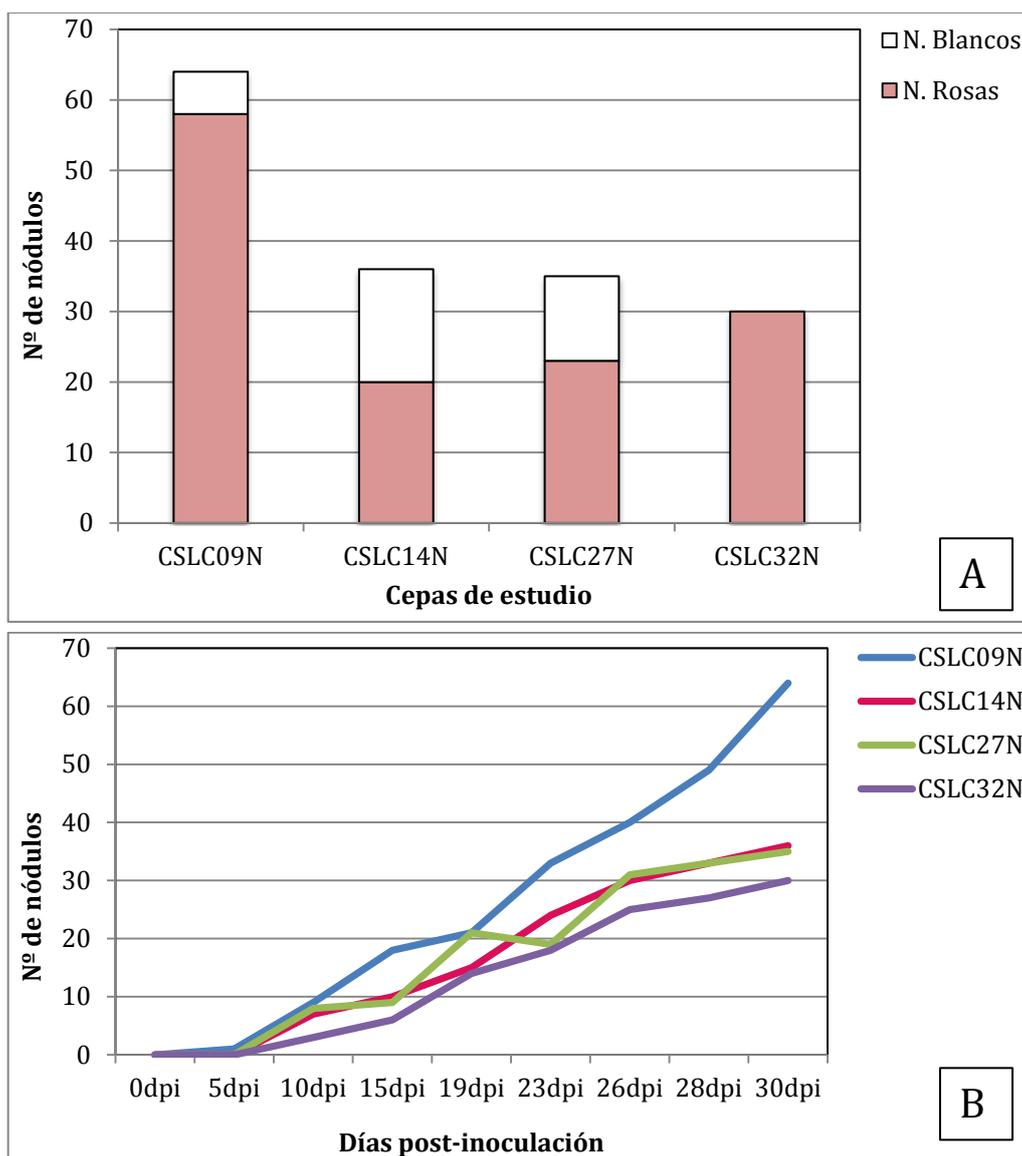


Figura 78. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con diferentes cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y en ausencia de Nitrógeno.

## 6.2. Morfología nodular.

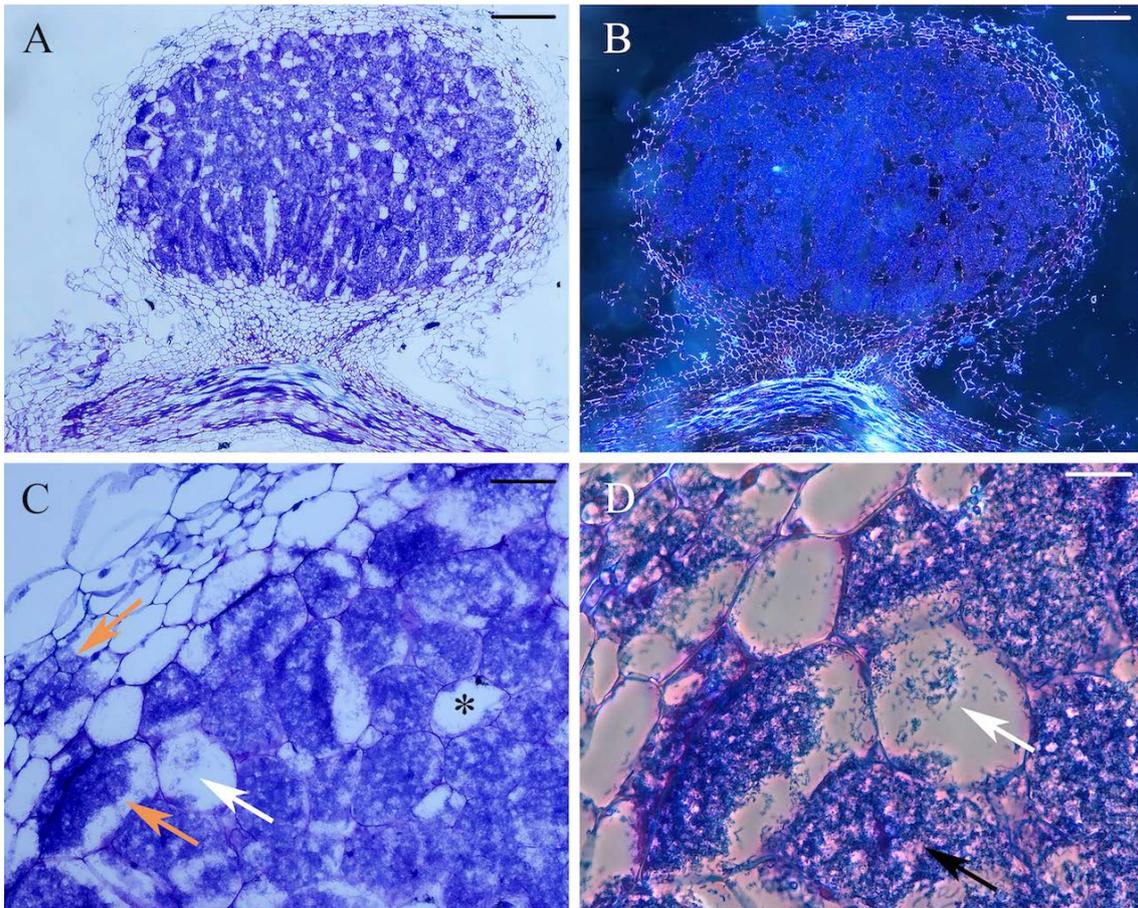
Los nódulos presentan una morfología normal, con la característica forma determinada. Tanto en los nódulos funcionales, distinguibles por la típica coloración rosácea, como en los no efectivos, no se observa rastro alguno de anomalías (figura 79).



Figura 79. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con las diferentes cepas identificadas como *Mesorhizobium* sp. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea, como nódulos blancos inefectivos. CSLC09N (A) y CSLC14N (B), CSLC27N (C), y CSLC32N (D).

### 6.3. Histología nodular.

Al observar los distintos cortes histológicos de los nódulos representativos de las plantas inoculadas con estas cuatro cepas, vemos una buena organización nodular interna (figuras 80-83). Sin embargo, a pesar de eso, observamos degradación de las paredes celulares con células dispersas por las células vacías y agrupaciones de otras entre los espacios intercelulares en los nódulos inducidos por *Mesorhizobium* sp. CSLC09N (figura 80). Además, observamos abundantes células dispersas en espacios intercelulares. Hay que señalar que en los cuatro casos los nódulos inducidos tienen un alto porcentaje de efectividad, con pocas células sin invadir.



**Figura 80.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC09N. Se ha producido la ruptura de paredes celulares de las células invadidas, y como consecuencia aparecen bacteroides en células vacías o no invadidas. Además también observamos zonas de infección intercelular y bacterias dispersas en el interior de células no invadidas. Flecha negra: célula invadida; flecha blanca: bacterias y bacteroides dispersos; flecha naranja: zonas de infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

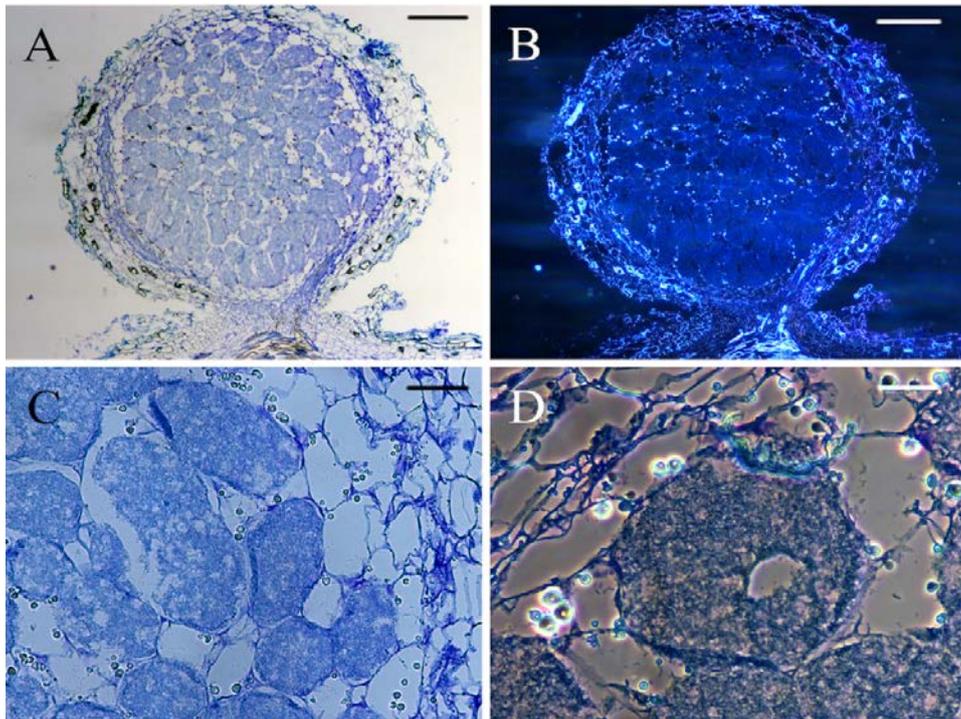


Figura 81. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC14N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC09N, pero sin bacterias dispersas ni degradación de paredes celulares. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

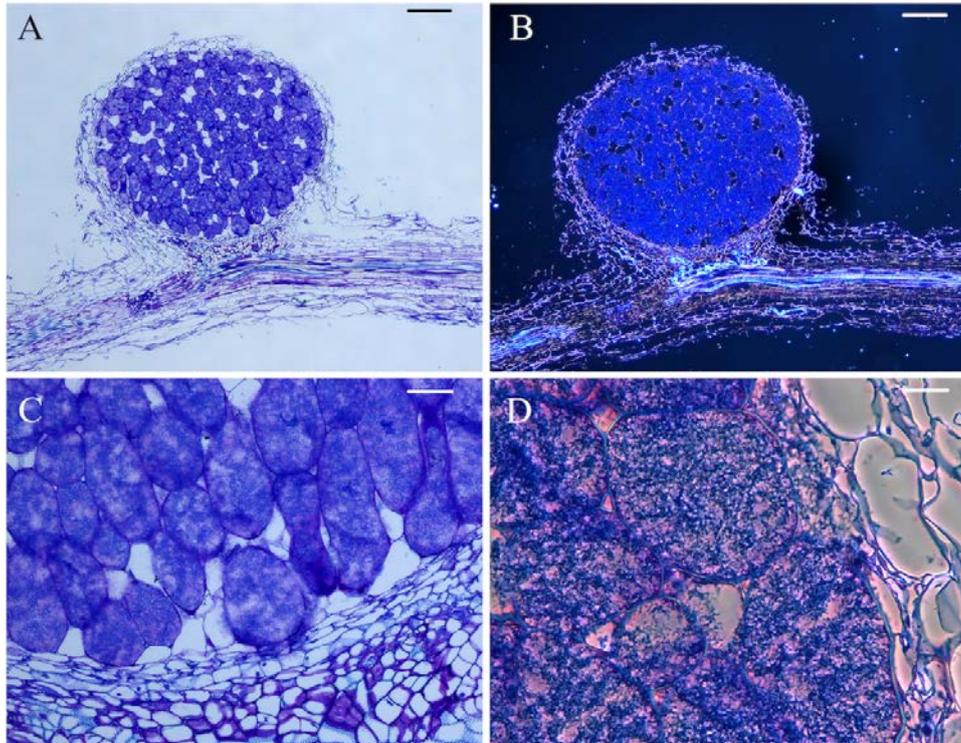


Figura 82. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC27N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC09N, pero sin degradación de paredes celulares. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

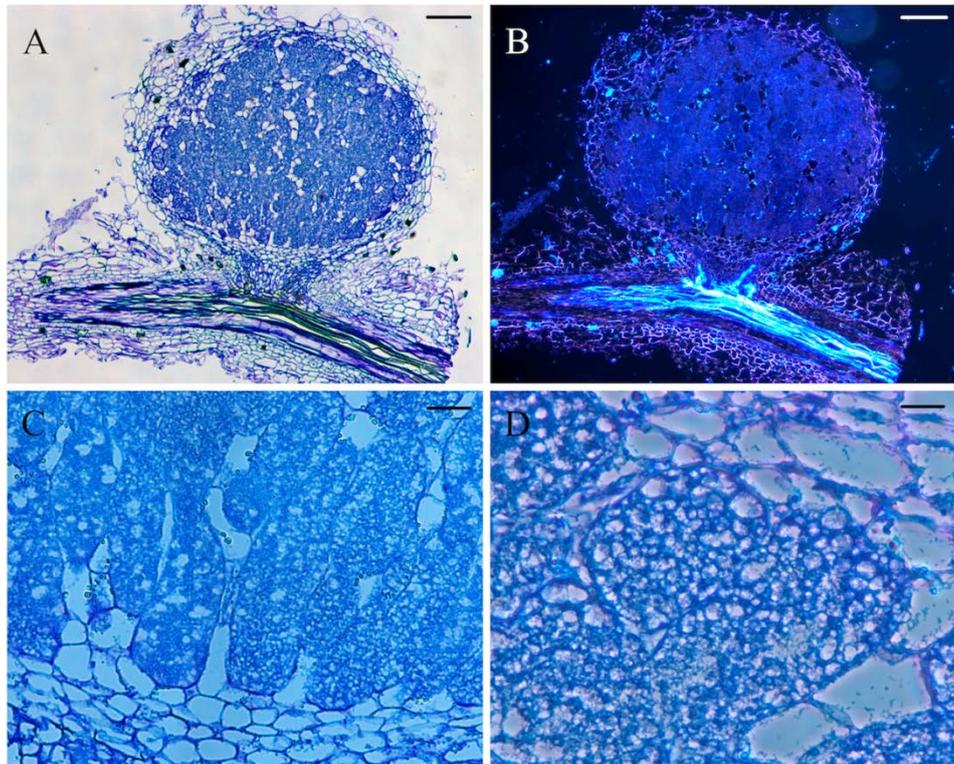


Figura 83. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC32N. Nódulos organizados con buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC09N, pero sin bacterias dispersas ni degradación de paredes celulares. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

## 7. *Mesorhizobium helmanticense* CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N.

Los siguientes resultados en analizar fueron los obtenidos para las plantas inoculadas con la nueva especie de *Mesorhizobium* identificada, *M. helmanticense* (Marcos-García et al. 2015; Marcos-García et al. 2017) a la que pertenecen las cepas CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N. Estas cepas fueron únicamente comparadas entre sí.

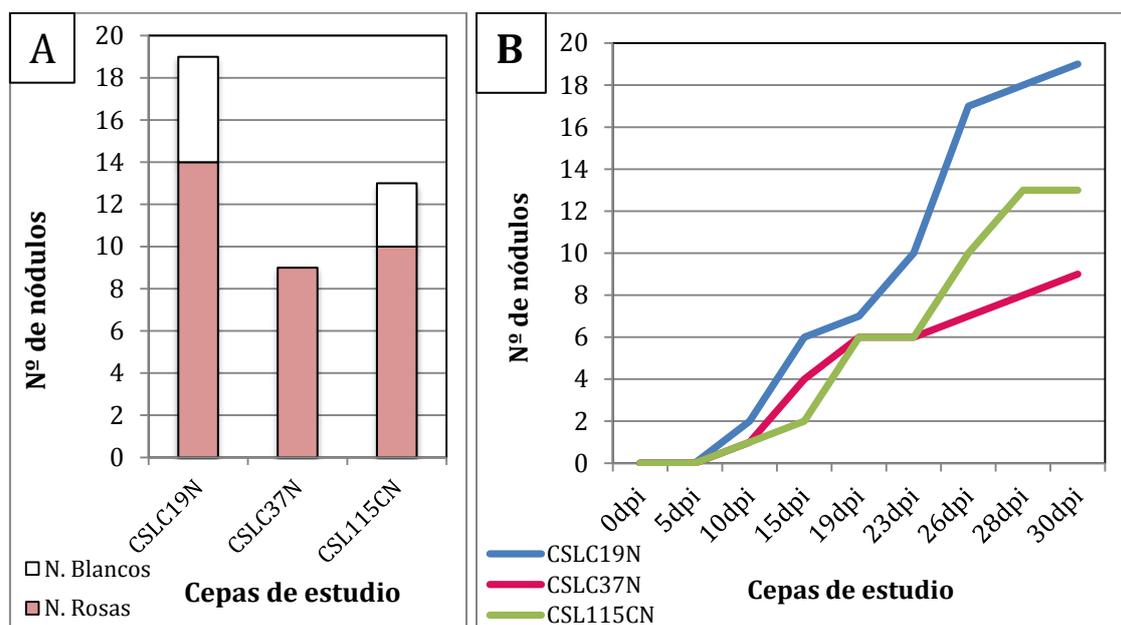
### 7.1. Cinética de nodulación.

En esta ocasión las 3 cepas identificadas dentro de una nueva especie del género *Mesorhizobium*, también fueron capaces de volver a nodular su hospedador.

Las tres cepas presentan un comportamiento similar, relativo al número total de nódulos formados, observando que no consiguen inducir un número elevado de ellos, si lo comparamos con otros grupos de cepas anteriormente analizados en los apartados anteriores. La cepa *M. helmanticense* CSLC19N induce un número total de 19 nódulos,

de los cuales 14 fueron efectivos. La cepa CSLC115N induce 13 nódulos, de los cuales 10 fueron efectivos. Sin embargo, la cepa CSLC37N solamente consigue inducir 9 nódulos, todos ellos efectivos. Como observamos a lo largo de los diferentes resultados obtenidos, se observa homogeneidad entre las 3 cepas pertenecientes a esta nueva especie identificada dentro del género *Mesorhizobium*.

Si atendemos ahora a la cinética de nodulación (figura 84B), observamos que en rasgos generales todas siguen una cinética lineal hasta el final del ensayo. Sin embargo, esta cinética es estacionaria, manteniéndose prácticamente el mismo número de nódulos hasta los 23dpi.



**Figura 84.** Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las diferentes cepas identificadas como *M. helmanticense* y en ausencia de Nitrógeno.

## 7.2. Morfología nodular.

Los nódulos observados en las plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las distintas cepas identificadas como *M. helmanticense* son determinados, sin rasgo alguno de formas extrañas. Encontramos tanto nódulos determinados rosáceos, como indeterminados blanquecinos (figura 85). Los nódulos rosáceos son indicativos de que se están llevando a cabo una simbiosis efectiva fijadora de nitrógeno en su interior.

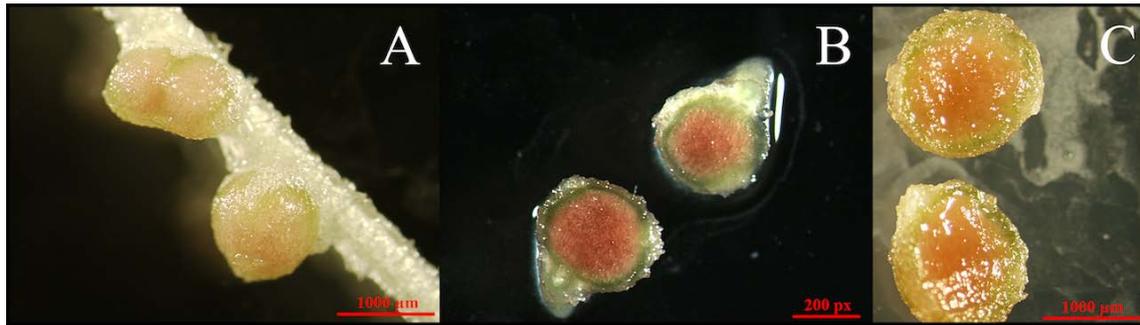


Figura 85. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculados con las diferentes cepas identificadas como *M. helmanticense*. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos funcionales con la típica coloración rosácea, como nódulos blancos inefectivos. CSLC37N (A), CSLC19N (B), CSLC115N (C), CSLC23N (D) y CSLC08N (E).

### 7.3. Histología nodular.

Para tratar de determinar las posibles diferencias existentes en cuanto a la organización interna de los nódulos, se observaron los cortes histológicos de los nódulos correspondientes a cada uno de los tratamientos a cabo, tal y como previamente se ha descrito (apartados 1.3). El interior de los nódulos formados por cada una de las cepas estaba perfectamente organizado, observando los típicos simbiosomas. En esta ocasión tampoco observamos diferencias entre las diferentes cepas. Los nódulos desarrollados por *M. helmanticense* CSLC19N (figura 86), CSLC37N (figura 87) y CSLC115N (figura 88) tienen bastantes células sin invadir, vacías, sin rastro de simbiosomas o bacterias dispersas.

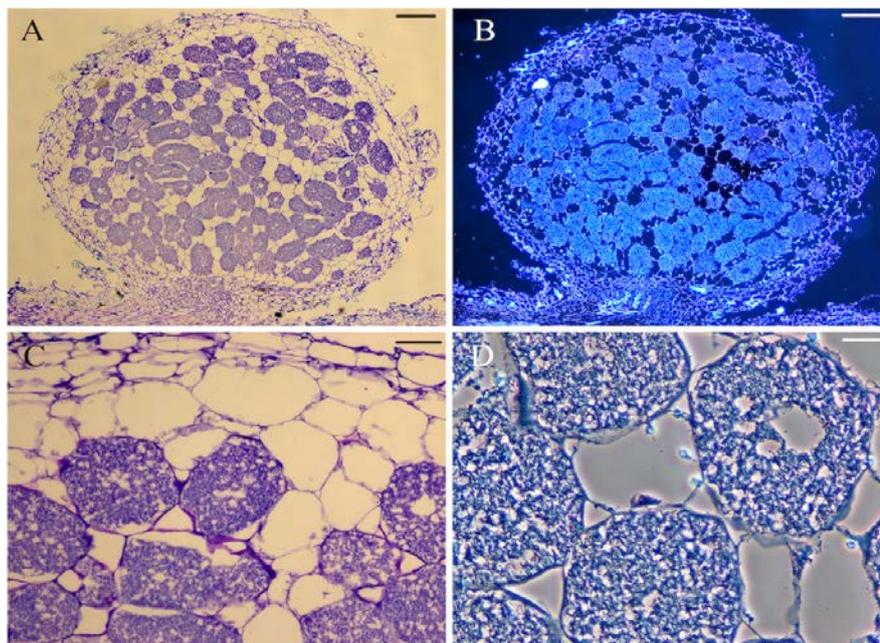


Figura 86. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. helmanticense* CSLC19N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. helmanticense* CSLC08N. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

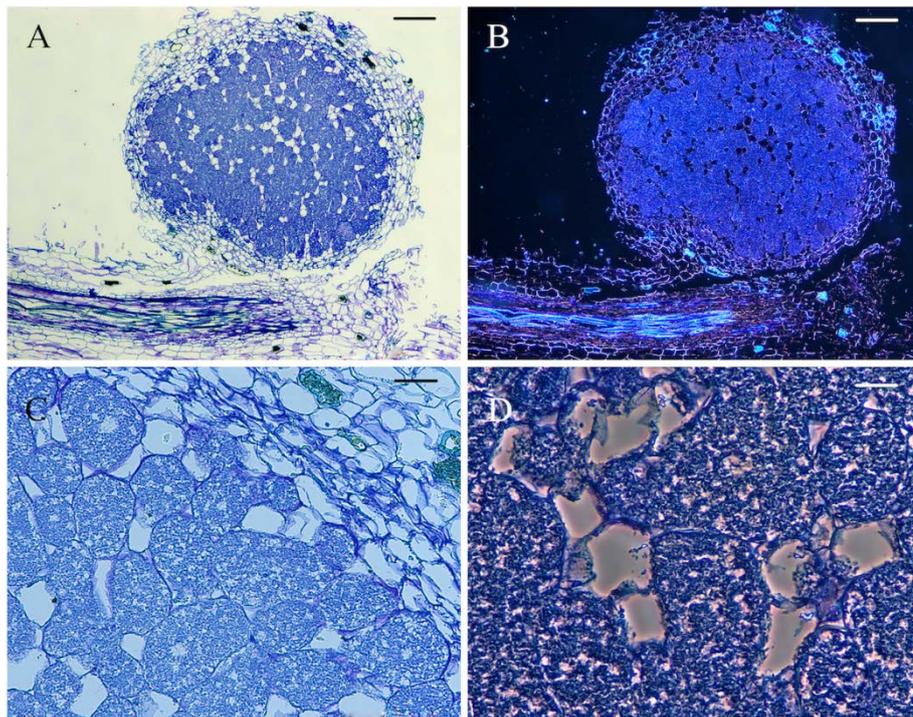


Figura 87. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. helmanticense* CSLC37N, similar a *M. helmanticense* CSLC08N pero con mayor proporción de células invadidas. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

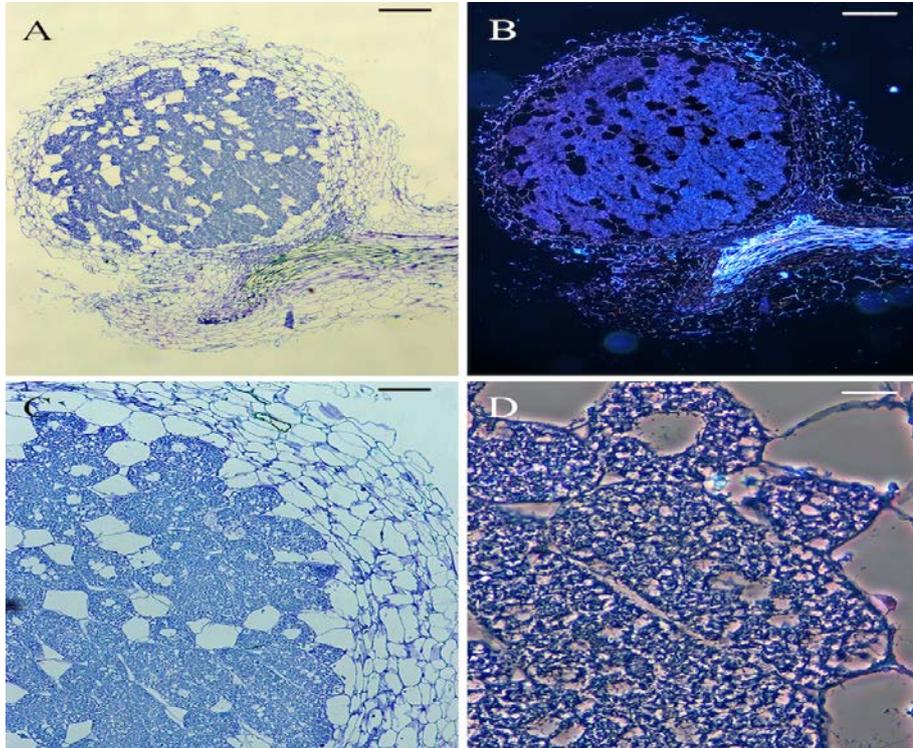


Figura 88. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. helmanticense* CSLC115N, similar a *M. helmanticense* CSLC08N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

## **8. *Mesorhizobium* sp. CSLC05N, CSLC06N, CSLC07N, CSLC15N, CSLC17N, CSLC18N, CSLC24N, CSLC31N y CSLC40N.**

Las siguientes 9 cepas las analizamos en conjunto porque fueron filogenéticamente próximas a *M. helmanticense*, como ya vimos en el Capítulo I.

### **8.1. Cinética de nodulación.**

En la figura 89B vemos que 7 de las nueve cepas siguen una cinética de nodulación prácticamente similar. La cepa CSLC17N hasta pasados 17 dpi prácticamente no induce la formación de nódulos en las plantas, y tan solo consigue inducir 14 nódulos contados a los 30 dpi. Muy similar al número de nódulos inducidos por la cepa CSLC31N a los 30 dpi, con la diferencia de que la cinética de nodulación que presentó esta cepa es más estacionaria durante los días que duró el ensayo.

Por otro lado, observando el número total de nódulos que las cepas CSLC06N, CSLC15N, CSLC18N y CSLC24N son capaces de inducir, vemos que existe una diferencia mínima de 5 nódulos entre ellas. Podríamos decir por tanto que tienen un comportamiento muy similar. Las cepas intermedias entre estos dos grupos, CSLC05N, CSLC07N y CSLC40N presentan un total de 27, 31 y 34 nódulos inducidos, respectivamente, hasta los 30 dpi.

Las cepas CSLC17N y CSLC31N son las dos que presentan una situación similar a la vista para las cepas de *M. helmanticense*, respecto al número de nódulos así como de la cinética de nodulación, que es también estacionaria.

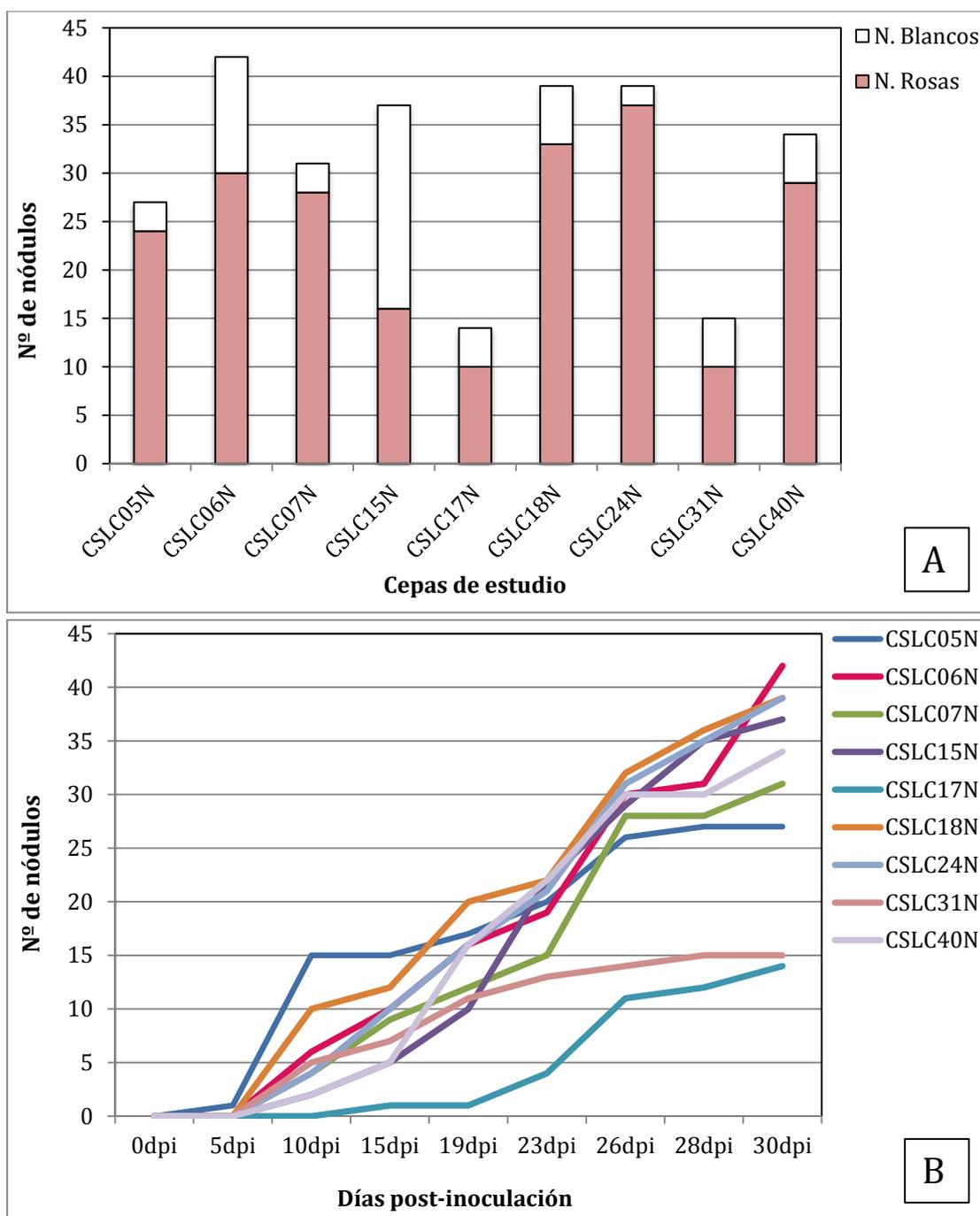
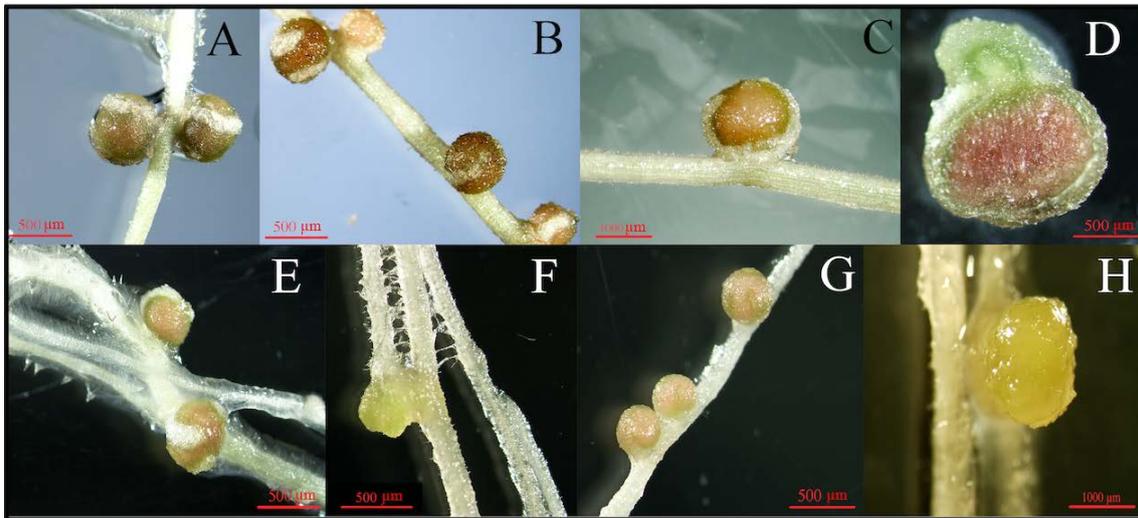


Figura 89. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con diferentes cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y en ausencia de Nitrógeno.

## 8.2. Morfología nodular.

Observamos nuevamente la típica forma redondeada característica de los nódulos determinados de *L. corniculatus*. De esta manera volvimos a comprobar que las cepas aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus* son capaces de volver a nodular su planta hospedadora, produciendo en sus raíces una gran cantidad de nódulos

efectivos. Los nódulos inefectivos que observamos no son aberrantes; son nódulos inmaduros y pequeños (figura 90).



**Figura 90.** Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con las diferentes cepas identificadas como *Mesorhizobium* sp. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea, como nódulos blancos inefectivos. CSLC05N (A), CSLC07N (B), CSLC24N (C), CSLC06N (D), CSLC15N (E), CSLC18N (F), CSLC17N (G) y CSLC31N (H).

### 8.3. Histología nodular.

Gracias a los cortes histológicos realizados a diferentes nódulos recolectados y representativos de cada uno de los tratamientos llevados a cabo con las diferentes cepas de este apartado, pudimos ver un interior nodular con una buena organización. Hay células vacías claramente visibles, pero en las cuales no encontramos bacterias dispersas ni acúmulos de ellas, como si hemos visto en ocasiones anteriores y que también vemos en los nódulos de las inoculaciones realizadas con *Mesorhizobium* sp. CLSC17N y CSLC18N.

En rasgos generales vemos nódulos con una organización interna muy similar, consiguiendo mantener estas cepas la integridad de los mismos (figura 91-99).

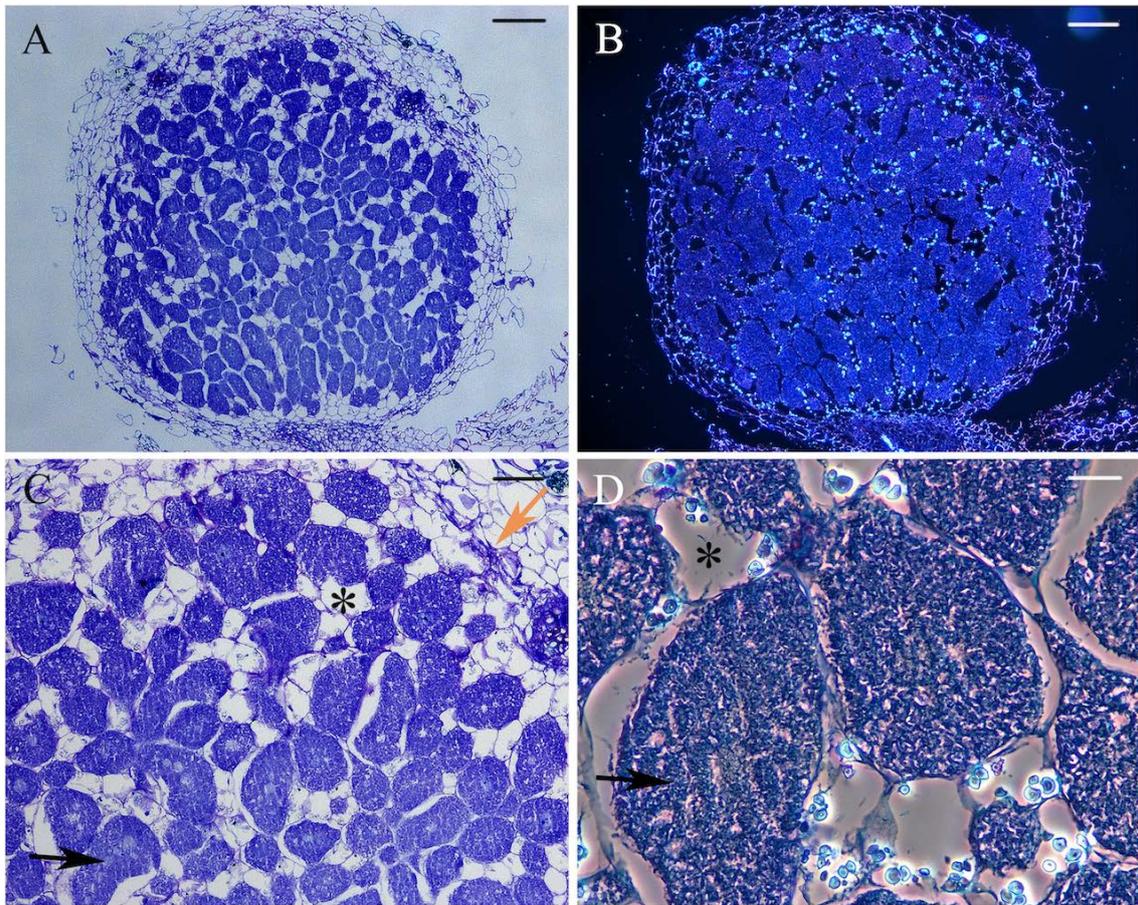


Figura 91. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Se observan células vacías y también ocupadas bacterias diferenciadas. Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula no invadida; flecha naranja: zonas de infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

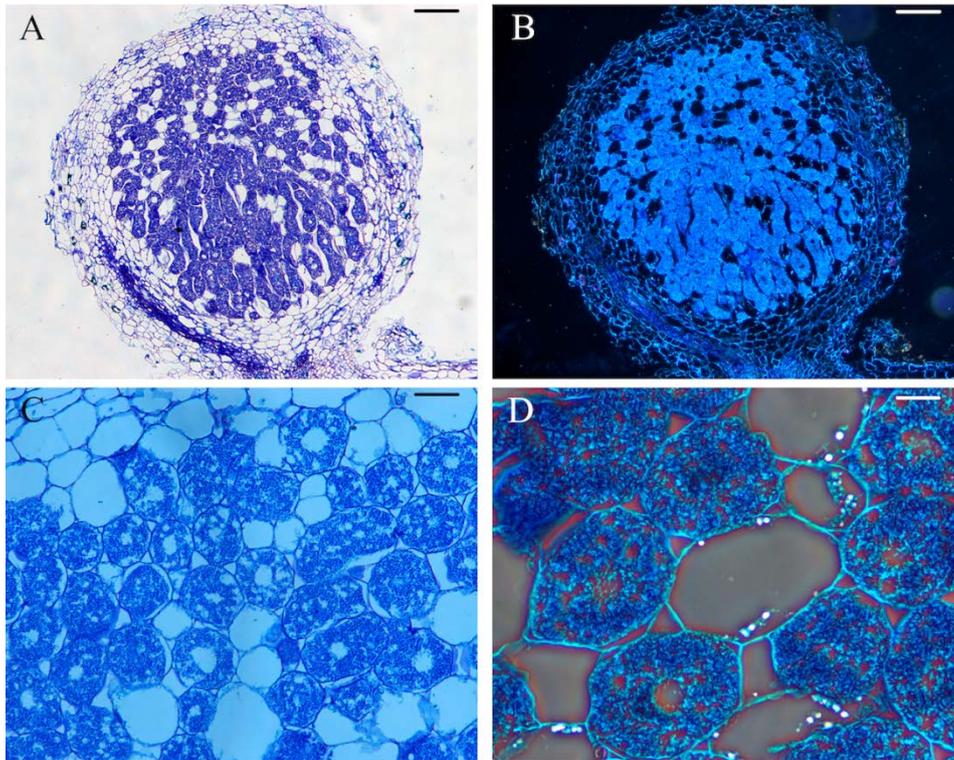


Figura 92. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC05N, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

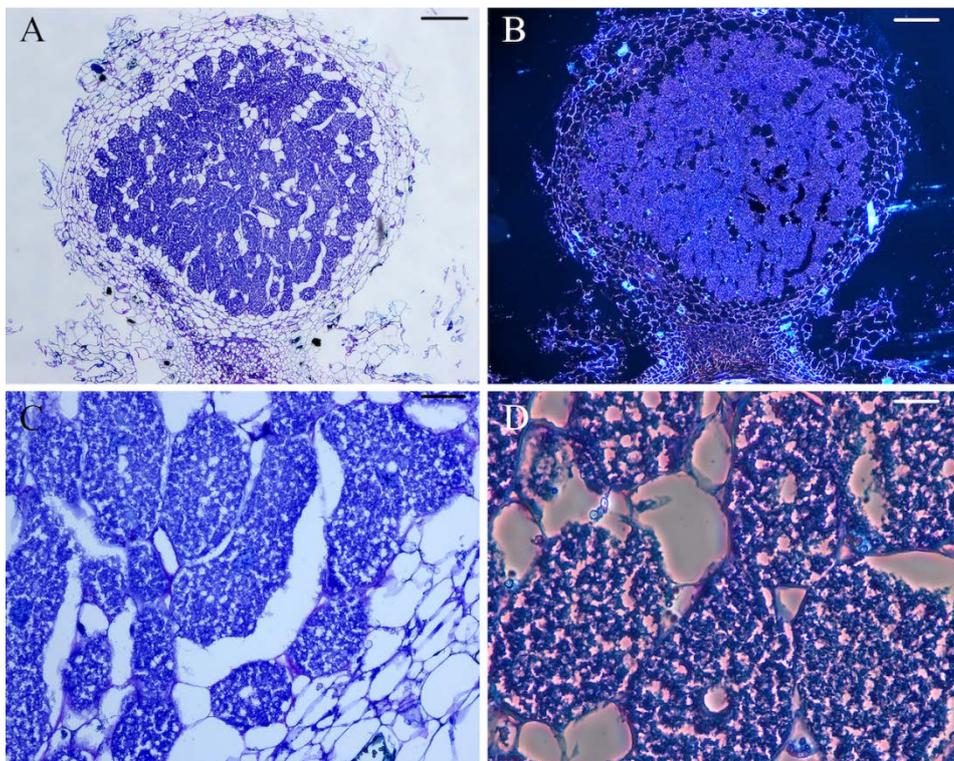


Figura 93. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC07N, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N.. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

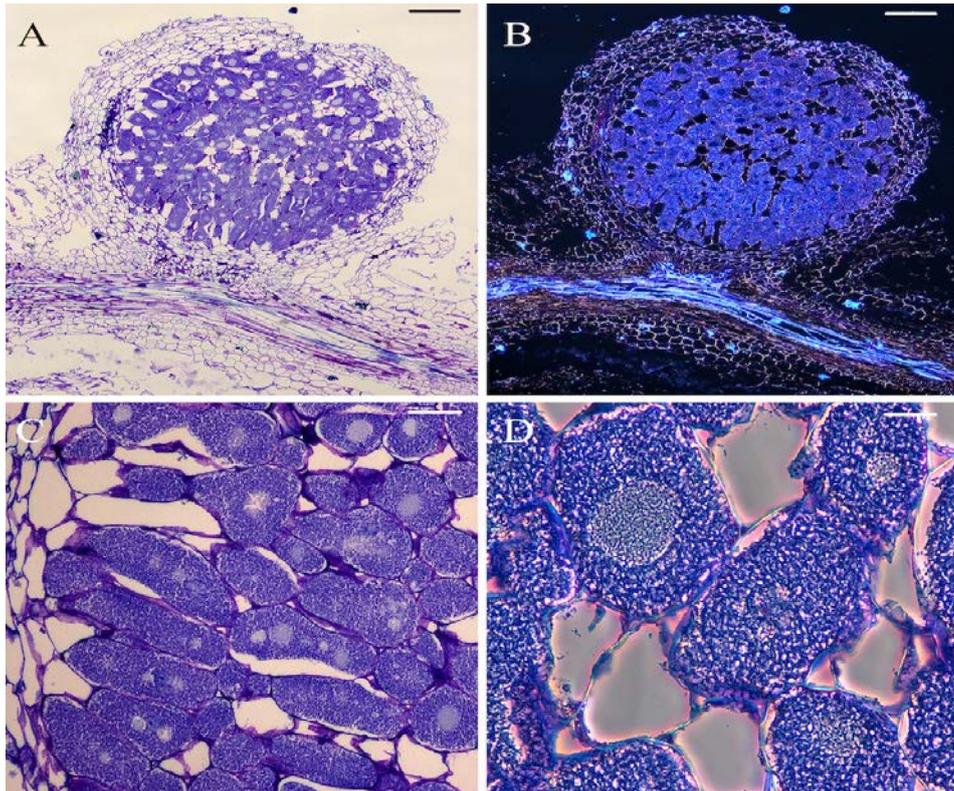


Figura 94. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC15N, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

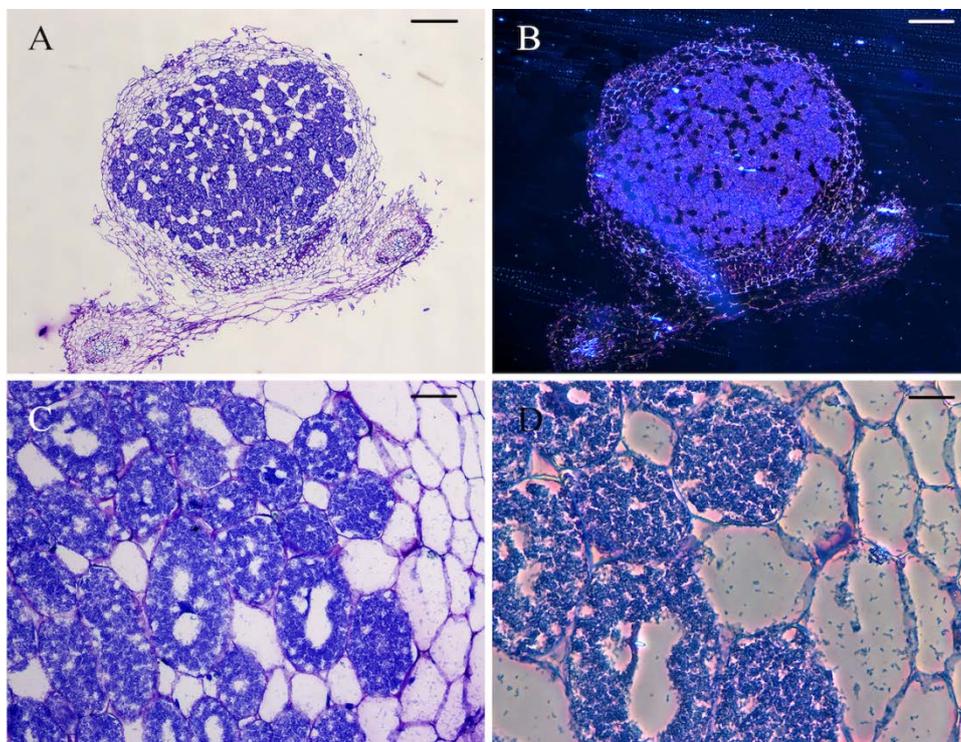


Figura 95. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC17N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

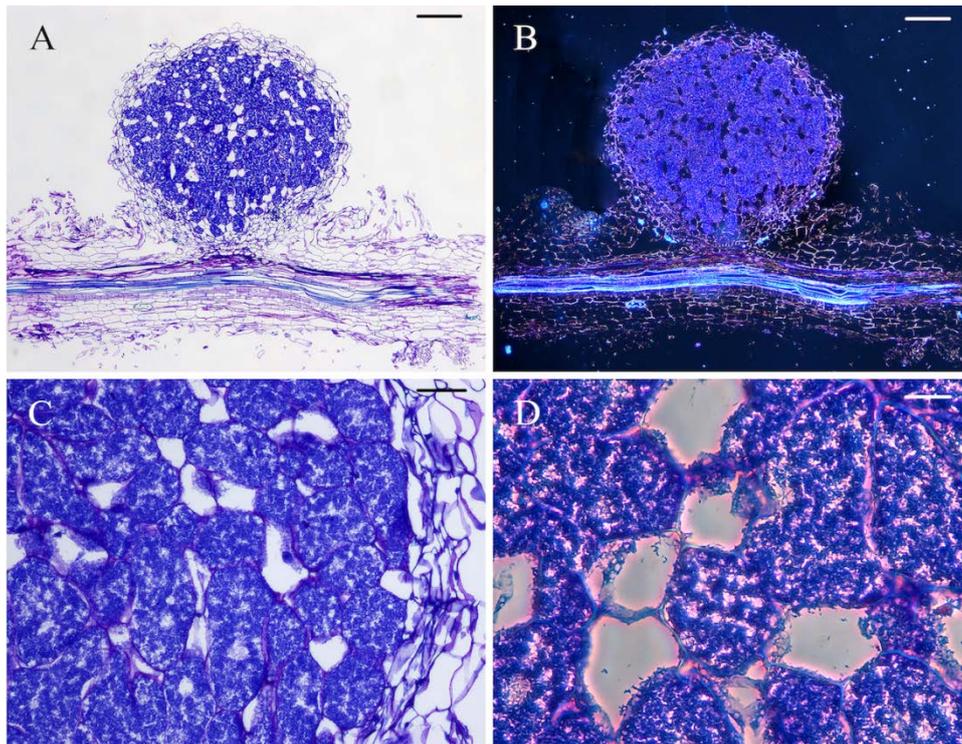


Figura 96. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC18N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

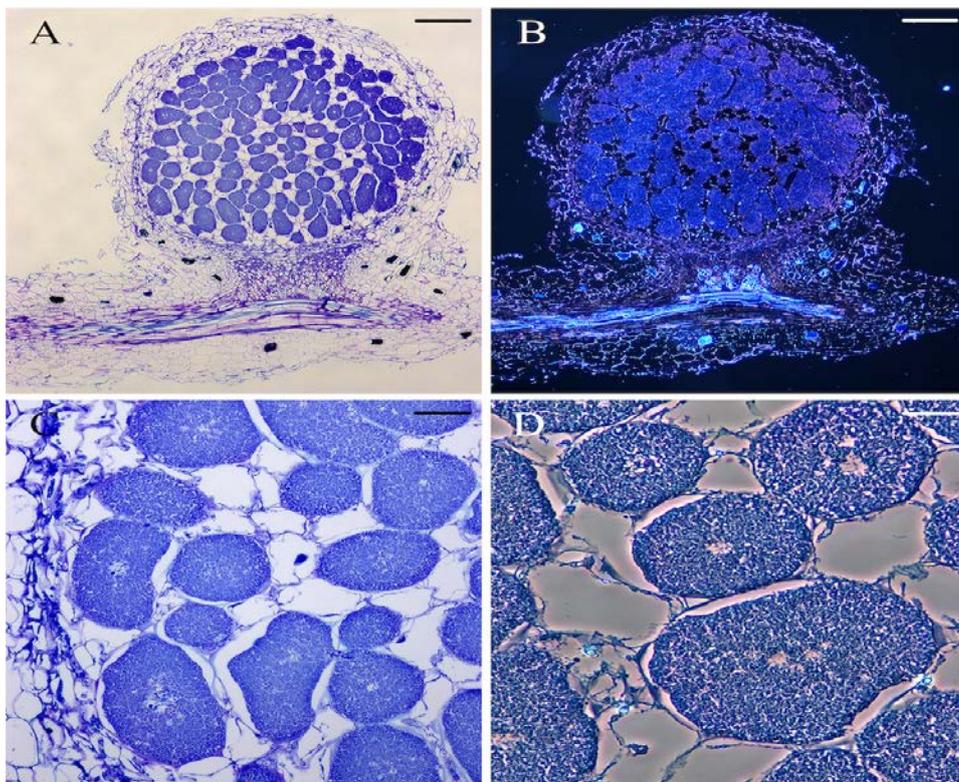


Figura 97. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC24N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

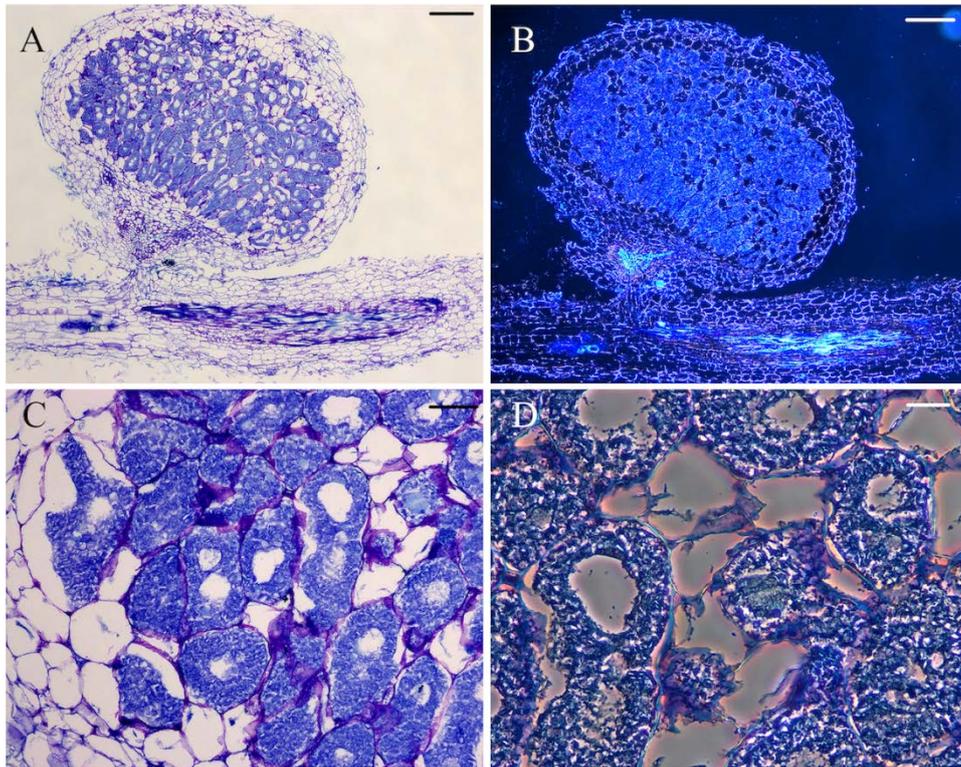


Figura 98. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC31N, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Los nódulos presentan una buena organización interna. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

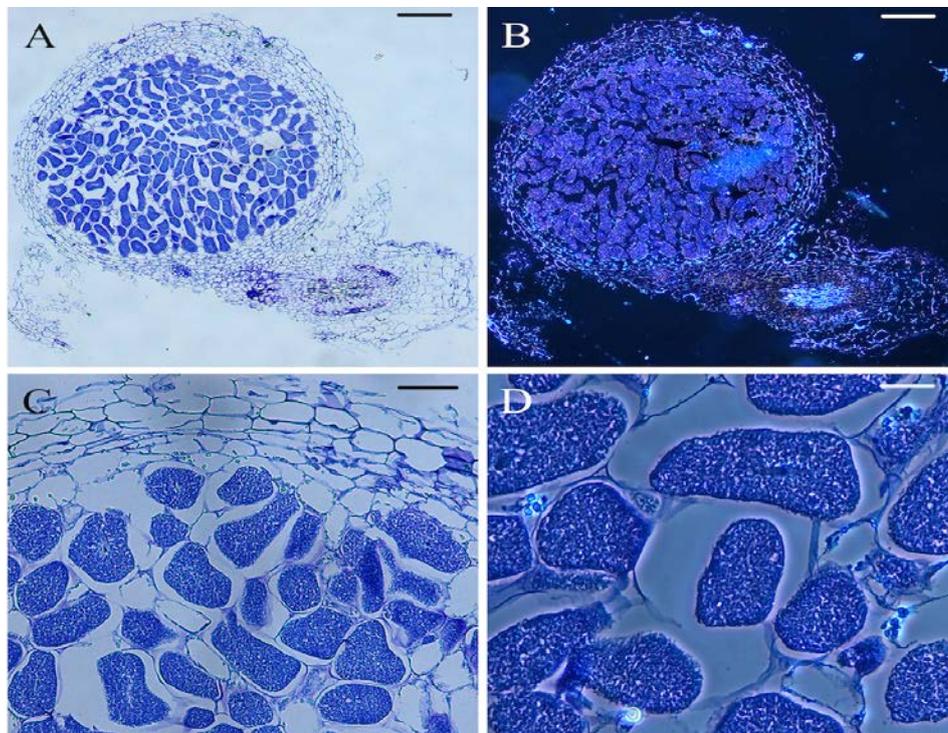


Figura 99. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium sp.* CSLC40N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *Mesorhizobium sp.* CSLC06N. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

## 9. *Mesorhizobium* sp. CSLC08N y CSLC23N.

Finalmente las últimas cepas en ser analizadas son CSLC08N y CSLC23N, filogenéticamente próximas a *M. helmanticense*, pero no tanto como las cepas analizadas en el apartado 8, por ello decidimos observarlas de forma independiente.

### 9.1. Cinética de nodulación.

Como vamos a observar a raíz de los resultados obtenidos, las dos cepas tienen similar comportamiento, pero diferente al visualizado con anterioridad en el apartado 7 respecto a la especie filogenéticamente más próxima a ellas que es *M. helmanticense*. En la figura 100A vemos que *M. helmanticense* CSLC08N y CSLC23N predominan respecto al número total de nódulos inducidos, con un total de 44 y 41 nódulos respectivamente. Merece la pena señalar que de los 44 nódulos totales que presentaron las plantas inoculadas con *M. helmanticense* CSLC08N, tan solo 13 presentaban un aspecto rosáceo; a diferencia de las plantas inoculadas con la *M. helmanticense* CSLC23N donde tan solo 2 de los 41 nódulos totales presentaron una coloración blanquecina, es decir, eran inefectivos. Las plantas inoculadas con las tres cepas identificadas como *M. helmanticense* (apartado 7) no sobrepasan el total de los 20 nódulos, con una alta proporción de nódulos efectivos respecto a los inefectivos. Si observamos ahora la cinética de nodulación (figura 100B), vemos que en rasgos generales todas siguen una cinética lineal hasta el final del ensayo. Como es lógico, las dos cepas presentan una cinética lineal totalmente ascendente, aumentando diariamente su número de nódulos.

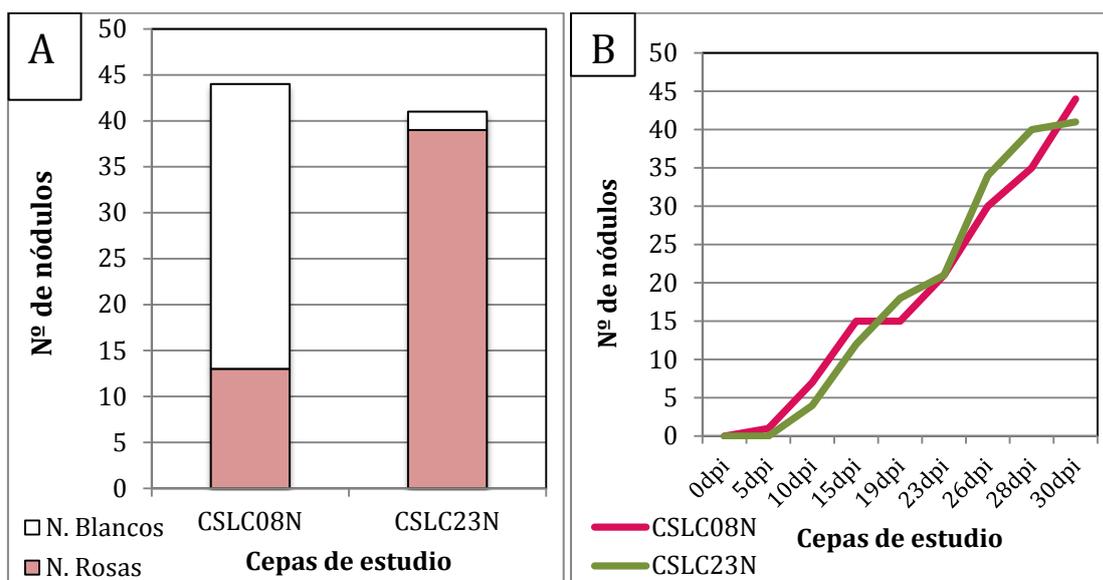


Figura 100. Número total de nódulos (A) y cinética de nodulación (B) de plantas de *L. corniculatus* inoculadas con diferentes cepas identificadas dentro del género *Mesorhizobium* y en ausencia de Nitrógeno.

## 9.2. Morfología nodular.

Los nódulos observados en las plantas de *L. corniculatus* inoculadas con las dos cepas filogenéticamente próximas a *M. helmanticense* son determinados, sin rasgo alguno de formas extrañas. Encontramos tanto nódulos determinados rosáceos, como indeterminados blanquecinos (figura 101). Los nódulos rosáceos son indicativos de que se están llevando a cabo una simbiosis efectiva fijadora de nitrógeno en su interior.

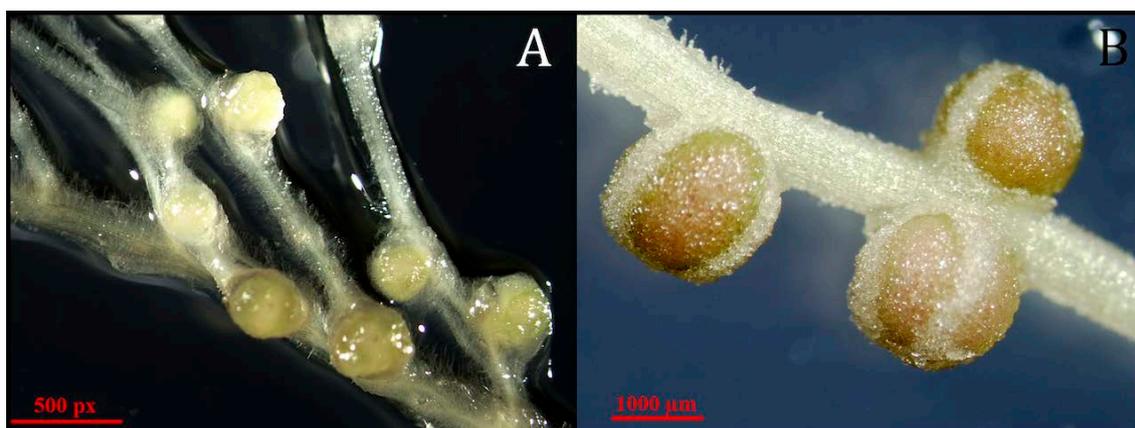


Figura 101. Morfología de nódulos de *L. corniculatus* inoculadas con las diferentes cepas identificadas como *Mesorhizobium* sp. En la figura vemos una representación de los diferentes nódulos formados en las raíces de las mismas; tanto nódulos efectivos con la típica coloración rosácea, como nódulos blancos inefectivos. CSLC08N (A), CSLC23N (B).

## 9.3. Histología nodular.

Para tratar de determinar las posibles diferencias existentes en cuanto a la organización interna de los nódulos, se observaron los cortes histológicos de los nódulos correspondientes a cada uno de los tratamientos a cabo, tal y como previamente se ha descrito (apartado 1.3).

El interior de los nódulos formados por cada una de las 2 cepas estaba perfectamente organizado, observando los típicos simbiosomas. Podemos observar nódulos que presentan todas las células prácticamente infectadas y ocupadas por simbiosomas. Si atendemos al número total de nódulos vistos anteriormente (apartado 9.2.), podemos destacar que de las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC23N tan solo contamos dos nódulos blanquecinos; y que de las inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC08N a pesar de contar un total de 44 nódulos, tan solo 13 eran efectivos. Ello puede ser indicativo de una buena eficiencia noduladora. Tanto si son capaces de inducir más nódulos efectivos (CSLC23N) como menos (CSLC08N), lo que si queda evidenciado al observar los correspondientes cortes histológicos, es que estos presentan una buena organización interna (figuras 102 y 103).

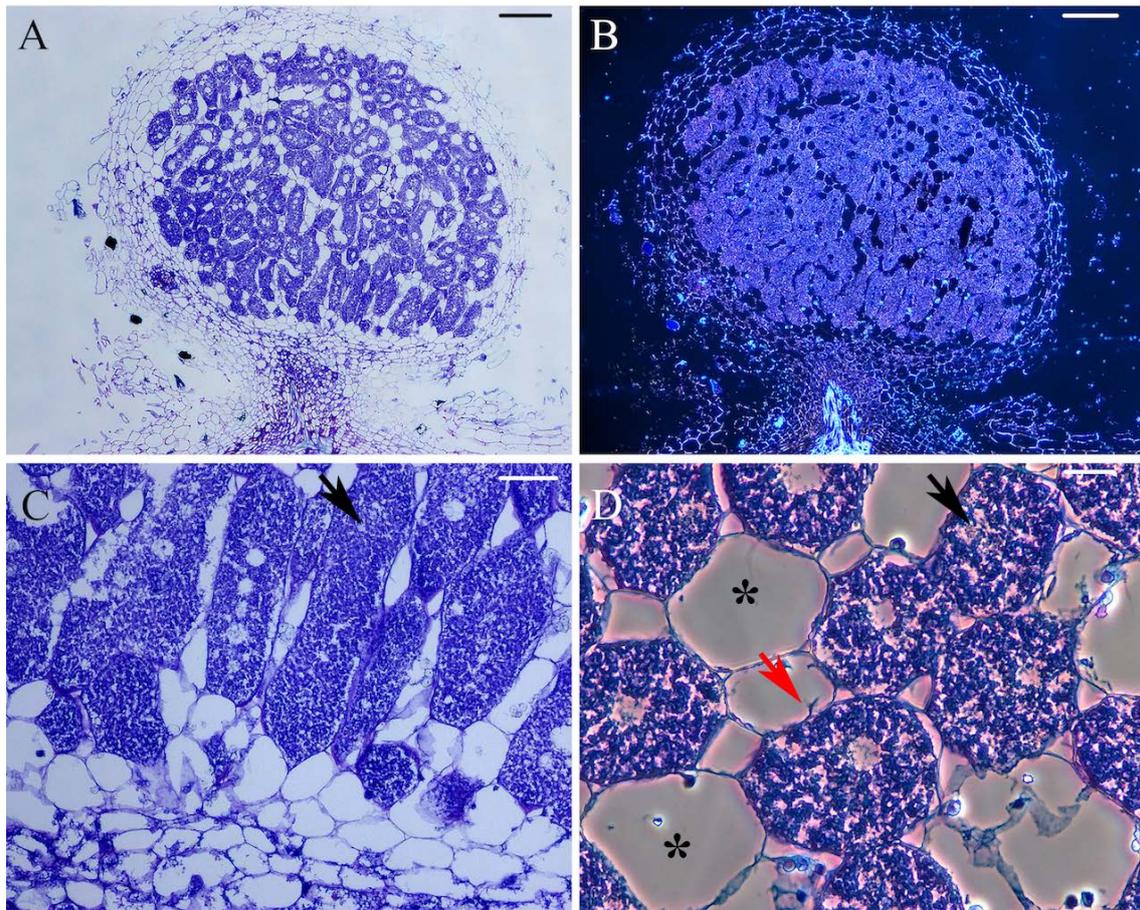
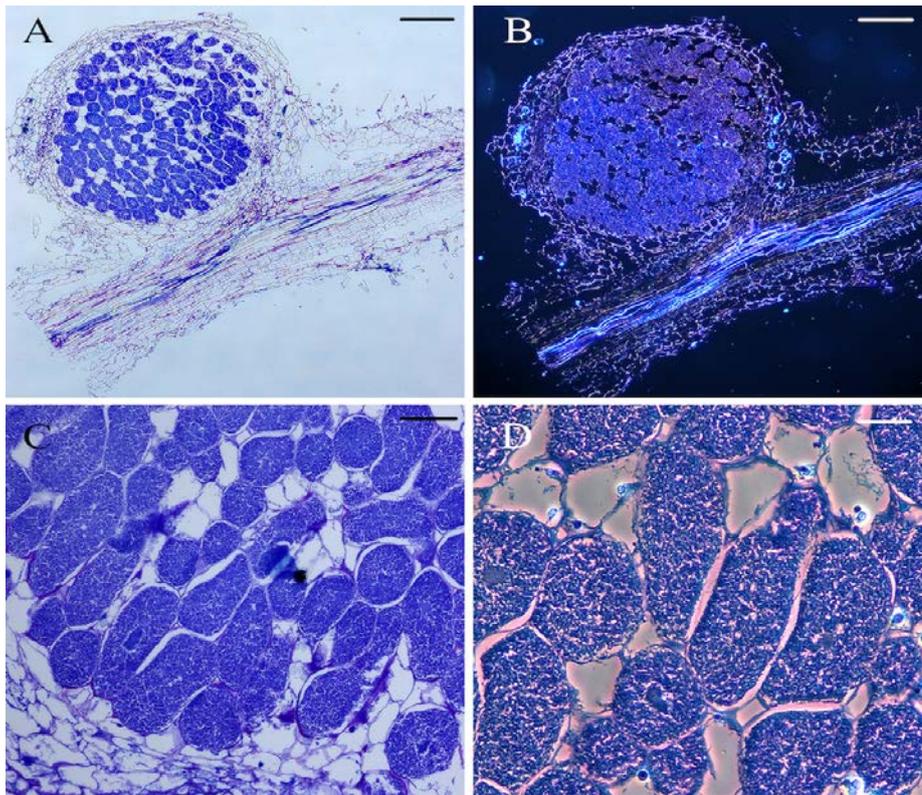


Figura 102. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. helmanticense* CSLC08N. Los nódulos presentan una buena organización interna, con bacterias diferenciadas en el interior de las células invadidas. Podemos diferenciar un canal de infección. Flecha negra: célula invadida; asterisco: células no invadidas; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).



**Figura 103.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. helmanticense* CSLC23N. Los nódulos presentan una buena organización interna, similar a *M. helmanticense* CSLC08N, pero con mayor proporción de células invadidas. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

## 10. Ensayos de coinoculación en cultivo hidropónico

Una vez demostrado el potencial que poseen todas las cepas aisladas del género *Mesorhizobium* para volver a renodular su planta hospedadora, decidimos hacer un ensayo de coinoculación con dos cepas del género *Mesorhizobium* y cuatro bacterias endófitas, identificadas dentro de diferentes géneros (tabla 39), para ver si de alguna manera se incrementaba la nodulación de las plantas y se notaban cambios notables en su crecimiento.

Para ello escogimos las dos cepas mejor noduladoras, tanto por el número de nódulos que presentaron las plantas que fueron inoculadas con las mismas, como por su exponencial cinética de nodulación hasta el final del ensayo. Estas cepas son *Mesorhizobium jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N.

Por otro lado se escogieron 4 cepas endófitas, elegidas por sus diferentes características como promotores del crecimiento vegetal (PGPR). A continuación se detalla una tabla (tabla 39) con las mencionadas características, tanto de las cepas endófitas como de las dos cepas del género *Mesorhizobium*.

**Tabla 39. Características PGPR de las diferentes bacterias escogidas para los ensayos de nodulación. C.: producción de Celulosa; A.C.: Actividad Celulolítica; B.V.: producción de Biofilms en Vidrio; S.: Sideróforos; AIA: Ácido Indól Acético (mg/L); P.: solubilización de fosfato.**

**+: positivo; -: negativo; D: débil.**

Cepa	Especie	C.	A.C.	B. V. *	S.	AIA	P.
CSLC28N	<i>Mesorhizobium jarvisii</i>	-	D	3	-	0,042	+
CSLC35N	<i>Mesorhizobium sp.</i>	+	+	2	-	0,620	+
CSLC41N	<i>Bacillus aryabathai</i>	+	-	3	-	0,030	+
CSLC46N	<i>Arthrobacter sp.</i>	+	D	2	-	0,031	+
CSLC56N	<i>Streptomyces sp.</i>	D	+	4	+	0,032	+
CSLC88N	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	D	+	3	+	0,033	+

\* Los números se corresponden con las categorías previamente establecidas en el apartado 5.2. del Capítulo II.

La elección de las bacterias endófitas también se realizó teniendo en cuenta los diferentes géneros. Es decir, se eligieron cuatro cepas de cuatro géneros diferentes, de entre todos los géneros aislados en este estudio, y que presentaban diferentes características PGPR. El objetivo era comprobar el potencial de estas bacterias endófitas al ser coinoculadas con bacterias fijadoras de Nitrógeno. Por un lado, la planta se beneficiará del Nitrógeno suministrado y aportado por las bacterias endosimbiontes, a la vez que por medio de las bacterias PGPR recibe una mayor disponibilidad de nutrientes por medio de la solubilización de P y la producción de sideroforos. Como pudimos comprobar en el Capítulo II, las 6 bacterias escogidas (tabla 39) son capaces de formar biofilms para adherirse con mayor firmeza a la planta y colonizarla con éxito. Pensamos que todas estas características ayudarán a una mayor promoción del crecimiento vegetativo de la planta y queremos saber cuál de todos los tratamientos empleados podría constituir un mejor y futuro biofertilizante.

### 10.1. Cinética de nodulación.

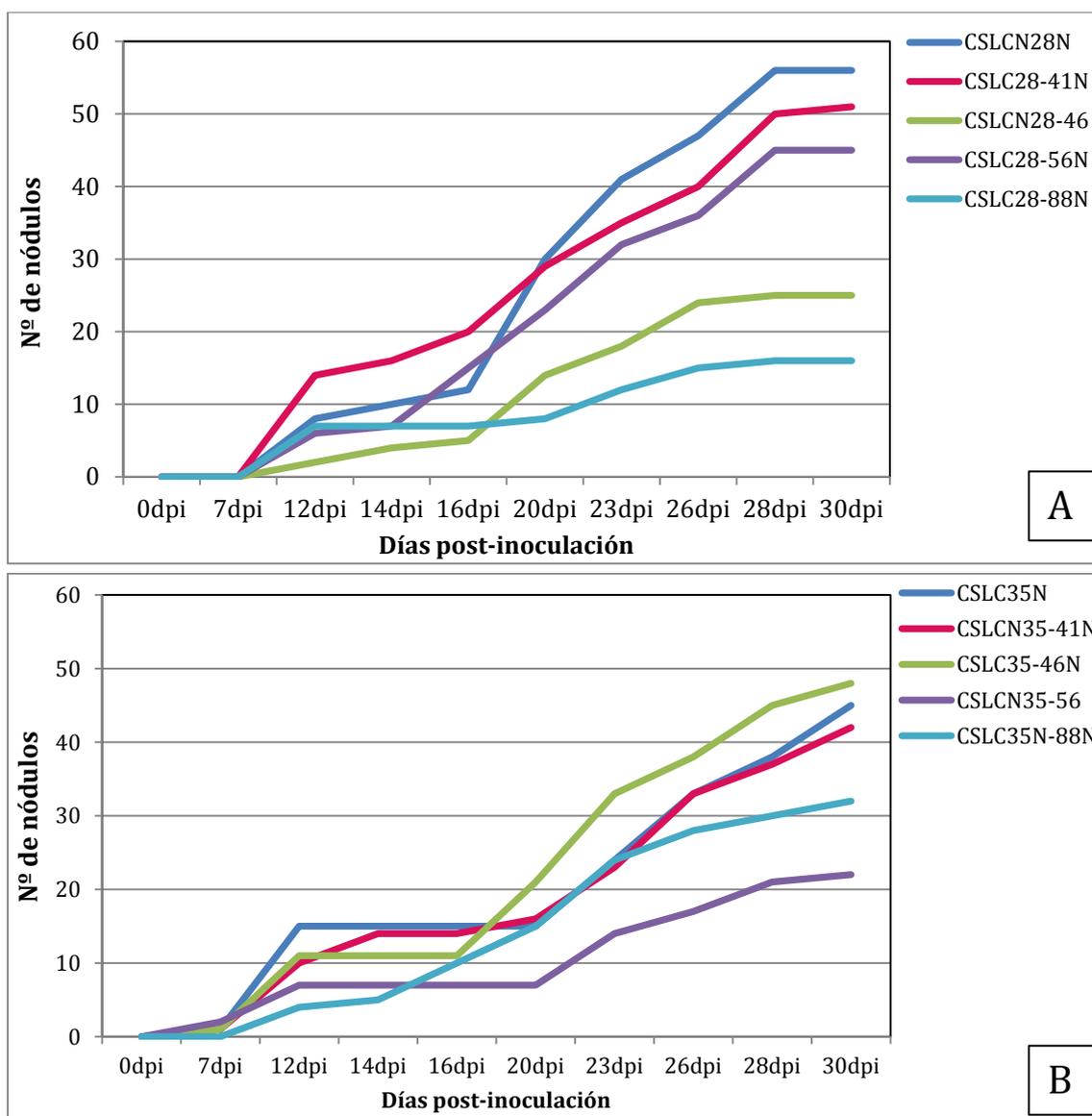
El ensayo hidropónico de coinoculación se llevó a cabo siguiendo los mismos pasos que se habían realizado previamente en los ensayos de nodulación con cada una de las diferentes cepas a estudio.

En esta ocasión se realizaron 12 tratamientos (tabla 40). Los dos controles sin inocular se utilizaron para comprobar que el ensayo había transcurrido de forma correcta y con el objetivo de observar diferencias durante el transcurso del crecimiento de las plantas. Así mismo, también comprobamos que la nodulación se inducía por las diferentes inoculaciones, al no observar presencia de nódulos en ninguno de los controles.

**Tabla 40. Tratamientos llevados a cabo en los ensayos de coinoculación en cultivo hidropónico.**

Cepas	Tratamiento
C-	Control Negativo, sin inocular y sin aporte de N.
C+	Control Positivo, sin inocular y con aporte de N.
CSLC28N	Inoculación simple. Sirve de control de las coinoculaciones realizadas con dicha cepa.
CSLC28N-CSLC41N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium jarvisii</i> - <i>Bacillus aryabhatai</i>
CSLC28N-CSLC46N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium jarvisii</i> - <i>Arthrobacter</i> sp.
CSLC28N-CSLC56N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium jarvisii</i> - <i>Streptomyces</i> sp.
CSLC28N-CSLC88N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium jarvisii</i> - <i>Micromonospora chokoriensis</i>
CSLC35N	Inoculación simple. Sirve de control de las coinoculaciones realizadas con dicha cepa.
CSLC35N-CSLC41N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium</i> sp.- <i>Bacillus aryabhatai</i>
CSLC35N-CSLC46N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium</i> sp.- <i>Arthrobacter</i> sp.
CSLC35N-CSLC56N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium</i> sp.- <i>Streptomyces</i> sp.
CSLC35N-CSLC88N	Coinoculación de <i>Mesorhizobium</i> sp.- <i>Micromonospora chokoriensis</i>

En la figura 104 podemos ver dos gráficas de la cinética de nodulación obtenida para los 10 tratamientos de inoculación a estudio.



**Figura 104. Cinética de nodulación de los diferentes tratamientos realizados con *Mesorhizobium jarvisii* CSLC28N (A) y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (B).**

Las plantas coinoculadas con la cepa CSLC28N (figura 104A), que resultó ser la mejor noduladora en ensayos previos, presentaron una cinética de nodulación lineal pero con diferencias. La inoculación simple de *Mesorhizobium* sp. CSLC28N y de las coinoculaciones de esta con *Bacillus aryabhatai* CSLC41N y *Streptomyces* sp. CSLC56N sigue una cinética lineal y creciente hasta prácticamente el final del ensayo, donde vemos que en los tres últimos días no hay formación de nuevos nódulos, siendo una cinética prácticamente estacionaria.

Respecto a la coinoculación con *Arthrobacter* sp. CSLC46N en la gráfica podemos ver que la mayor formación de nódulos se produce entre los 16 y 27 dpi, sin ser una producción demasiado elevada. Prácticamente lo mismo que ocurre en la coinoculación con *Micromonospora* sp. CSLC88N, aunque en esta ocasión la cinética es prácticamente estacionaria entre los 12-20 dpi y 27-31dpi.

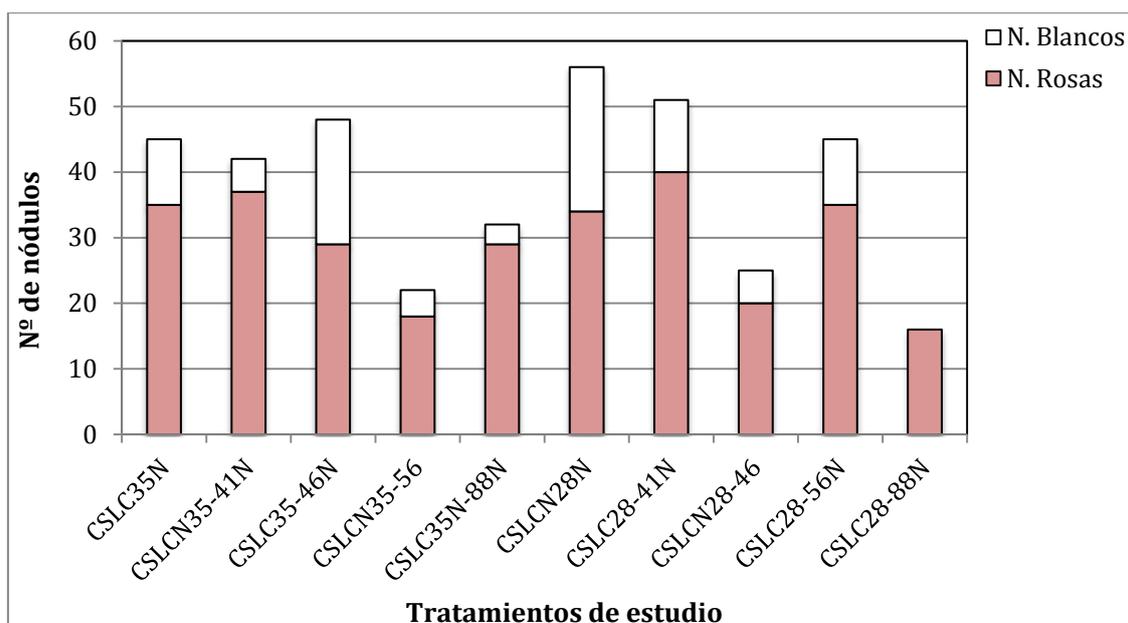
Con estos datos podríamos decir que las coinoculaciones no conllevan una mayor formación de nódulos porque, aunque la cinética de nodulación en la coinoculación con *Bacillus aryabhatai* CSLC41N es mayor hasta los 21dpi que la inoculación simple, es esta última la que finalmente se impone sobre las coinoculaciones. Por tanto podríamos decir que, de momento, no beneficia que *Mesorhizobium jarvisii* CSLC28N se encuentre en coinoculación con otros géneros de bacterias.

En la figura 104B vemos que la tendencia seguida con las cepas endófitas en la figura 104A cambia. Aunque la inoculación simple con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N comienza siendo ligeramente mayor que las coinoculaciones, a los 17 dpi sigue la misma tendencia creciente que la coinoculación con *Bacillus aryabhatai* CSLC41N. La cinética seguida con la coinoculación con *Arthrobacter* sp. CSLC46N es ligeramente superior a las dos anteriores también a partir de los 17dpi.

Aunque no de forma acusada, la coinoculación con *Micromonospora chokoriensis* CSLC88N sigue una cinética de nodulación lineal y constante prácticamente desde el inicio de la nodulación. No ocurre lo mismo en la cinética observada en la coinoculación con *Streptomyces* sp. CSLC56N, que tiene una tendencia estacionaria desde los 12 hasta los 21 dpi, para subir ligeramente hasta los 31 dpi.

En esta ocasión podríamos decir por tanto que *Arthrobacter* sp. CSLC46N, ayuda de alguna manera a una mayor formación de nódulos, sin causar perjuicio alguno a la simbiosis establecida por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *L. corniculatus*. De igual modo podemos hablar de la coinoculación establecida con *B. aryabhatai* CSLC41N, ya que sigue prácticamente la misma cinética de nodulación que la inoculación simple con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N.

También podemos hablar del número total de nódulos obtenido en cada uno de los tratamientos realizados (gráfica 8).



Gráfica 8. La gráfica representa el número total de nódulos formados por cada uno de los diferentes tratamientos a los 30 dpi.

De las plantas inoculadas con *Mesorhizobium jarvisii* CSLC28N se obtuvo un número total de nódulos de 56. Fue la cepa mejor noduladora en ensayos previos y sigue siendo la que mayor potencial presenta relativo a la nodulación y de forma aislada, ya que no necesita el aporte de ninguna otra bacteria, que lejos de beneficiarla, parecen que de alguna manera retraen su nodulación. Nos referimos en este caso a las coinoculaciones con *Arthrobacter* sp. y *Micromonospora chokoriensis*.

Seguidas van las coinoculaciones CSLC28N-CSLC41N y CSLC35N-CSLC46N, con un número total de nódulos en las plantas de dichos tratamientos de 51 y 48 respectivamente.

Los tratamientos en cuyas plantas encontramos menor número total de nódulos fueron las coinoculaciones CSLC28N-CSLC45N, CSLC28N-CSLC88N y CSLC35N-CSLC56N, con 25, 22 y 16 nódulos respectivamente.

## 10.2. Morfología e histología nodular.

Como en ensayos previos, realizamos una visualización morfológica de los nódulos con el fin de determinar si la nodulación había transcurrido correctamente (figura 105) y posteriormente llevamos nódulos representativos de los diferentes tratamientos a hacer cortes histológicos, con el fin de observar con el microscopio si presentaban una buena organización interna.

El objetivo de las diferentes visualizaciones era tratar de determinar si existían diferencias entre las diferentes inoculaciones realizadas, favoreciendo el desarrollo nodular de las plantas en algún caso.

En la figura 105 podemos observar fotografías realizadas con lupa estereoscópica de partes de raíces de las plantas inoculadas o coinoculadas con las diferentes cepas. En cualquier caso vemos un desarrollo de los nódulos, claramente determinados, normal y bien formado. Un hecho que merece la pena ser señalado es el incremento de pelos radiculares, largos y gruesos, que observamos en los ocho tratamientos de coinoculación realizados, que no observamos en las coinoculaciones simples (figura 105A). En la figura 105D, E, F, G, I y J vemos seis claros ejemplos de tal suceso. Esto implica una mayor absorción de agua y nutrientes que favorecerán el crecimiento vegetativo de la planta.

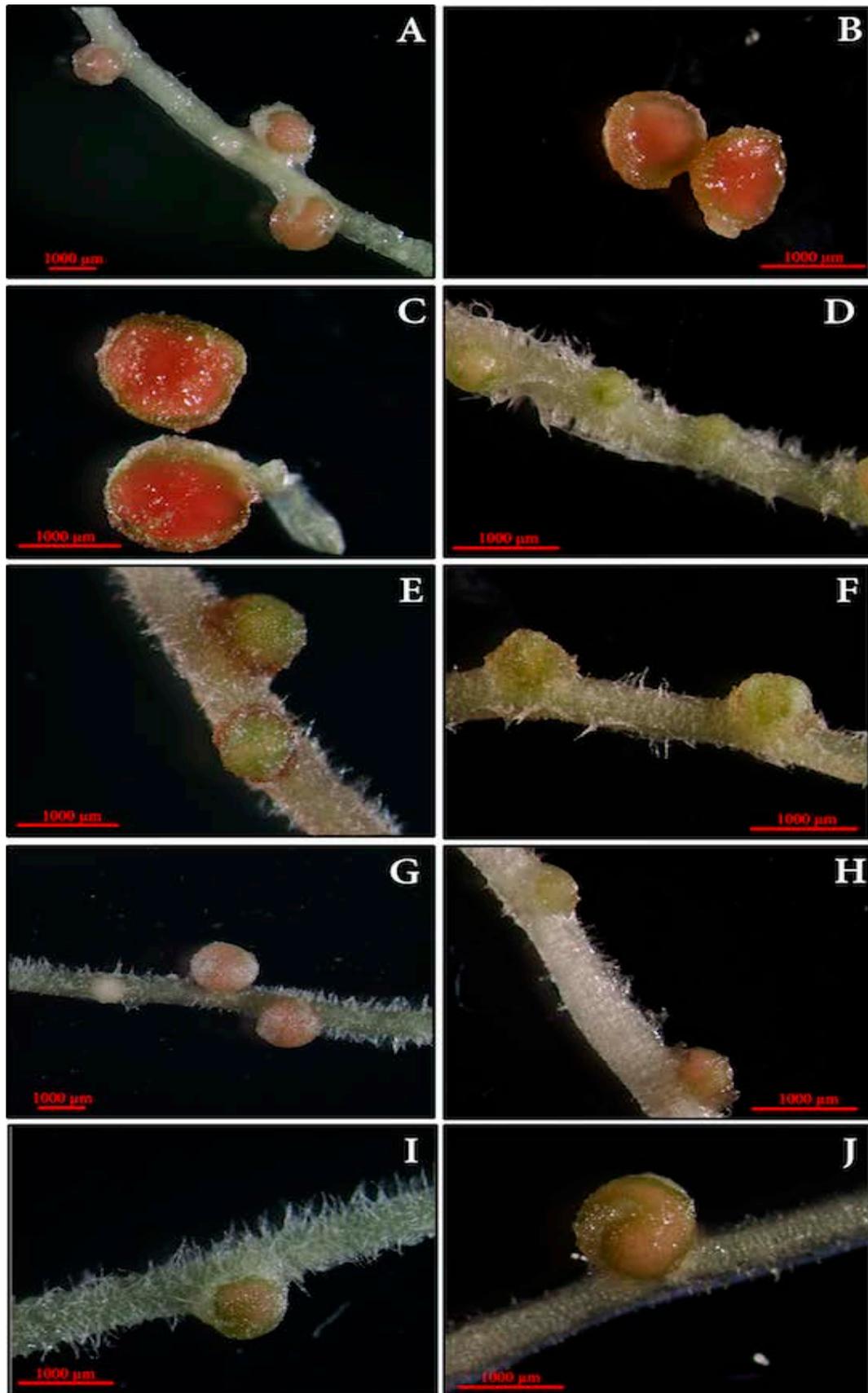


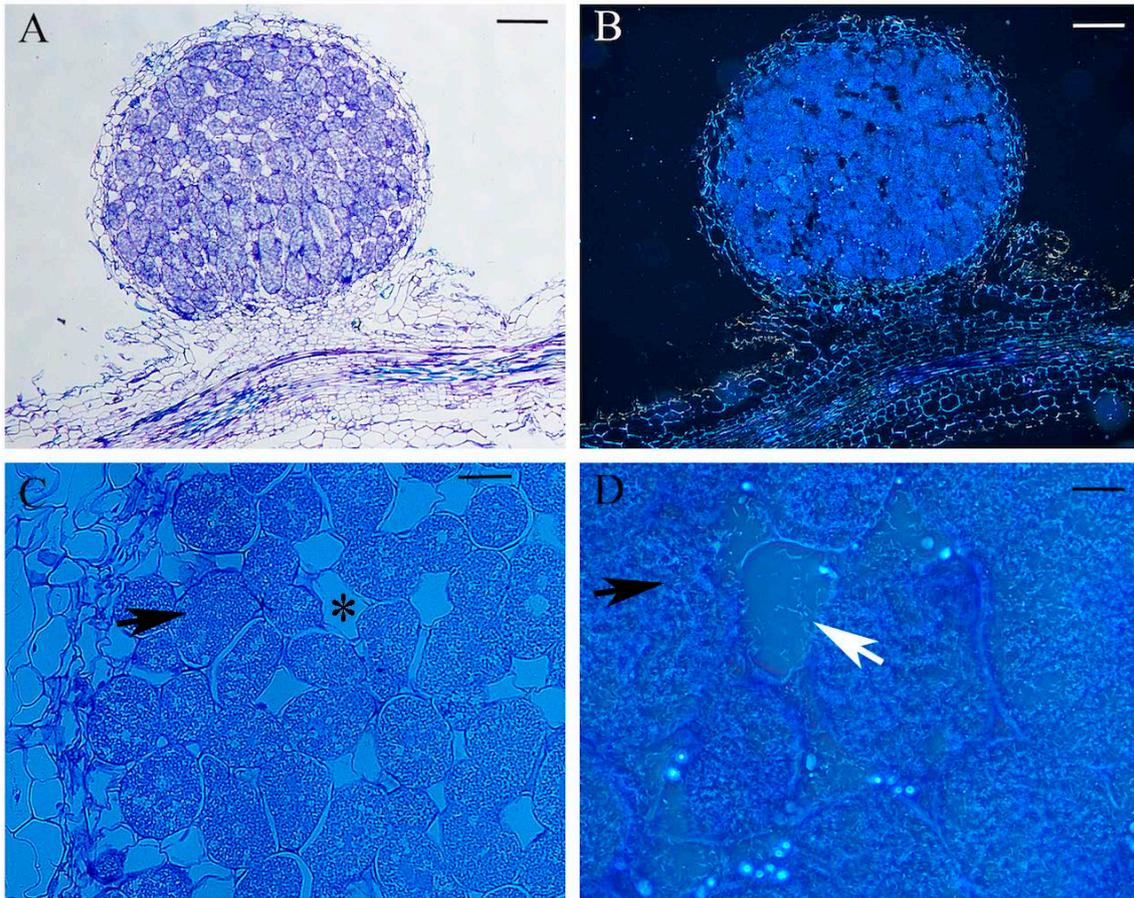
Figura 105. Fotografías realizadas con lupa estereoscópica (Nikon SMZ800) de plantas inoculadas con los distintos tratamientos donde se pueden observar nódulos efectivos, CSLC28N (A), CSLC35N (B), CSLC28N-41N (C), CSLC35N-41N (D), CSLC28N-46N (E), CSLC35N-46N (F), CSLC28N-56N (G), CSLC35N-56N (H), CSLC28N-88N (I) y CSLC35N-88N (J).

Al igual que en los ensayos de nodulación realizados con anterioridad, se seleccionaron una serie de nódulos de los diferentes tratamientos con el objetivo de visualizar su organización interna (apartado 9.3).

### 10.3. Histología nodular.

A continuación se llevaron una serie de nódulos de diferentes plantas de las inoculaciones realizadas con los diferentes tratamientos para hacer cortes histológicos seriados, del mismo modo que cómo se realizó anteriormente (apartado 1.3.). El objetivo nuevamente era comprobar la organización interior de los nódulos, así como observar la ocupación y organización celular interior. También queríamos averiguar si de alguna manera las cepas bacterianas coinoculantes con las dos cepas del género *Mesorhizobium* modificaban la organización interna, anteriormente visualizada en las inoculaciones simples de estas cepas rizobianas.

Al observar los nódulos correspondientes a las plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Bacillus aryabhatai* CSLC41N vimos que el interior de los nódulos estaba organizado, observando los típicos simbiosomas de color azul que previamente ya habíamos observado en los cortes histológicos de la inoculación simple. Estas células están fijando Nitrógeno, a diferencia de las células en las que vemos que no hay simbiosomas y aparecen de color blanco, ya que no han conseguido ser invadidas y que no abundan dentro del interior nodular. No presenciamos degradación de paredes celulares vegetales, pero sí bacterias dispersas en las células no ocupadas por simbiosomas. Esto nos hace pensar que puede haber conjuntamente presencia de los dos tipos de bacterias porque, como veremos en el siguiente apartado, conseguimos aislar las dos cepas bacterianas del interior de los nódulos de las plantas coinoculadas con las mismas. De esta manera pudimos comprobar que la nodulación fue correcta no presenciando estructuras raras en ningún caso. Además, fue el segundo tratamiento en el que mayor formación de nódulos se vio al final del ensayo, por lo que parece evidente que *Bacillus aryabhatai* CSLC41N no causa perjuicio alguno a la planta en coinoculación con *M. jarvisii* CSLC28N (figuras 106).



**Figura 106.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *B. aryabhatai* CSLC41N. Tienen una buena organización interna, presenciando células invadidas por bacterias diferenciadas y sin invadir, con bacterias dispersas en su interior. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula no invadida; flecha blanca: bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

En la coinoculación realizada con *Arthrobacter* sp. CSLC46N observamos un interior nodular desorganizado. Lejos de ver células bien definidas ocupadas por simbiosomas, vemos células rotas. De tal manera que el interior del nódulo parece estar ocupado simultáneamente por simbiosomas y bacterias dispersas. Los nódulos morfológicamente tienen una forma determinada y rosácea, como vimos en el apartado 9.2, por lo que parece que las células se rompieron después de estar bien formado el nódulo y de estar fijando nitrógeno. Es decir que, lo que observamos, es una degradación de la pared celular del nódulo, lo cual ha originado la aparición de bacteroides en el interior de las células vacías. Al observar detenidamente la figura 107D, vemos que hay diferentes estructuras o morfologías. *Arthrobacter* es un género de bacterias con forma de bacilo durante la fase de crecimiento exponencial y de coco durante la fase estacionaria, por lo que cabe la posibilidad que estemos viendo un conjunto de bacterias, unas pertenecientes a *M. jarvisii* CSLC28N y otras pertenecientes a *Arthrobacter* sp. CSLC46N, tanto en su forma bacilo como en su forma coco.

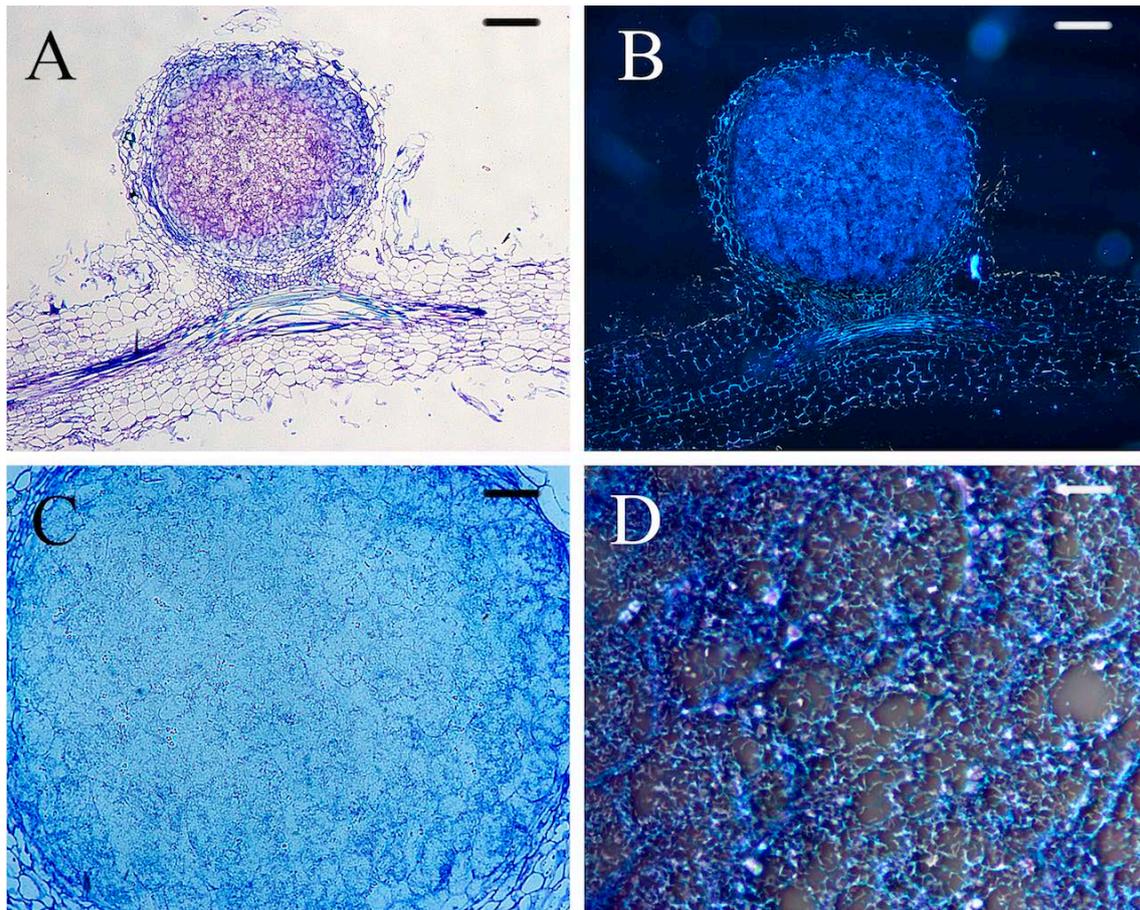


Figura 107. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N. El interior nodular está claramente desorganizado, sin células diferenciadas. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

Observando la figura 108A y B vemos que el interior del nódulo correspondiente a las plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Streptomyces* sp. CSLC56N, está totalmente invadido. Pero, a diferencia de imágenes similares correspondientes a otros tratamientos, vemos que no se distinguen las células del interior del nódulo. Como en el caso anterior, en la coinoculación con *Arthrobacter* sp., la morfología de estos nódulos era aparentemente normal, determinada y rosácea. Acercándonos más, en la figura 106C, vemos que sí hay células definidas, pero no distinguimos tan claramente los simbiosomas en su interior, como sí hemos visto con anterioridad en otros cortes histológicos. Además, en el interior de algunas células, se distinguen mejor en las células vacías (figura 108D), observamos filamentos alargados, que con toda probabilidad pertenecerán a los filamentos ramificados de la cepa de *Streptomyces*. En esta ocasión, sí conseguimos aislar del interior del nódulo los dos coinoculantes (apartado 9.4). El interior de este nódulo muestra, en resumen, una disposición peculiar, en el cual la mayoría de las células de su interior no están teñidas con azul de toluidina, y en su lugar observamos unas disposiciones de forma alargada y redondeada.

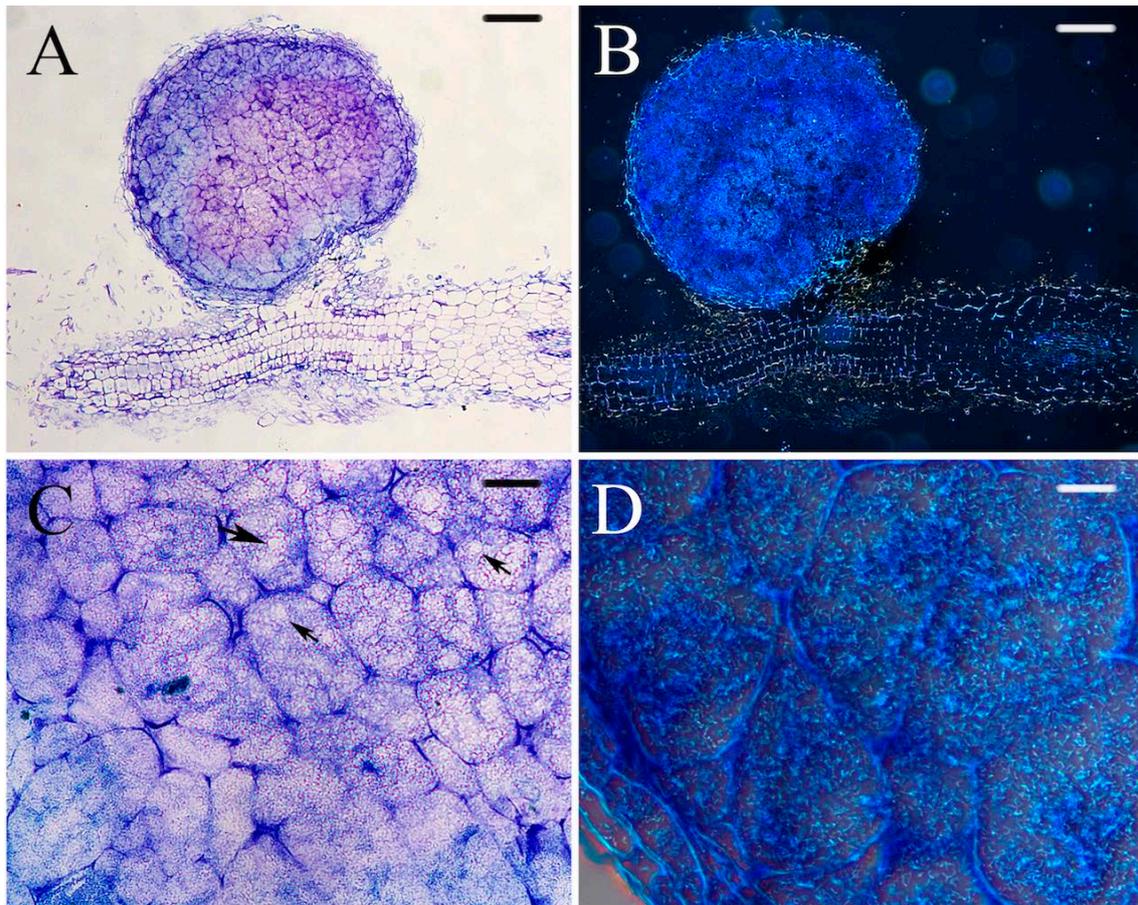
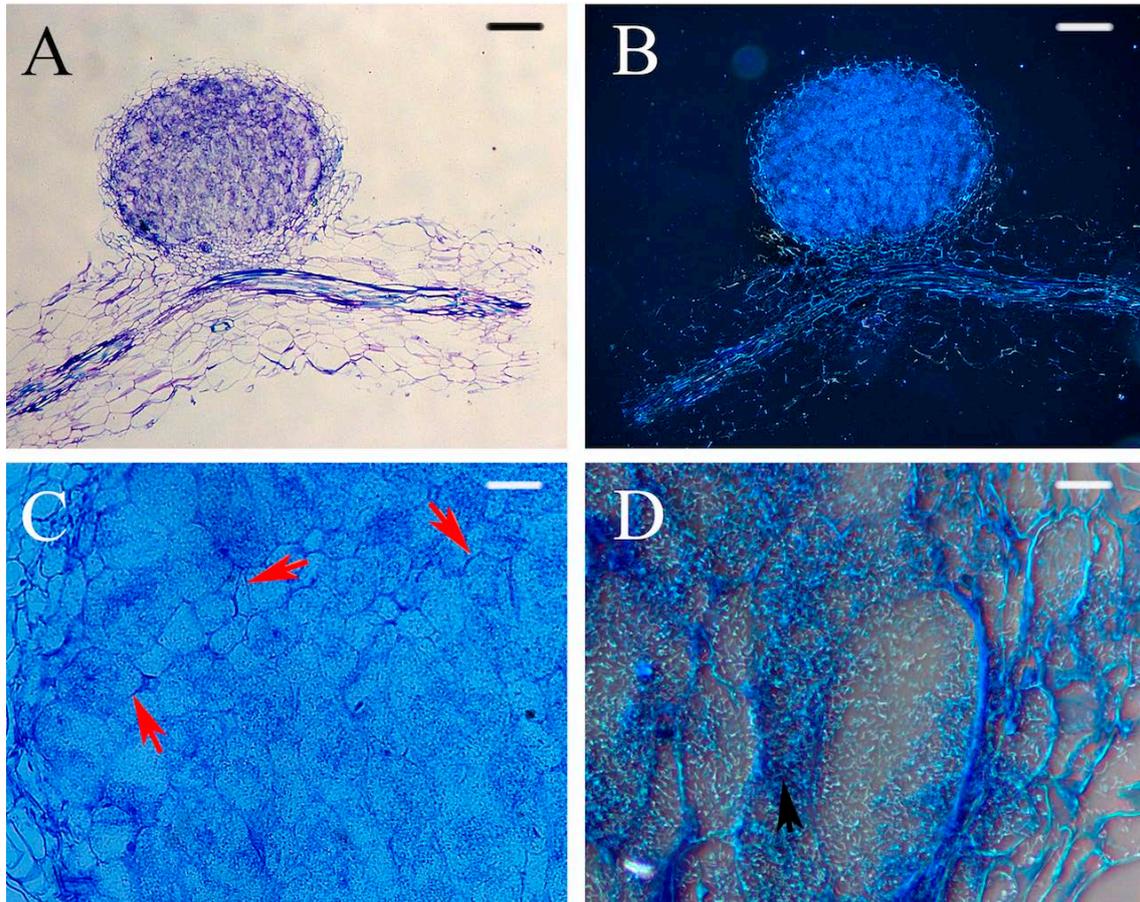


Figura 108. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Streptomyces* sp. CSLC56N. Células definidas pero sin distinguir claramente bacterias diferenciadas en su interior. Observamos gránulos blancos y filamentos que con toda probabilidad pertenecerán a *Streptomyces* sp. CSLC56N. Flecha negra: simbiosomas y bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

En los nódulos correspondientes a las plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Micromonospora chokoriensis* CSLC88N (figura 109) vemos una estructura similar a la observada en la coinoculación con *Streptomyces* sp. CSLC56N. Se observa mucha ocupación bacteriana dentro, pero en esta ocasión no hay muchas células diferenciadas. Vemos paredes celulares que no están claramente definidas, porque parece que están rotas. Además, podemos observar bacterias ocupando zonas intracelulares. En esta ocasión también conseguimos aislar del interior del nódulo las dos cepas coinoculantes (apartado 9.4).

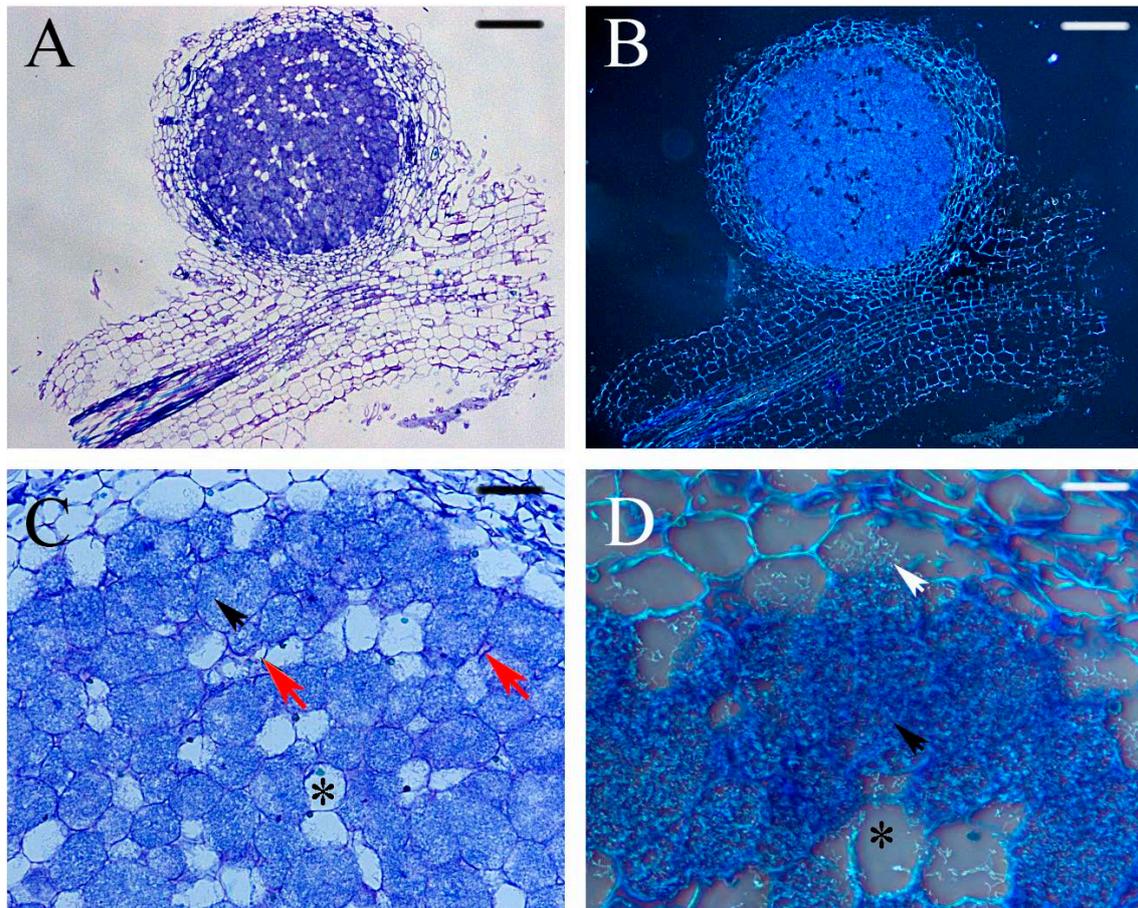
En esta coinoculación, al igual que en la coinoculación anteriormente observada con *Streptomyces* sp. CSLC56N, observamos diferencias en cuanto a la estructura interior de las células del nódulo. En ningún caso, en las inoculaciones simples realizadas con *M. jarvisii* CSLC28N hemos observado estas estructuras tan peculiares, por lo que deducimos que tiene que ser debido a la coinoculación realizada con cada una de estas dos cepas endófitas. No obstante, a pesar de esta estructura interna, el nódulo no pierde eficiencia tal y como hemos observado por su coloración rosácea,

sinónimo de fijación de nitrógeno, y por su morfología perfectamente globular en ambos casos.



**Figura 109.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. chokoriensis* CSLC88N. Vemos un interior nodular con células rotas y poco definidas, mucha ocupación bacteriana y canales de infección. Flecha negra: simbiosomas; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

Los nódulos correspondientes a las plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *B. aryabhatai* CSLC41N (figura 110) presentan una organización interna similar a la coinoculación observada para *M. jarvisii* CSLC28N y *B. aryabhatai* CSLC41N. La cepa de *Bacillus* no altera la estructura interna del nódulo. Este se encuentra organizado, pero se observa degradación de paredes celulares, así como bacterias ocupando células vacías de forma dispersa. En cualquiera de las dos coinoculaciones vistas con *B. aryabhatai* CSLC41N vemos que este es capaz de convivir con las dos cepas del género *Mesorhizobium*, creciendo las plantas coinoculadas con dichas cepas de forma adecuada. Nuevamente volvimos a aislar del interior de los nódulos ambas cepas coinoculadas (apartado 9.4).



**Figura 110.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *B. aryabhatai* CSLC41N. Tienen una buena organización interna, con la mayoría de las células invadidas por células diferenciadas. También se observan bacterias dispersas y canales de infección. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula no invadida; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

En la figura 107 vimos que la coinoculación con *Arthrobacter* sp. CSLC46N el nódulo presentaba una estructura interna desorganizada, sin células definidas. En el caso de los nódulos presentes en las plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N (figura 111) vemos una estructura interna totalmente diferente. En esta ocasión la cepa de *Arthrobacter* no parece causarle un perjuicio al interior del nódulo. Vemos células bien formadas, invadidas por bacterias diferenciadas en simbiosomas bien definidos y observamos pocas células vacías. Observamos alguna bacteria aislada por el interior de estas células vacías, pero nada que ver a los nódulos vistos en la coinoculación con *M. jarvisii* CSLC28N.

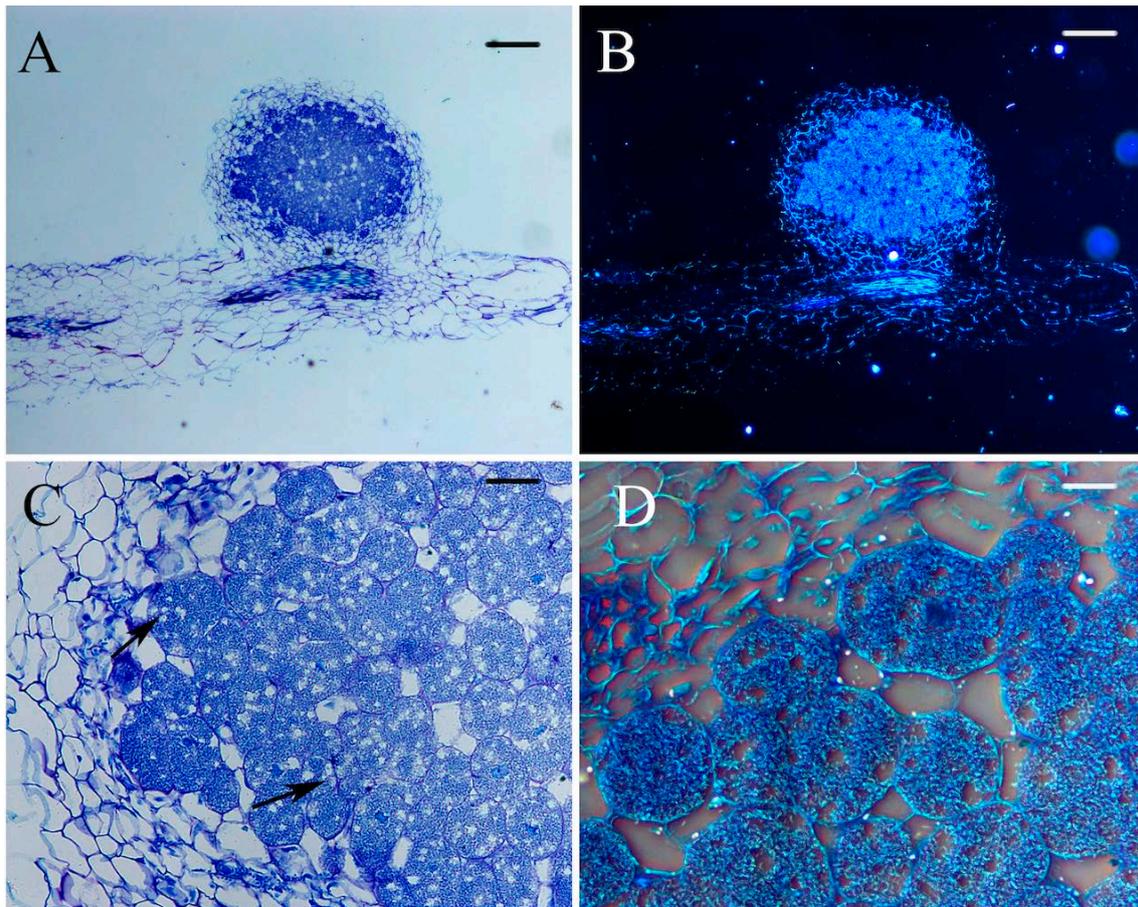


Figura 111. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N. Tienen una buena organización interna, con células invadidas por bacterias diferenciadas. Flecha negra: célula invadida. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

Los siguientes nódulos en analizar fueron los correspondientes a las plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N (figura 112). En la coinoculación vista anteriormente con dicho endófito y *M. jarvisii* CSLC28N vimos que aunque las células estaban bien definidas, había mucha ocupación de *Streptomyces* sp. CSLC56N indistintamente por el nódulo. En esta ocasión en cambio vemos un nódulo con una estructura interna perfectamente definida y organizada. Las células están ocupadas por los típicos simbiosomas y las células vacías están limpias, sin restos del *Streptomyces*. Aunque podríamos pensar en un principio que lo mismo *Streptomyces* sp. CSLC56N no consiguió entrar en el interior del nódulo, al aislar los nódulos correspondientes a dicha coinoculación crecieron las dos cepas coinoculantes (apartado 9.4).

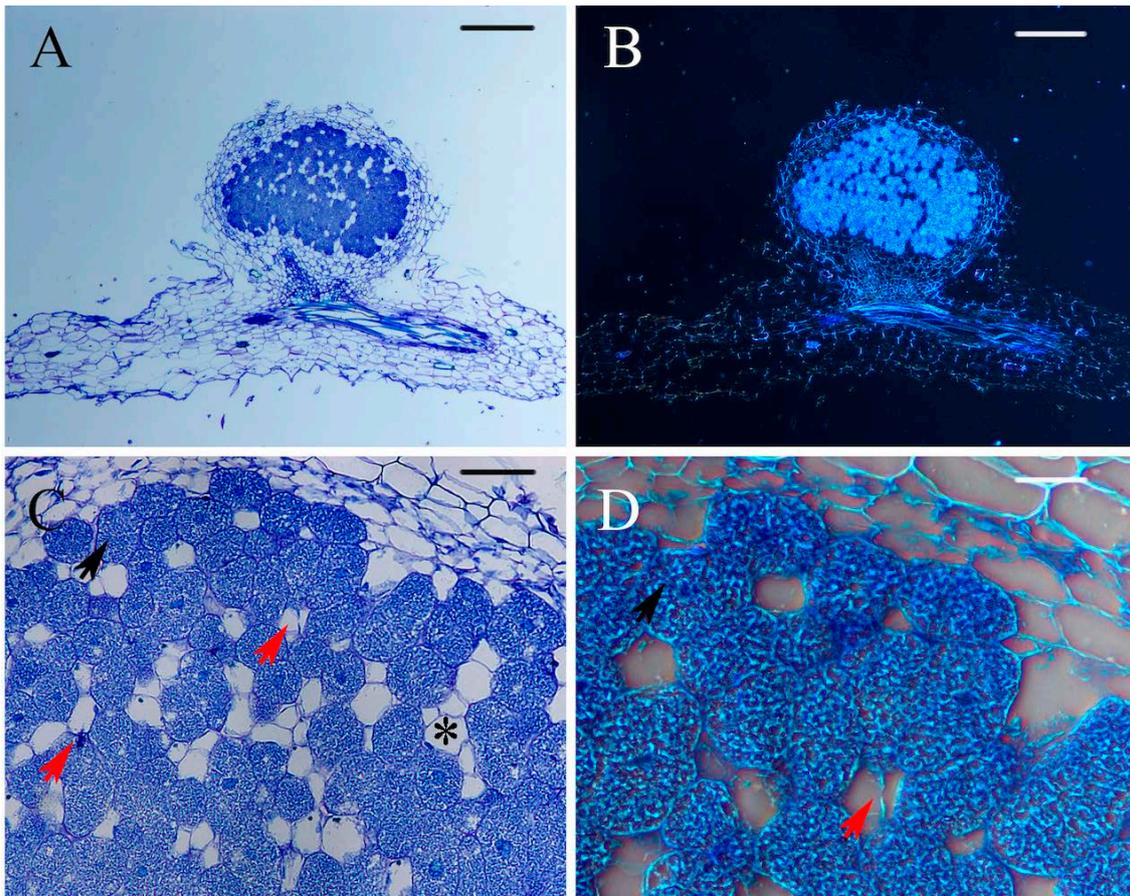


Figura 112. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N. Tienen una buena organización interna, con bacterias claramente diferenciadas. También observamos células que no consiguieron ser invadidas y canales de infección. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula sin invadir; flecha roja: canal de infección. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

Finalmente llegamos a la coinoculación realizada con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. chokoriensis* CSLC88N (figura 113). En la coinoculación realizada con dicho endófito y *M. jarvisii* CSLC28N vimos un nódulo con una estructura interna poco definida, debido a que presentaba bastantes células con la pared celular degradada. En esta coinoculación, observamos alguna pequeña diferencia pero no tan acusada como en la coinoculación realizada con *M. jarvisii* CSLC28N. En rasgos generales vemos una estructura interna definida y organizada. El porcentaje de células ocupadas es bastante alto con los simbiosomas bien definidos. Sin embargo, observamos bacterias agrupadas y dispersas en el interior de las células vacías. Nuevamente volvimos a aislar del interior de los nódulos ambas bacterias (apartado 9.4).

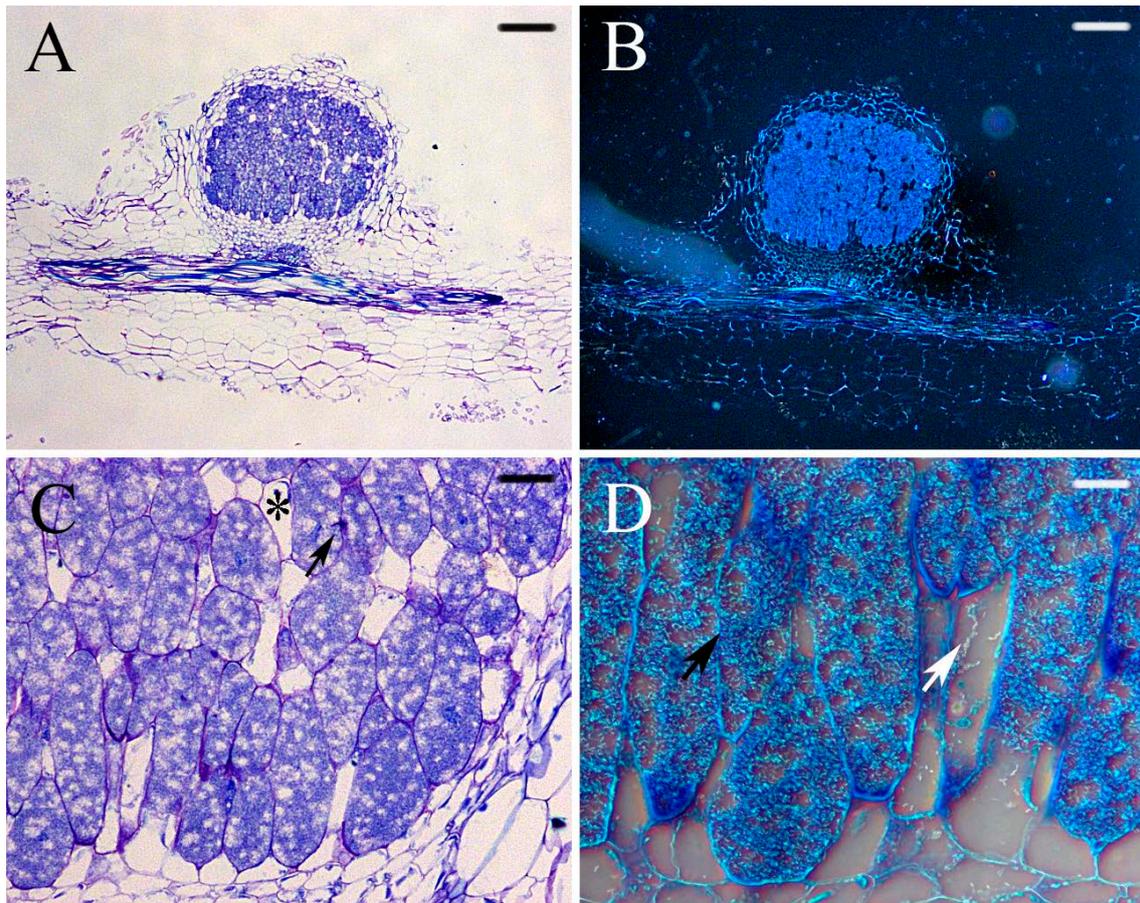


Figura 113. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. chokoriensis* CSLC88N. Tienen una buena organización interna, observando bacterias diferenciadas y también algunas formando pequeñas agrupaciones. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula sin invadir; flecha blanca: bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

#### 10.4. Aislamiento a partir de nódulo.

Para corroborar que efectivamente las cepas endófitas son capaces de entrar en el nódulo se esterilizaron en superficie una serie de nódulos de cada uno de los diferentes tratamientos con el objetivo de aislar las cepas que fueron previamente inoculadas en dichas plantas.

A excepción de *Arthrobacter* sp. CSLC46N, de las cuales no conseguimos visualizar colonias que crecieran a raíz del aislamiento de las plantas coinoculadas con la misma, del resto de tratamientos conseguimos aislar eficientemente las dos cepas coinoculadas (figura 114). También se aislaron las dos cepas de *Mesorhizobium* de sus correspondientes inoculaciones simples.

Cabe la posibilidad de que las dos cepas del género *Mesorhizobium* al crecer más rápido que la cepa de *Arthrobacter* sp. CSLC46N, colonice la superficie del medio de cultivo, impidiendo de esta forma dejar crecer a la cepa de *Arthrobacter*.

Esto demuestra que las cepas no solo consiguen entrar en el nódulo, sino que además son capaces de vivir con la cepa noduladora. A pesar de que en algunos de los tratamientos de coinoculación el recuento total de nódulos en las plantas fue inferior a otros, las plantas mostraron un aspecto sano con una coloración de sus hojas normal, por lo que estas cepas endófitas son capaces de convivir con la planta de una forma normal, sin causarle perjuicio alguno.

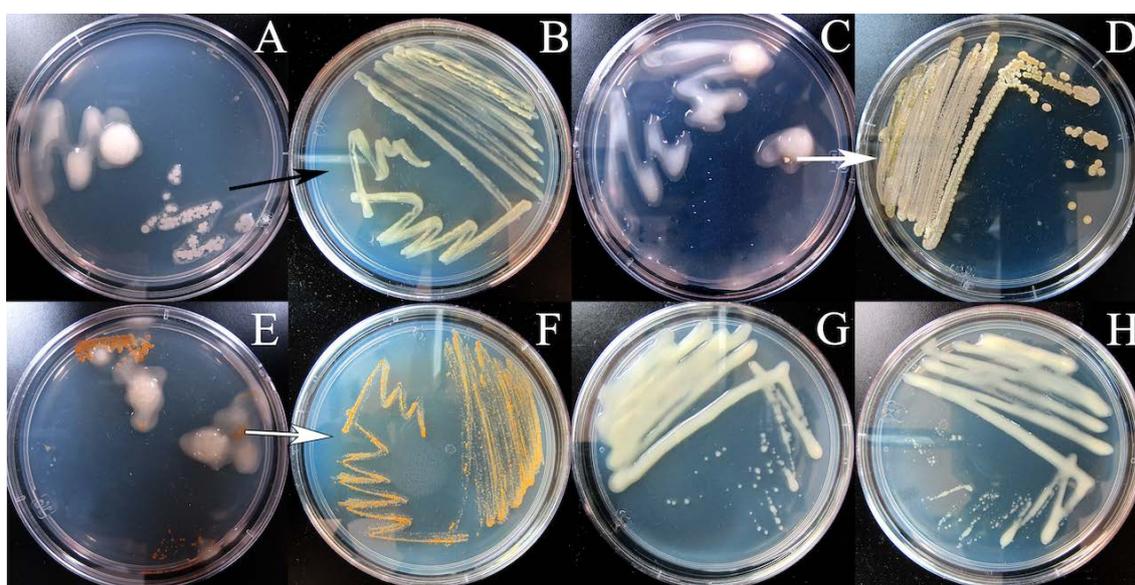


Figura 114. Imágenes realizadas después de esterilizar nódulos representativos de los diferentes tratamientos llevados a cabo (apartado 9). Esterilización de la coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N – *B. aryabhatai* CSLC41N (A); aislamiento de *B. aryabhatai* CSLC41N (B), esterilización de la coinoculación *Mesorhizobium* sp. CSLC35N – *Streptomyces* sp. CSLC56N (C); aislamiento de *Streptomyces* sp. CSLC56N (D); esterilización de la coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N – *M. chokoriensis* CSLC88N (E); aislamiento de *M. chokoriensis* CSLC88N (F); aislamiento de *M. jarvisii* CSLC28N (G); aislamiento de *Mesorhizobium* sp. CSLC35N.

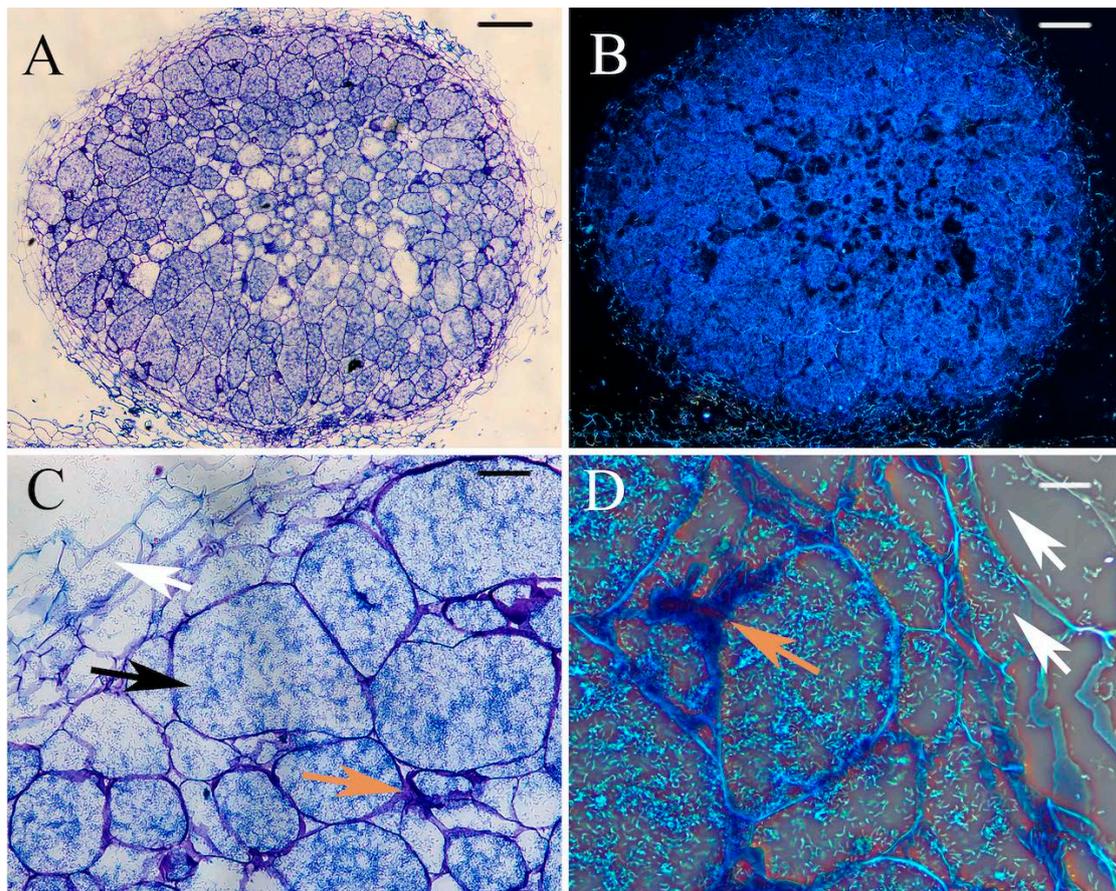
## 11. Ensayos de coinoculación en invernadero (microcosmos).

### 11.1. Histología nodular.

Los tratamientos monoxénicos (en tubo) que se llevaron a cabo anteriormente en el apartado 9 se realizaron también en invernadero, utilizando como soporte tierra de la armuña no estéril. Los objetivos de estos ensayos los veremos en el capítulo VI. En este apartado vamos a ver cortes histológicos de una selección de nódulos efectivos representativos de cada uno de los tratamientos que se llevaron a cabo. El objetivo concreto de este apartado era tratar de ver la organización interna de los mismos con el fin de ver similitudes y/o diferencias entre las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos. Hay que tener en cuenta que la tierra que fue utilizada como soporte no fue esterilizada para tratar de asemejar las condiciones en las que estas plantas estarían en el campo. Por ello es posible que no sólo los inoculantes sean capaces de entrar en el

interior de los nódulos, sino también parte de las bacterias que constituyan la microbiota de la tierra.

Las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos con *M. jarvisii* CSLC28N, tanto la inoculación simple como las coinoculaciones con los diferentes endófitos, muestran nódulos de morfología determinada y más grande que los vistos con anterioridad en el ensayo hidropónico. Ello resulta lógico, ya que las plantas disponen de mayor espacio para desarrollarse y crecer. El interior de los mismos presenta una estructura interna perfectamente organizada, no viendo estructuras raras en ningún caso. Las células ocupadas presentan bacterias diferenciadas en simbiosomas y se encuentran estas en mayor proporción que las células vacías. En el interior de estas últimas podemos ver bacterias dispersas y formando agrupaciones. Vemos, además, en el interior de las células vacías las bacterias colocadas de forma característica en hilera, atravesando las células de lado a lado. También observamos zonas de degradación de las paredes celulares. Todas estas características las vemos en las siguientes figuras que siguen a continuación (figuras 115-119).



**Figura 115.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N. Tienen una buena organización interna, con células perfectamente definidas y bacterias diferenciadas. Observamos bacterias dispersas y canales de infección. Flecha negra: célula invadida; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200 µm (A y B); 50 µm (C); 25 µm (D).

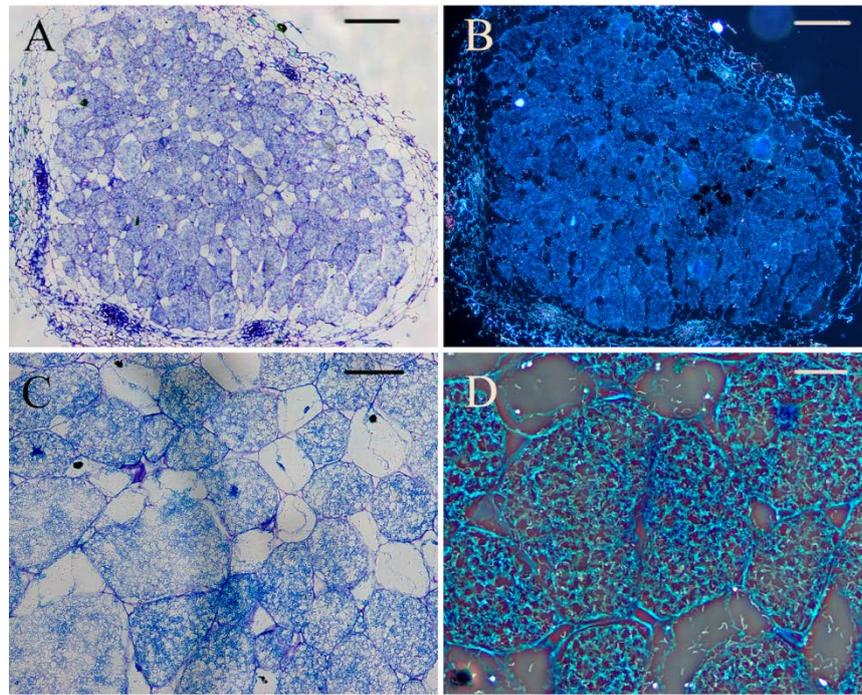


Figura 116. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *B. aryabhatai* CSLC41N. Tienen una buena organización interna, con algunas células sin invadir y bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

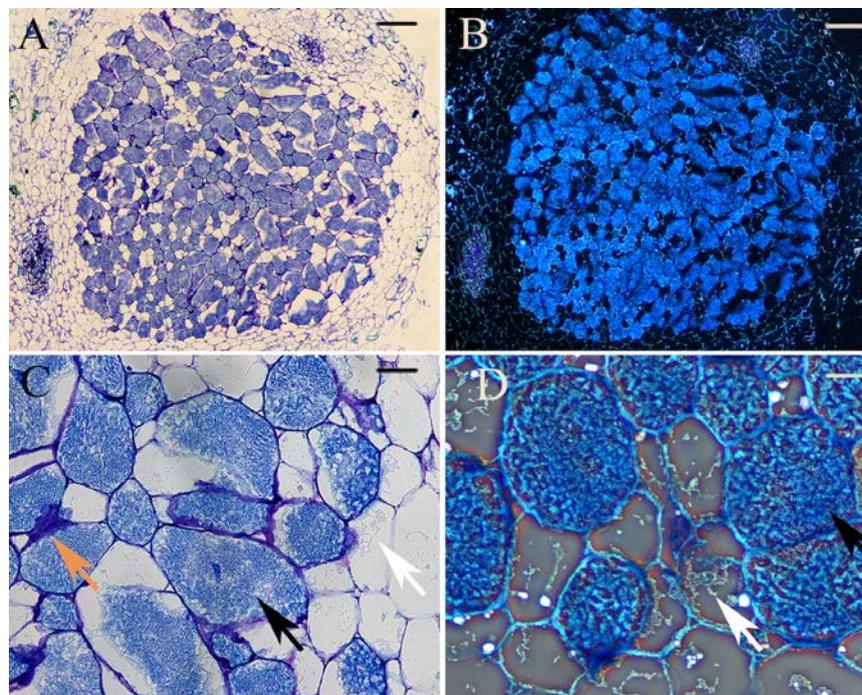


Figura 117. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N. Tienen una buena organización interna, con zonas de degradación de paredes celulares y bacterias formando agrupaciones. Flecha negra: célula invadida; flecha blanca: bacterias dispersas; flecha naranja: infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

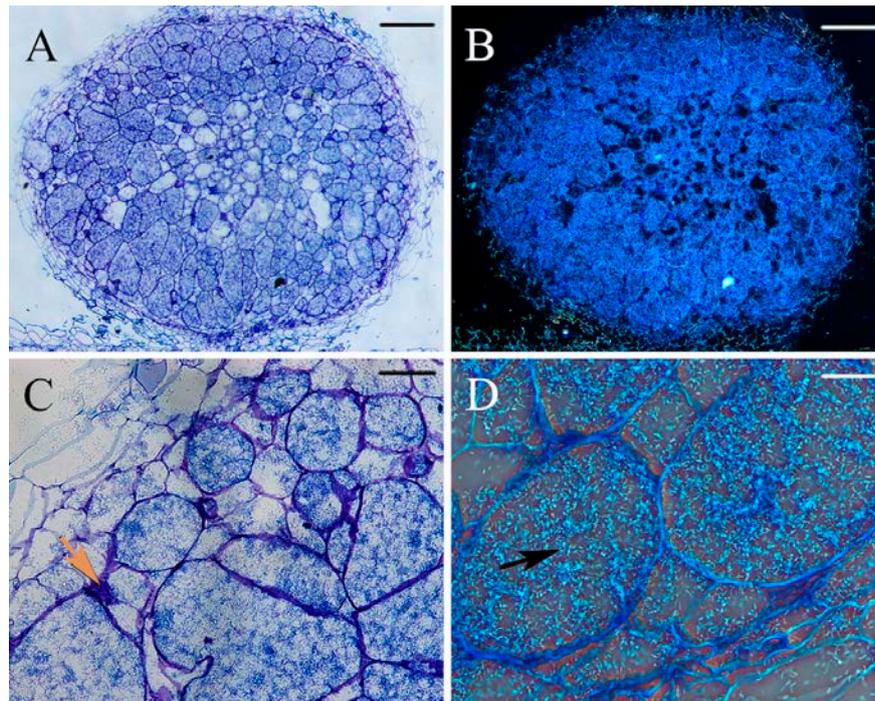


Figura 118. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Streptomyces* sp. CSLC56N. Tienen una buena organización interna, con zonas de degradación de paredes celulares y bacterias formando agrupaciones. Flecha negra: célula invadida; flecha naranja: infección intercelular. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

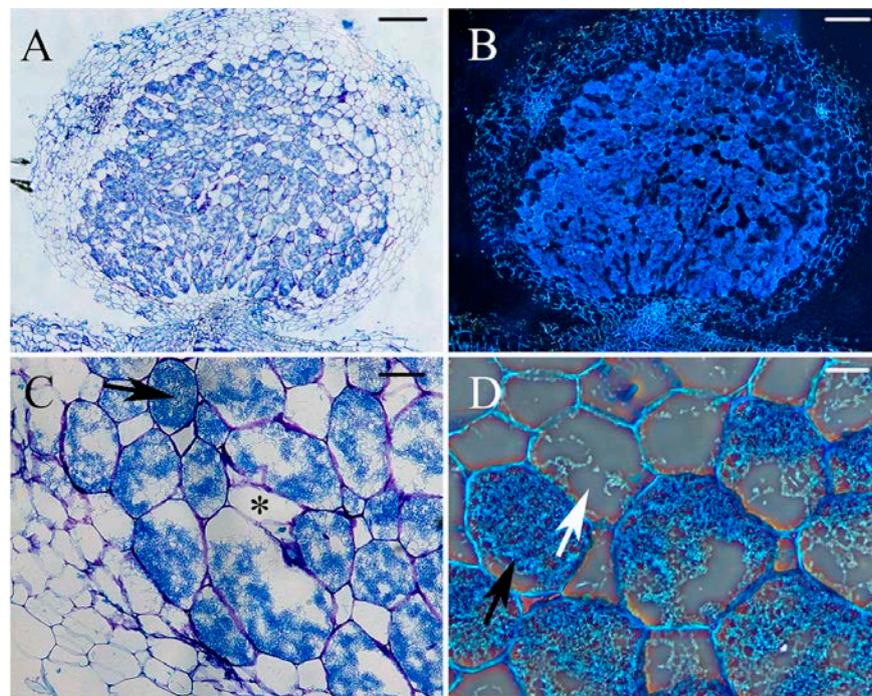
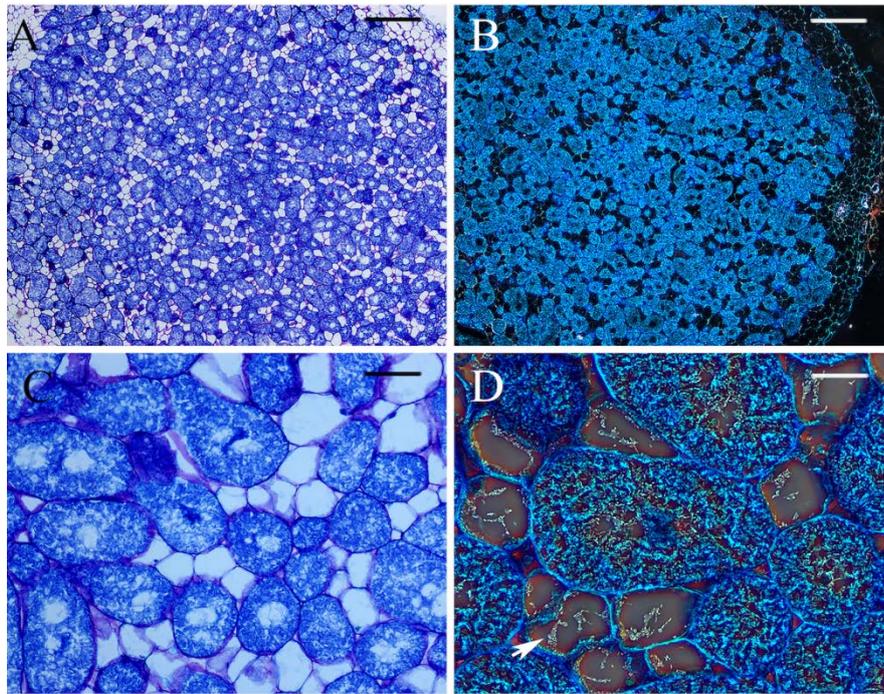


Figura 119. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. chokoriensis* CSLC88N. Tienen una buena organización interna, pero presentan bastantes células vacías. Bacterias dispersas en las células no ocupadas por simbiosomas. Flecha negra: célula invadida; asterisco: célula no invadida; flecha blanca: bacterias dispersas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

Las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, tanto la inoculación simple como las coinoculaciones con los diferentes endófitos, muestran nódulos similares a los vistos en las inoculaciones con *M. jarvisii* CSLC28N en las figuras 120-124. Tienen un tamaño también más grandes que los vistos en los ensayos hidropónicos de coinoculación. El interior de los mismos presenta también una estructura interna organizada, pero con la particularidad de que presentan más células vacías sin invadir, que con respecto a los nódulos vistos en las coinoculaciones respectivas en cultivo hidropónico. En este caso también vemos más bacterias dispersas formando agrupaciones. También observamos algunas zonas de degradación de las paredes celulares vegetales. En cualquier caso, vemos nódulos perfectamente definidos y formados que mantienen la estructura interna perfectamente íntegra. Todas estas características las vemos en las siguientes figuras que siguen a continuación (figuras 120- 124).



**Figura 120.** Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N. Tienen una buena organización interna, pero presentan bastantes células vacías. También se observan células ocupadas por bacterias diferenciadas, así como bacterias dispersas. Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

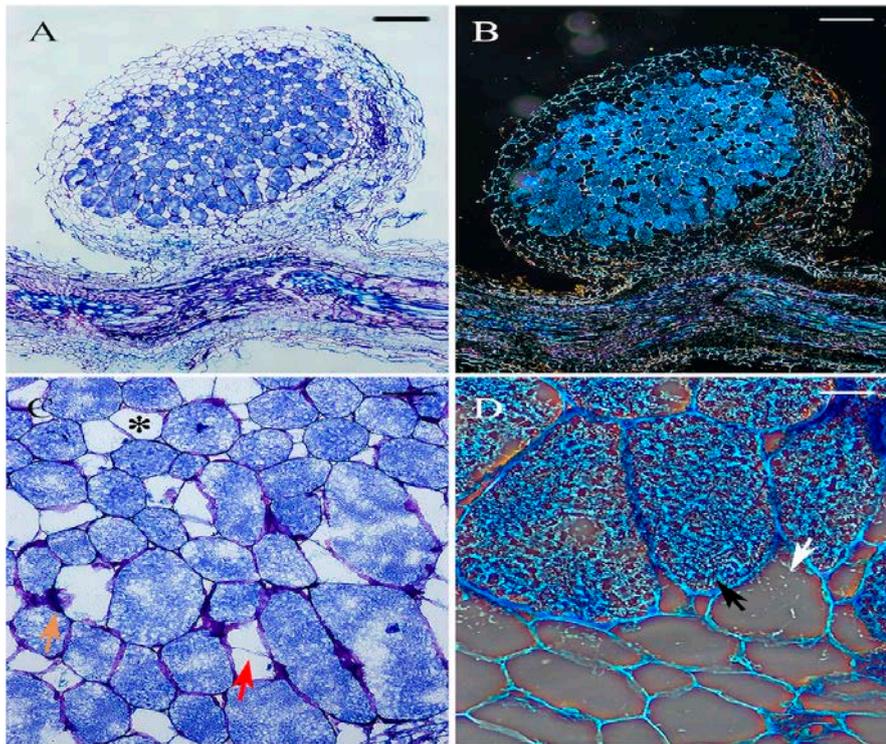


Figura 121. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Bacillus aryabhattai* CSLC41N. Vemos zonas de degradación de paredes celulares. Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu$ m (A y B); 50  $\mu$ m (C); 25  $\mu$ m (D).

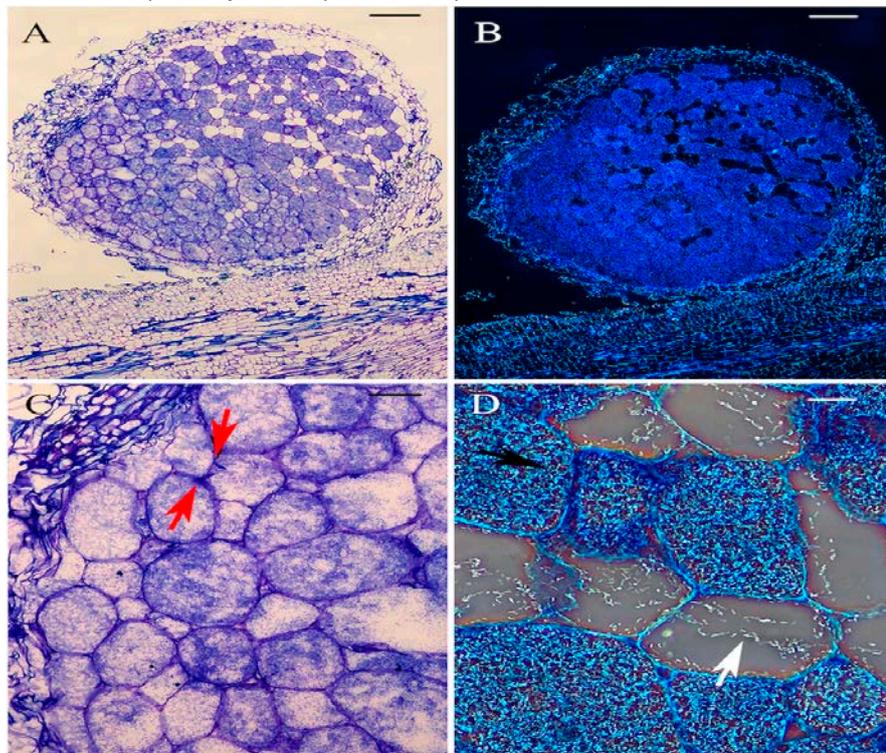


Figura 122. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N. Se observan canales de infección y bacterias dispersas formando hileras. Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu$ m (A y B); 50  $\mu$ m (C); 25  $\mu$ m (D).

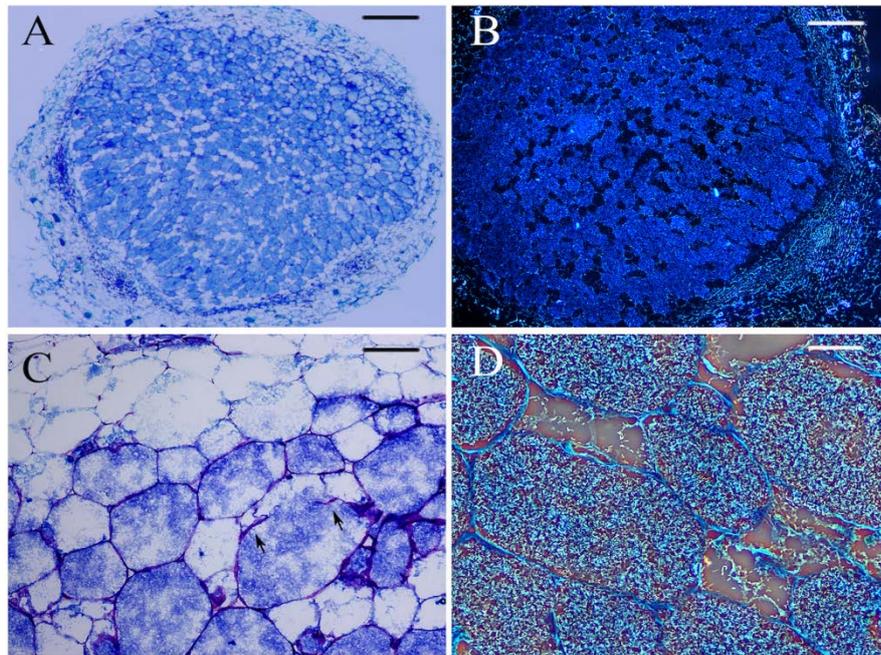


Figura 123. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N. Vemos canales de infección y bacterias dispersas fuera de las células invadidas. Las flechas señalan los eventos referidos en el texto. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

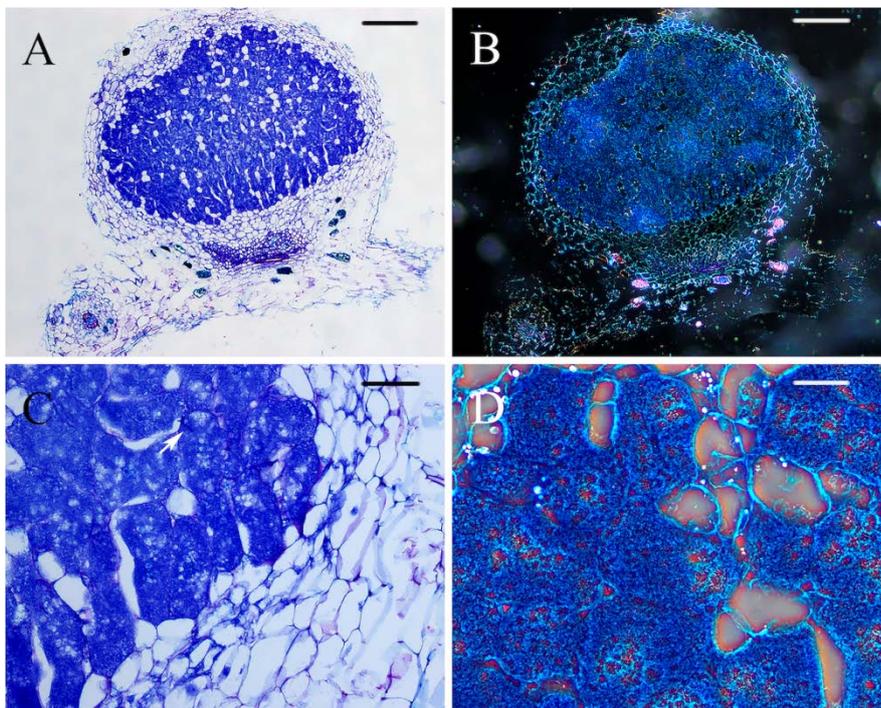


Figura 124. Cortes histológicos realizados en nódulos de *L. corniculatus* cuyas plantas fueron inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. chokoriensis* CSLC88N. Tienen una buena organización interna, con células ocupadas por bacterias diferenciadas. Correspondencia de las escalas: 200  $\mu\text{m}$  (A y B); 50  $\mu\text{m}$  (C); 25  $\mu\text{m}$  (D).

Todos los ensayos realizados en el presente capítulo nos llevan a confirmar que las cepas aisladas en este estudio identificadas dentro del género *Mesorhizobium*, no sólo son capaces de volver a nodular su planta hospedadora, sino que además permiten un desarrollo vegetativo normal y sano para la planta. Hemos demostrado que no solamente las tres cepas endófitas de *L. corniculatus* son capaces de nodular su hospedador, sino que existen diferentes especies dentro de este género capaces de nodular y convivir en esta leguminosa. Incluyendo también la nueva especie descrita, *M. helmanticense*. Las diferencias existentes entre ellas derivan en el porcentaje de ocupación nodular, encontrando una única cepa, *Mesorhizobium* sp. CSLC30N, que aunque nodula de manera eficiente la planta, su porcentaje de ocupación celular es bajo. Así mismo, también encontramos diferencias relacionadas con la cinética de nodulación y como hemos podido observar, existen cepas con una cinética líneal y creciente y más rápida que otras, convirtiéndolas en cepas mejor noduladoras.

Además, hemos podido observar y comparar la nodulación ejercida por las tres cepas tipo endosimbiontes de *L. corniculatus* con las 38 cepas aisladas del género *Mesorhizobium*, comprobando que tienen una nodulación similar y paralela, con la única diferencia de que nuestras cepas de estudio son, en una amplia mayoría, mejor noduladoras que los endosimbiontes naturales.

También hemos podido constatar la nodulación establecida con dos cepas del género *Mesorhizobium*, *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, y cuatro cepas endófitas pertenecientes a diferentes géneros: *Micromonospora*, *Arthrobacter*, *Streptomyces* y *Bacillus*. Hemos comprobado que la nodulación se desarrolla de manera normal, sin causarle perjuicio alguno para la planta, pudiendo afirmar que estas bacterias endófitas consiguen entrar dentro de las células invadidas de los nódulos. No sabemos si consiguen entrar por medio de los canales de infección previamente establecidos por las cepas rizobianas, o si rompen la pared celular una vez que el nódulo está formado y ocupado por el endosimbionte. Pero está claro que consiguen introducirse en el interior del nódulo y convivir con la bacteria endosimbionte.

No es la primera vez que se realizan estudios de coinoculación de cepas rizobianas con endófitas (Solans et al. 2015). Estos autores estudiaron el efecto que ejercen las actinobacterias en la leguminosa *Lotus tenuis*, demostrando la potencial aplicación agronómica que estas bacterias poseen. Más específicamente, los resultados obtenidos tras estos estudios mostraron un aumento tanto de la biomasa vegetal de la leguminosa como de la nodulación cuando se realizó la coinoculación del endosimbionte *M. loti* con tres cepas de tres géneros diferentes de actinobacterias: *Streptomyces*, *Actinoplanes* y *Micromonospora*. Sin embargo, ellos sugieren que el potencial efecto se debe al efecto que las actinobacterias ejercen al inicio del proceso de infección y nodulación en las raíces de la leguminosa, manteniendo durante un tiempo más prolongado la tasa inicial de nodulación que cuando se realiza la inoculación simple con *M. loti*. Este efecto lo atribuyen a que las actinobacterias probablemente sean capaces de interferir en los niveles hormonales de la planta, debido a que encontraron que estas cepas son capaces de producir hormonas en cultivo *in vitro*.

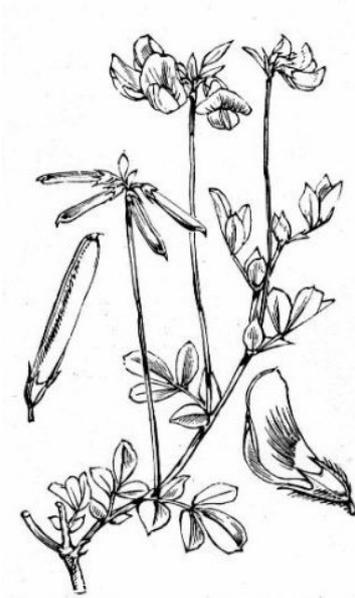
Este estudio nos muestra la capacidad que presentan las actinobacterias de convivir en diferentes especies de *Lotus*, con los rizobios endosimbiontes de las mismas, y a su vez promover un efecto positivo en las plantas. Todos estos resultados preliminares, tanto los obtenidos por Solans *et al.* (2015), como los obtenidos en el presente trabajo, nos confirman el potencial agronómico que presentan las actinobacterias y la importancia de seguir trabajando y estudiando su efecto y su comportamiento en coinoculación con los bacterias endosimbiontes de las leguminosas.

De los resultados de este estudio también podemos afirmar que se establece una nodulación positiva y eficiente en plantas de *L. corniculatus* coinoculadas con especies diferentes del género *Mesorhizobium* y *B. aryabhatai*, formándose nódulos eficientes y bien definidos. Estudios llevados a cabo por Saini *et al.* (Saini *et al.* 2015) mostraron el resultado que conlleva realizar inoculaciones con cepas del género *Mesorhizobium* y *Bacillus* de manera simultánea. Estos ensayos se realizaron en plantas de garbanzo, donde observaron un aumento del crecimiento de la planta, de la nodulación, así como de los parámetros de fijación de nitrógeno, destacando por encima de la inoculación simple con la cepa de *Mesorhizobium*.

Un biofertilizante compuesto por una bacteria fijadora de nitrógeno, simbionte de la planta y otra endófito con capacidad, ambas, PGPR podría garantizar la promoción del crecimiento vegetativo de la planta, a la vez que se aumenta tanto el rendimiento del grano, como la absorción de N y P. Estos resultados fueron obtenidos por Wani y Khan (Wani *et al.* 2007), donde observaron el efecto tan productivo de realizar coinoculaciones múltiples con diferentes microorganismos en plantas de garbanzo. Los ensayos se fundamentaron en realizar coinoculaciones triples con la cepa endófito *Mesorhizobium ciceri* RC4 que fue combinada, simultáneamente, con las cepas *Azotobacter chroococcum* A10, *Bacillus* PSB 9 y *Pseudomonas* PSB 5. De las diferentes combinaciones de estas coinoculaciones triples, obtuvieron resultados muy interesantes relativos al rendimiento de la semilla, obteniendo una proteína de grano más alta, así como un incremento de la concentración de P y de N en planta.

Con nuestros estudios hemos podido comprobar el alto potencial que proporciona el empleo de dos inoculantes microbianos de forma simultánea. Un futuro biofertilizante constituido por un endosimbionte fijador de nitrógeno y un endófito PGPR le proporcionarían a la planta, por un lado, la capacidad de adquirir más nutrientes a través de la fijación de N, la solubilización de fosfato y la producción de sideróforos, así como de conferirle una mayor expansión del sistema radicular a través de la auxina ácido 3-indol-acético, que además podría proporcionarle resistencia frente a patógenos externos, actuando de esta manera, el microorganismo productor de dicha fitohormona, como agente de biocontrol. Las combinaciones que se pueden estudiar son infinitas y muchos de los resultados están aún por descubrir, de ahí la importancia de seguir trabajando para obtener el biofertilizante que garantice un mayor rendimiento agrícola.

Análisis de los procesos de  
colonización e infección de raíces en  
*Lotus corniculatus*.



CAPÍTULO V



La interacción que se establece entre los rizobios y sus correspondientes plantas hospedadoras pertenecientes a la familia Fabaceae es un sistema modelo para entender las bases ecológicas y evolutivas del mutualismo (Kiersi y Denison 2008).

La simbiosis que se establece entre los rizobios y las leguminosas conlleva una serie de complejos pasos provocados por el intercambio de señales moleculares y complejos programas de desarrollo, que conllevan a la organogénesis de nódulos en las raíces de las leguminosas hospedadoras y a la diferenciación de los microsimbiontes en bacteroides (van Rhijn y Vanderleyden 1995; Dénarié et al. 1996; Oke y Long 1999).

Pero para que se establezca una interacción simbiótica exitosa el rizobio debe penetrar en su hospedador. Se conocen tres entradas de invasión del rizobio en el interior de su hospedador: mediante canales de infección (estructuras tubulares) a través de los pelos radiculares (también conocida como infección canónica); a través de “cracks”, heridas o grietas directamente en la pared celular de la planta; y por último penetrando por los espacios intercelulares (Capoen et al. 2010; Madsen et al. 2010; Mateos et al. 2011). Estudios realizados con anterioridad (Gossmann et al. 2012) mostraron que un único genotipo de *Lotus* puede ser infectado a través de diferentes vías.

En la mayoría de las leguminosas la infección más frecuente que se produce con las bacterias rizobianas es la vía canónica. Una vez que las bacterias se encuentran en el interior del pelo, avanzan por los canales de infección hacia el interior del nódulo, donde finalmente se diferenciarán en bacteroides, capaces de reducir el Nitrógeno atmosférico en amonio, asimilable por la planta.

En este estudio decidimos estudiar el proceso de infección que se establece entre las dos cepas del género *Mesorhizobium* previamente seleccionadas en los ensayos de nodulación (capítulo IV), *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, y su planta hospedadora *Lotus corniculatus*. Para poder observar correctamente su interacción, ambas fueron transformadas con una proteína verde fluorescente (GFP). Para poder observar y diferenciar correctamente ambas bacterias en co-inoculación, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N fue transformada con una proteína roja fluorescente (RFP).

### **1. Interacción *M. jarvisii* CSLC28N-*Lotus corniculatus*.**

Los ensayos se realizaron en placa cuadrada a una temperatura de 24°, con un fotoperíodo 16/8 y un 60% de humedad relativa. Las plantas fueron observadas con el microscopio de fluorescencia tras los 3, 5, 7, 10 y 12 días posteriores a su inoculación (DPI).

Una vez que se establece el contacto previo entre la planta hospedadora y el rizobio, se produce la adhesión y colonización bacteriana. *M. jarvisii* CSLC28N coloniza la superficie radicular pasados 3 DPI así como los pelos, en los que observamos cierta curvatura y degradación del ápice del pelo radical (figura 125A y B).

Pasados 3 DPI observamos una colonización muy activa de la bacteria. Hay una gran cantidad de pelos radicales curvados, algunos de los cuales se encuentran en forma de cayado de pastor o “*Shepherd Crook*” (Shaw et al., 2000).

En la figura 125C observamos “caps”. La bacteria ha conseguido adherirse al extremo apical del pelo y formar un biofilm. También observamos sobre el mismo pelo un canal de infección que atraviesa el cortex. La colonización de esta bacteria en la planta es muy activa, extendiéndose por la superficie radicular y los pelos radicales.

El curling formado en el pelo radicular de *L. corniculatus* observado en la figura 125D, muestra la típica infección canónica, que como comentábamos con anterioridad es la infección más frecuente que suele producirse entre el rizobio y la leguminosa. En ella se observa claramente el inicio del canal de infección en la punta del pelo radicular, y cómo va extendiéndose hasta atravesar las células del córtex vegetal hacia el interior del nódulo. En las figuras 125E y 125F podemos observar varios canales de infección en pelos adyacentes.

Finalmente en la imagen G de la figura 125 observamos un nódulo completamente formado e invadido por la bacteria transformada con la proteína verde fluorescente (GFP).

Todas estas observaciones nos llevan a confirmar que la interacción que se produce entre *M. jarvisii* CSLC28N y *L. corniculatus* transcurre de manera normal, hasta formar un nódulo eficiente y funcional.

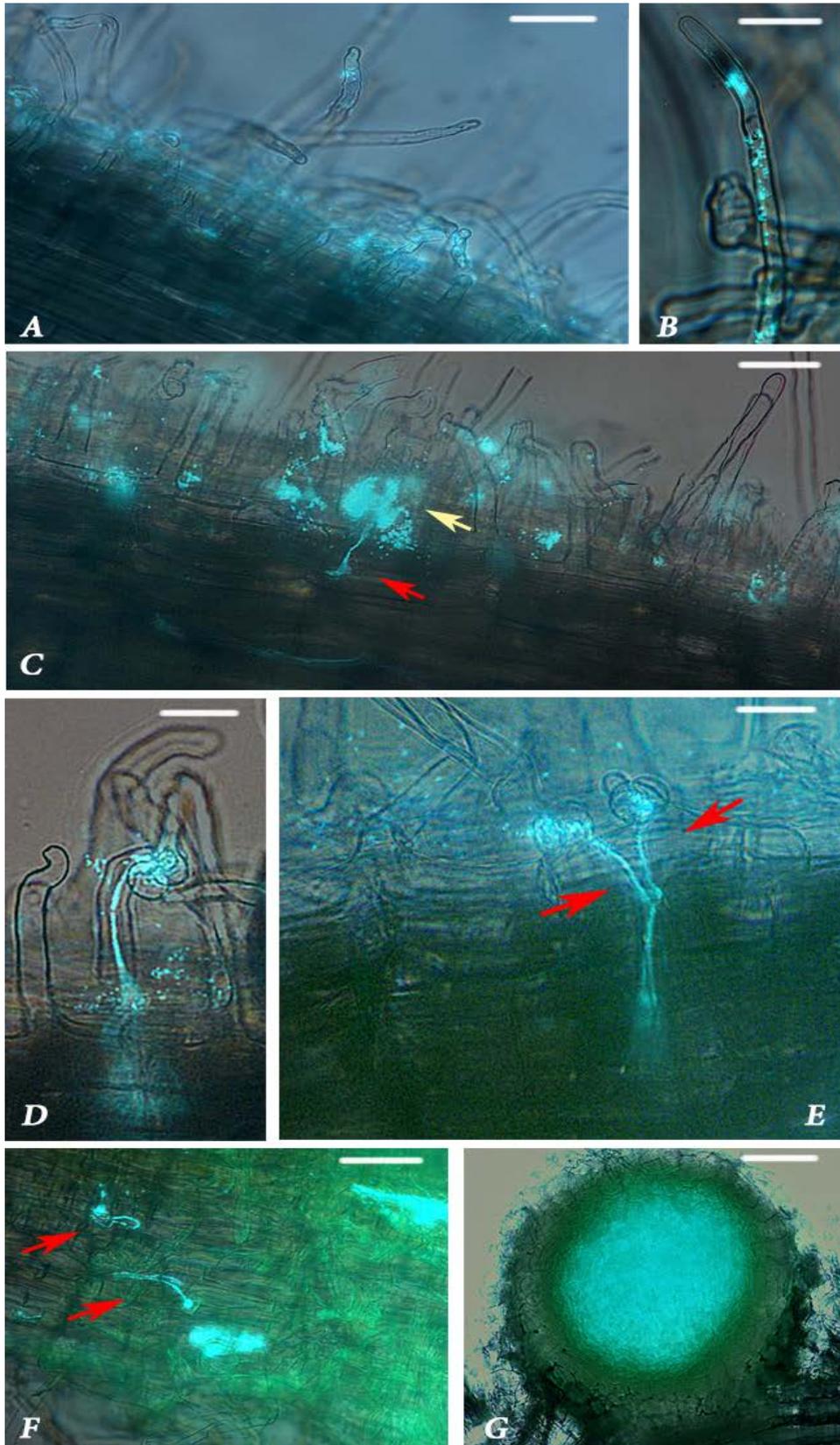


Figura 125. Fotografías realizadas con el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i), donde podemos observar la colonización realizada por *M. jarvisii* CSLC28N sobre raíces de *L. corniculatus*. Adhesión y colonización radicular y pilosa (A y B); formación de “caps” (C); formación de canales de infección (C, D, E y F); nódulo infectado (G). Flecha roja: canal de infección; flecha amarilla: biofilm. Correspondencia de las escalas: 100  $\mu$ m (G); 50  $\mu$ m (A, C, D, E y F); 25  $\mu$ m (B).

## 2. Interacción *Mesorhizobium* sp. CSLC35N-*Lotus corniculatus*.

Del mismo modo que se realizó en el apartado anterior con *M. jarvisii* CSLC28N, estudiamos la colonización establecida por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N con *L. corniculatus*, para comprobar que esta transcurre con normalidad y de forma eficiente.

Observamos también una adhesión a la superficie (figura 126C) y a los pelos radiculares, con una colonización muy activa de la planta. Sobre los diferentes curlings formados (Figuras 126A y 126B) vemos que se encuentran las bacterias a su alrededor. Distinguimos también “caps” (Figura 126D), con acumulación de bacterias y el principio de la formación de un canal de infección que atraviesa las células del cortex. Los canales de infección se observan claramente en el interior de pelos curvados, sucediéndose varios sobre una misma raíz (Figura 126E y F).

Nuevamente podemos hablar de una colonización muy activa y eficiente del rizobio sobre su hospedador. *Mesorhizobium* sp. CSLC35N es capaz de infectar la planta de manera exitosa, al igual que *M. jarvisii* CSLC28N estableciendo nódulos efectivos y múltiples sobre las raíces de la misma.

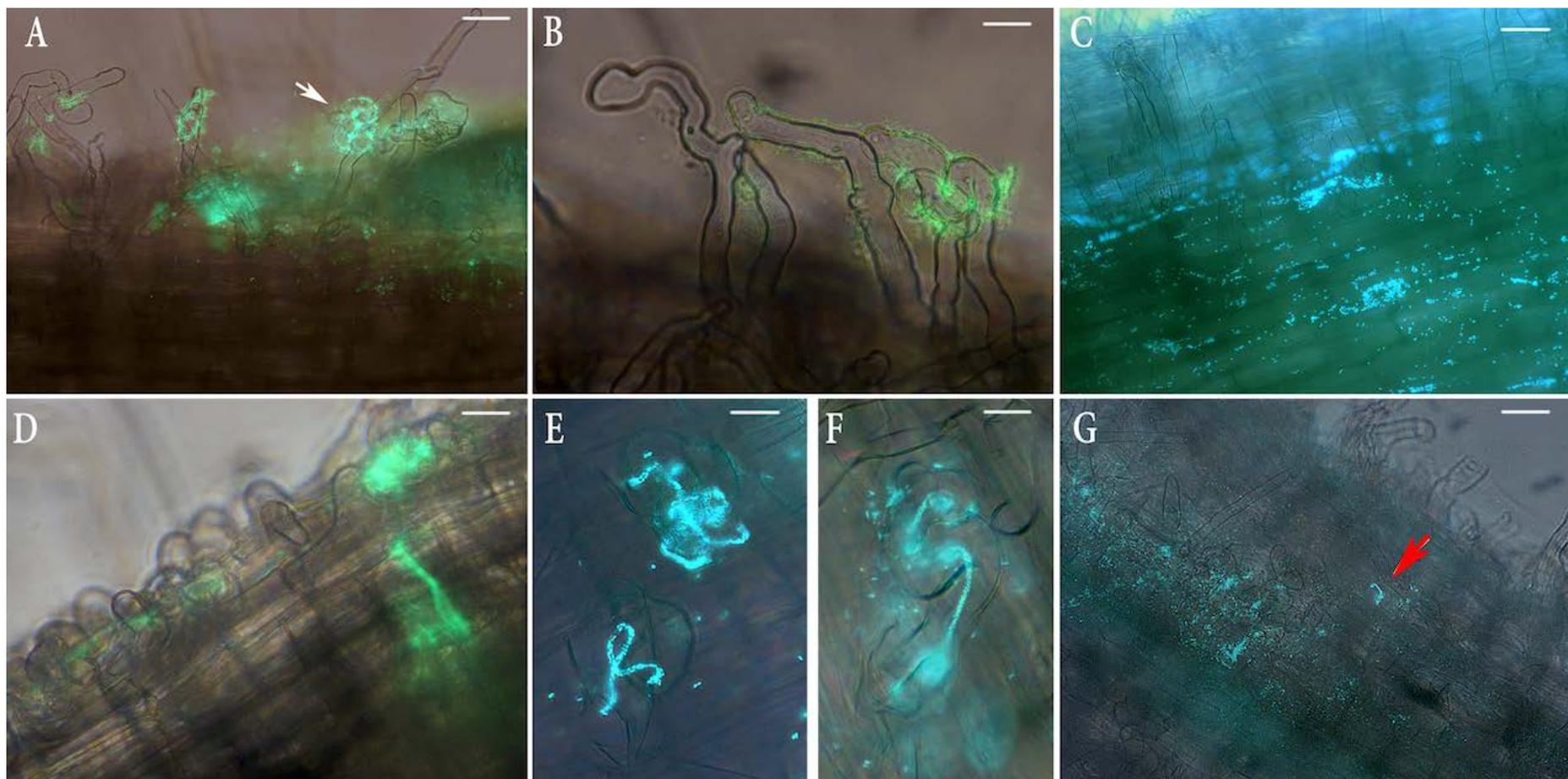


Figura 126. Fotografías realizadas con el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i), donde podemos observar la colonización realizada por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N sobre raíces de *L. corniculatus*. Adhesión y colonización radicular y pilosa, con formación de curlings (A, B C y G), “caps” (D) y canales de infección (D, E, F y G). Flecha roja: canal de infección; flecha blanca: curling. Correspondencia de las escalas: 100  $\mu\text{m}$  (C y G); 50  $\mu\text{m}$  (A); 25  $\mu\text{m}$  (B, D, E y F).

### 3. Interacción conjunta de *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N sobre raíces de *L. corniculatus*.

Una vez comprobado que *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N son capaces de infectar de manera eficiente su hospedador, con una colonización activa hasta finalmente formar nódulos en las raíces de la planta, decidimos hacer ensayos de colonización con ambas bacterias.

El objetivo era comprobar si ambas cepas eran capaces de interactuar con la planta de manera conjunta, observando el grado de competitividad que se podría establecer entre ambas al estar en contacto frente al hospedador.

Para ello se realizaron las coinoculaciones del mismo procedimiento que en los apartados 1 y 2 (según las condiciones descritas en el apartado 6.2. de materiales y métodos.) La bacteria que observamos en verde es *M. jarvisii* CSLC28N, transformada con una proteína verde fluorescente (GFP). La bacteria que vemos en rojo es *Mesorhizobium* sp. CSLC35N transformada con una proteína roja fluorescente (RFP).

En la figura 127 distinguimos los diferentes fenotipos observados durante los días posteriores a la inoculación en planta. Ambas bacterias son capaces de adherirse a la planta e infectarla a través de canales de infección (figura 127A, D y E). En este caso observamos canales de infección individuales, es decir, independientes una bacteria de la otra.

En otras ocasiones (figura 127B), pudimos comprobar cómo *M. jarvisii* CSLC28N entra en el interior de la planta vía canónica, estableciendo un canal de infección que se desarrolla hasta alcanzar el nódulo, donde finalmente se liberan las bacterias. Sobre ese canal de infección que *M. jarvisii* CSLC28N es capaz de iniciar, vemos que posteriormente *Mesorhizobium* sp. CSLC35N también es capaz de entrar. Esto nos podría indicar que *M. jarvisii* CSLC28N es más rápida que *Mesorhizobium* sp. CSLC35N a la hora de entrar en el interior de la planta. En esta misma imagen observamos una clara colonización sobre la superficie radicular de la planta ocasionada por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N.

Si observamos ahora la figura 127C, vemos la situación opuesta. En esta ocasión vemos que *Mesorhizobium* sp. CSLC35N forma un canal de infección que atraviesa las células del cortex e invade el interior del nódulo. Sobre este mismo canal de infección vemos que *M. jarvisii* CSLC28N está entrando, comenzando a invadir ella también el interior del nódulo, previamente invadido por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N. Esta situación nos estaría indicando, que aunque una de las dos cepas sea capaz de entrar al interior de la planta con anterioridad a la otra, formando un nódulo, esta segunda es capaz de entrar por el camino previamente establecido por la primera, siendo capaces de convivir posteriormente las dos en él.

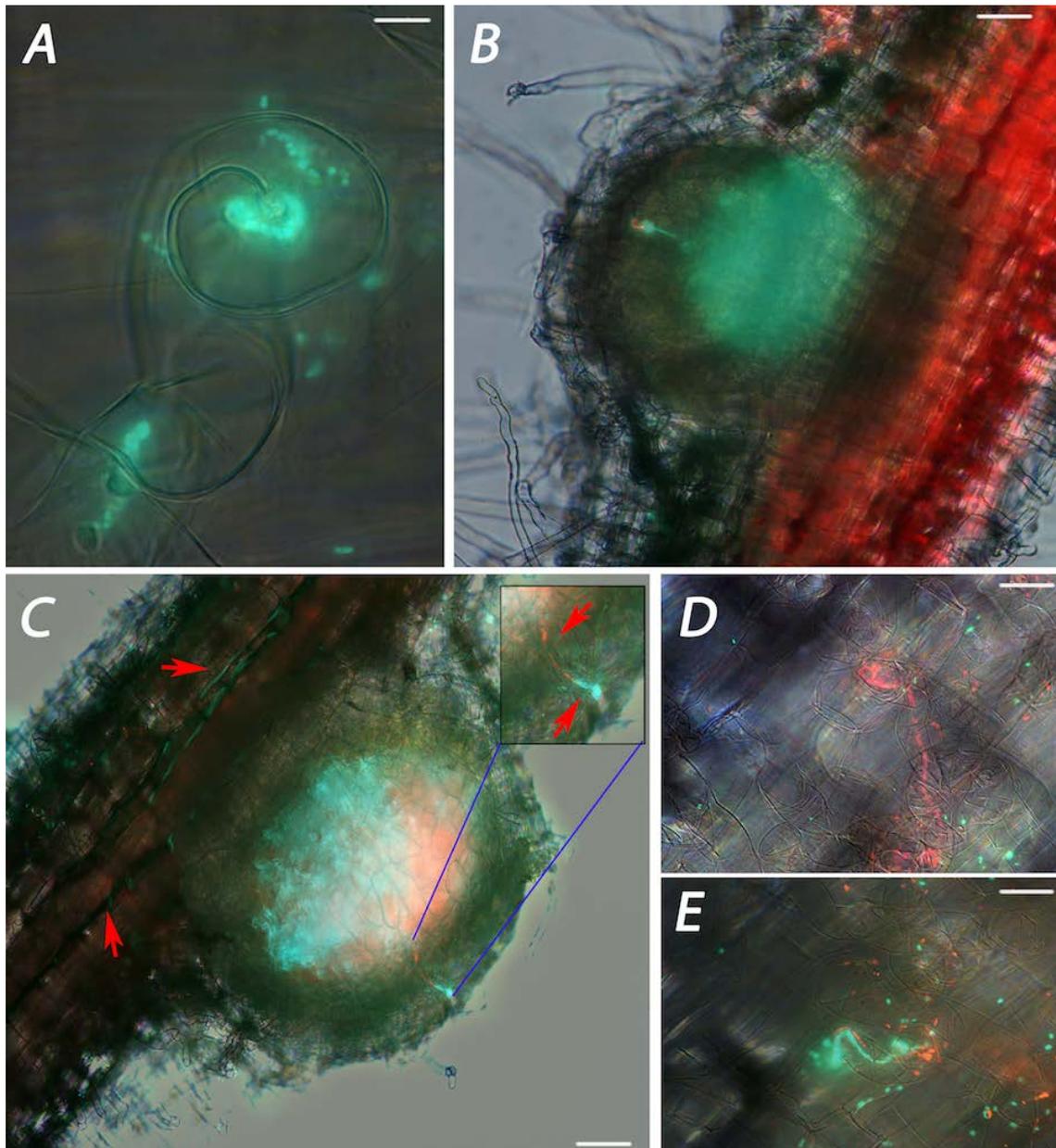


Figura 127. Fotografías realizadas con el microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i), donde podemos observar la colonización conjunta realizada por *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N sobre raíces de *L. corniculatus*. Observamos canales de infección (A, D, y E), así como nódulos invadidos por ambas cepas rizobianas (B y C). Correspondencia de las escalas: 100  $\mu\text{m}$  (B y C); 16  $\mu\text{m}$  (A, D y E).

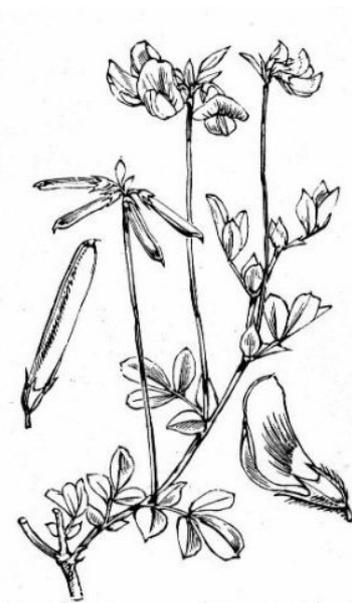
Con estos ensayos hemos podido comprobar que ambas bacterias, *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, son capaces de nodular de manera eficiente *L. corniculatus*, penetrando a nivel intracelular por medio de canales de infección hasta finalmente llegar a formar nódulos funcionales. Además ambas son capaces de colonizar la planta de manera individual y también conjuntamente, sin perjudicarse una a la otra ni a la planta, siendo capaces de convivir en un mismo nódulo.

Con estos resultados alcanzamos el objetivo que nos habíamos marcado y que consistía en ver el proceso de infección. Hemos observado que este se desarrolla de

forma adecuada y normal en ambas cepas, siguiendo todos los pasos estipulados hasta finalmente formar nódulos funcionales.

Además, hemos podido comprobar como las dos cepas son capaces de convivir en una misma raíz, compartiendo canales de infección y nódulos. Esto supone un dato muy importante a tener en cuenta porque cada una de ellas pertenece a una especie diferente dentro del género *Mesorhizobium*, una de las cuales no considerada como endosimbionte natural de *L. corniculatus*.

Evaluación del efecto de inoculantes  
bacterianos seleccionados en la  
producción vegetal de  
*Lotus corniculatus*.



CAPÍTULO VI



El sector agrario y la industria agroalimentaria constituyen un sector decisivo dentro de la economía nacional y europea que demandan la consolidación de líneas de investigación que proporcionen un sólido desarrollo tecnológico. Hasta la fecha, la rentabilidad agrícola ha estado ligada a la aplicación excesiva de fertilizantes y plaguicidas químicos, lo cual ha dado lugar a efectos negativos para el medio ambiente y la salud humana y animal tales como la lixiviación, la contaminación de los recursos hídricos, la destrucción de microorganismos e insectos beneficiosos, la susceptibilidad del cultivo a posibles enfermedades, la acidificación o alcalinización de la tierra o la reducción de la fertilización del suelo, lo cual constituye un daño irreparable en el sistema general (Chen 2006).

Frente a las indudables desventajas ambientales y de salud pública que presenta el empleo abusivo de los compuestos químicos, podemos contraponer los beneficios de los bioinoculantes, sustancias que contienen microorganismos vivos que ayudan, entre otros aspectos, a la expansión del sistema radicular y a una mejor germinación de la semilla. Como ya hemos comentado con anterioridad, los microorganismos asociados a las plantas, cumplen importantes funciones sobre el crecimiento de las mismas y su salud. La promoción directa del crecimiento de la planta por los microorganismos, se basa entre otros en la mejora de la adquisición de nutrientes y la estimulación hormonal.

Por todo ello, se hacía esencial estudiar con detenimiento las diferentes posibilidades que diferentes cepas aisladas en el presente trabajo ofrecían, con el objetivo de rentabilizar su potencial. En el presente capítulo vamos a abordar los estudios relativos a la inoculación de *L. corniculatus* con diferentes bacterias, con el fin de buscar los mejores bioinoculantes.

## 1. Ensayos en Invernadero (Microcosmos).

Una vez conocidos los efectos de los ensayos de nodulación, tanto de las inoculaciones simples como de las coinoculaciones (capítulo IV), procedimos a analizar el fenotipo de las plantas de *L. corniculatus* cuando se encuentran inoculadas con dichas cepas bacterianas.

Estos ensayos se realizaron con *M. j Jarvisii* CSLC28N *Mesorhizobium* sp., CSLC35N, *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N (ver tabla 39, apartado 10, Capítulo IV), bajo condiciones controladas de invernadero. Se emplearon dos tratamientos como controles, a uno de los cuales se adicionó Nitrógeno constituyendo el control positivo. Los ensayos realizados en invernadero permiten un desarrollo vegetal de las plantas que no proporcionan los ensayos hidropónicos realizados anteriormente en cámara iluminada. De esta manera, se puede visualizar de forma mucho más eficiente y contrastada las diferencias entre los diferentes tratamientos realizados.

### 1.1. Fenotipo simbiótico en invernadero.

Los resultados obtenidos en invernadero son producto de seis réplicas realizadas en paralelo de cada uno de los tratamientos pasadas seis semanas desde su inoculación. Pasado este tiempo, se procedió a recoger las plantas, de las cuales se midió su porte aéreo, se secó y posteriormente se obtuvo el peso seco de las mismas. Finalmente, una muestra molida representativa de cada uno de los tratamientos se envió al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC para su análisis.

Con cada uno de los 12 experimentos que se llevaron a cabo se pretendía evaluar la utilización de distintos tratamientos fertilizantes. Se realizaron los mismos tratamientos que se llevaron a cabo con anterioridad en cultivo hidropónico (Capítulo IV, apartado 9), utilizando suelo como soporte. El experimento Control + fue fertilizado con un fertilizante NPK (Nitrógeno/Fósforo/Potasio, 20:20:20). Los resultados obtenidos a las seis semanas posteriores a la inoculación de los tratamientos quedan recogidos en la figura 128, donde se observa una fotografía representativa de los 12 tratamientos llevados a cabo.

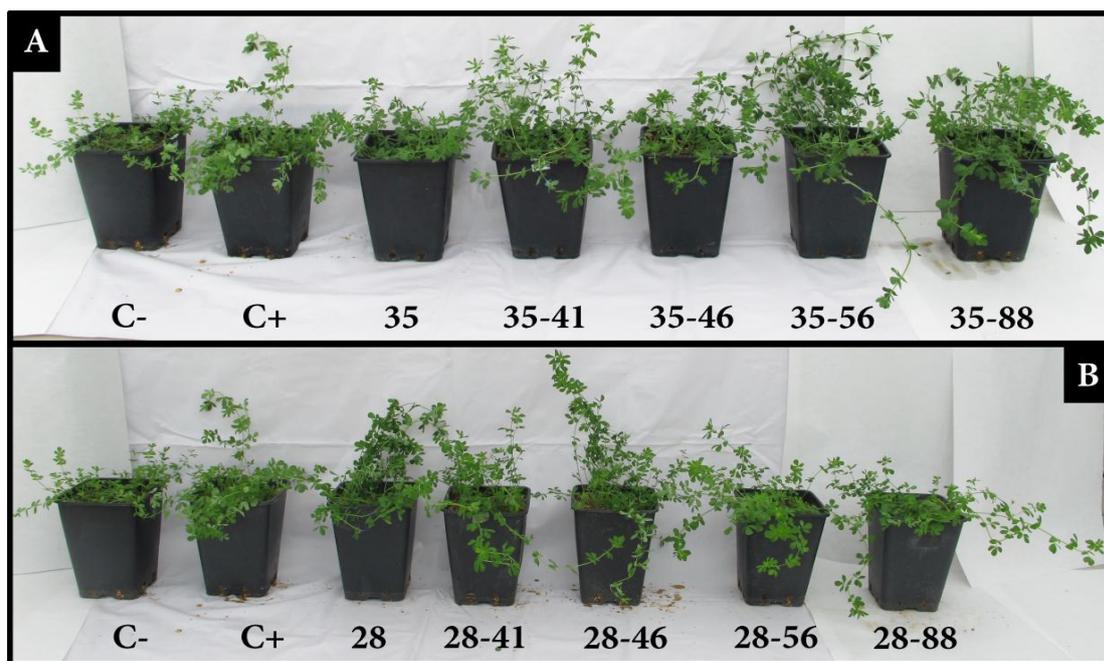


Figura 128. C-: control sin inocular y sin fertilizar (A y B);

C+ control sin inocular y fertilizado (A y B);

35: plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (A);

35-41: plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Bacillus aryabathai* CSLC41N (A);

35-46: plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N (A);

35-56: plantas coinoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N (A);

35-88: plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. chokoriensis* CSLC88N (A);

28: plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N (B);

28-41: plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Bacillus aryabathai* CSLC41N (B);

28-46: plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N (B);

28-56: plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N (B);

28-88: plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. chokoriensis* CSLC88N (B).

A grandes rasgos podemos notar las diferencias obtenidas para los distintos tratamientos. Si bien el Control + fertilizado tiene buen porte aéreo, hay algunos tratamientos que lo mejoran. En la figura 129 podemos observar las diferencias entre tratamientos, observando la media representativa de la medida del porte aéreo que presentó cada uno de los tratamientos.

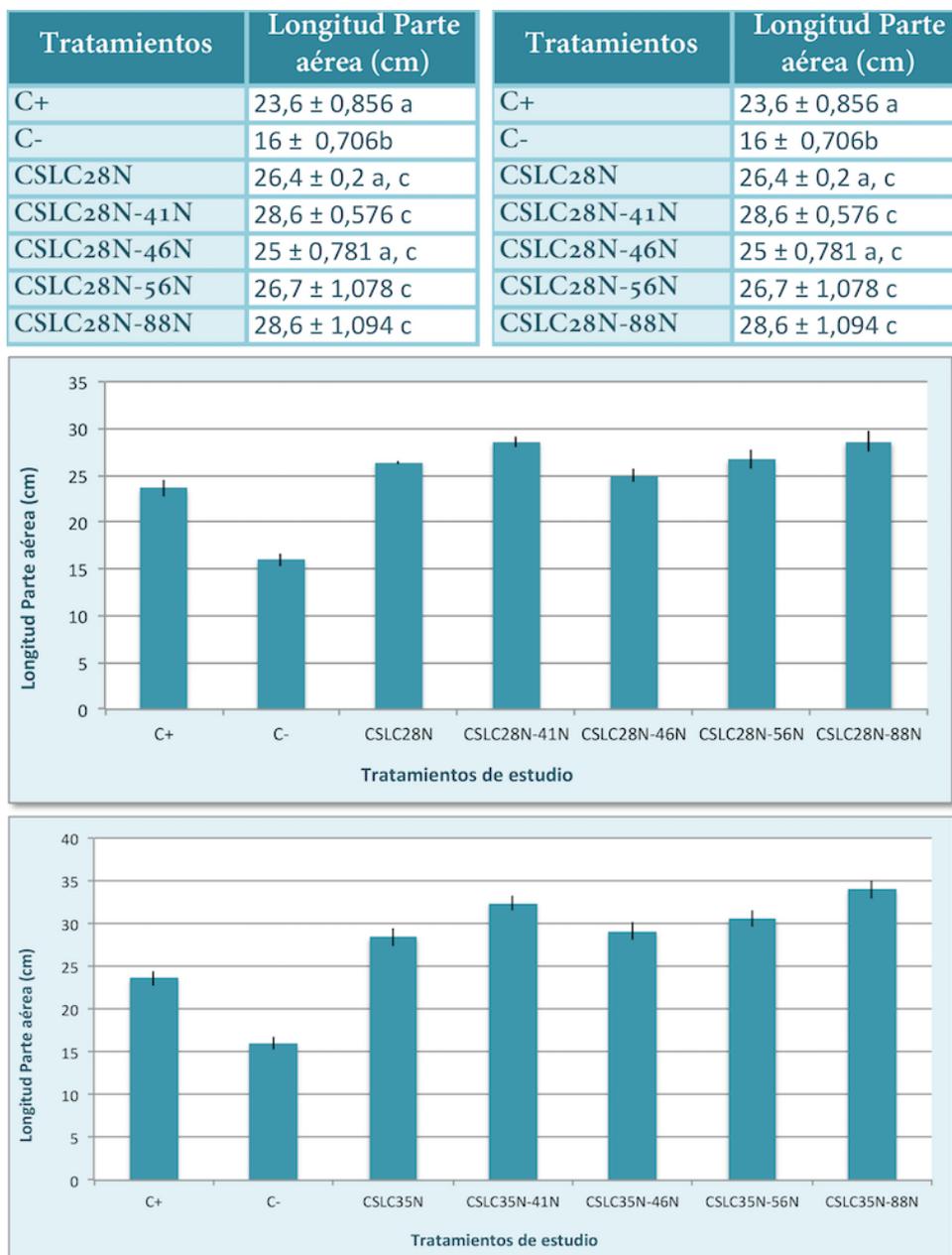


Figura 129. Longitud de la parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N (A) y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (B) y las correspondientes coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas: *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N. El ensayo fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de invernadero. Las correspondientes gráficas se realizaron con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de al menos 25 plantas. Las barras de error representan el error estándar. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tablas, en las cuales los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

Se puede observar que las plantas inoculadas presentan siempre un porte aéreo mayor que las plantas control sin inocular, tanto las plantas que fueron fertilizadas como las que no, observándose que todos los controles inoculados son estadísticamente significativos respecto al control negativo sin inocular y sin aporte de N. Respecto al control sin inocular y con aporte de N, vemos que dos tratamientos resultaron estadísticamente significativos: la coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N-*B. aryabathai* CSLC41N y *M. jarvisii* CSLC28N-*M. chokoriensis* CSLC88N.

Por otro lado hay que destacar que a grandes rasgos, las plantas inoculadas y coinoculadas con la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC35N presentan mayor porte aéreo que las inoculadas y coinoculadas con *M. jarvisii*. CSLC28N. Además, los 5 tratamientos realizados con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, tanto la inoculación simple como las cuatro coinoculaciones, presentan diferencias estadísticamente significativas con los dos tratamientos control.

En lo que se refiere a producción, los datos más efectivos que pueden arrojar luz sobre el resultado de cada uno de los tratamientos llevados a cabo, es el peso seco obtenido de la parte aérea.

A la media del peso seco del tratamiento C- le asignamos un valor del 100%, debido a que es el rendimiento máximo que se puede obtener de esta planta sin aporte externo ni de fertilizante nitrogenado, ni de inoculante microbiano. Para el resto de tratamientos se calculó el porcentaje correspondiente conforme al tratamiento C-. El resultado aparece reflejado en la figura 130.

Tratamientos	Peso seco (g)	Tratamientos	Peso seco (g)
C+	0,418 ± 0,013 a	C+	0,418 ± 0,013 a
C-	0,23 ± 0,015 b	C-	0,23 ± 0,015 b
CSLC28N	0,553 ± 0,022 c	CSLC35N	0,549 ± 0,025 c
CSLC28N-41N	0,433 ± 0,022 a,e	CSLC35N-41N	0,513 ± 0,02 c
CSLC28N-46N	0,495 ± 0,016 d	CSLC35N-46N	0,529 ± 0,029 c
CSLC28N-56N	0,471 ± 0,02 e,d	CSLC35N-56N	0,492 ± 0,038 c
CSLC28N-88N	0,428 ± 0,017 a,e	CSLC35N-88N	0,57 ± 0,025 c

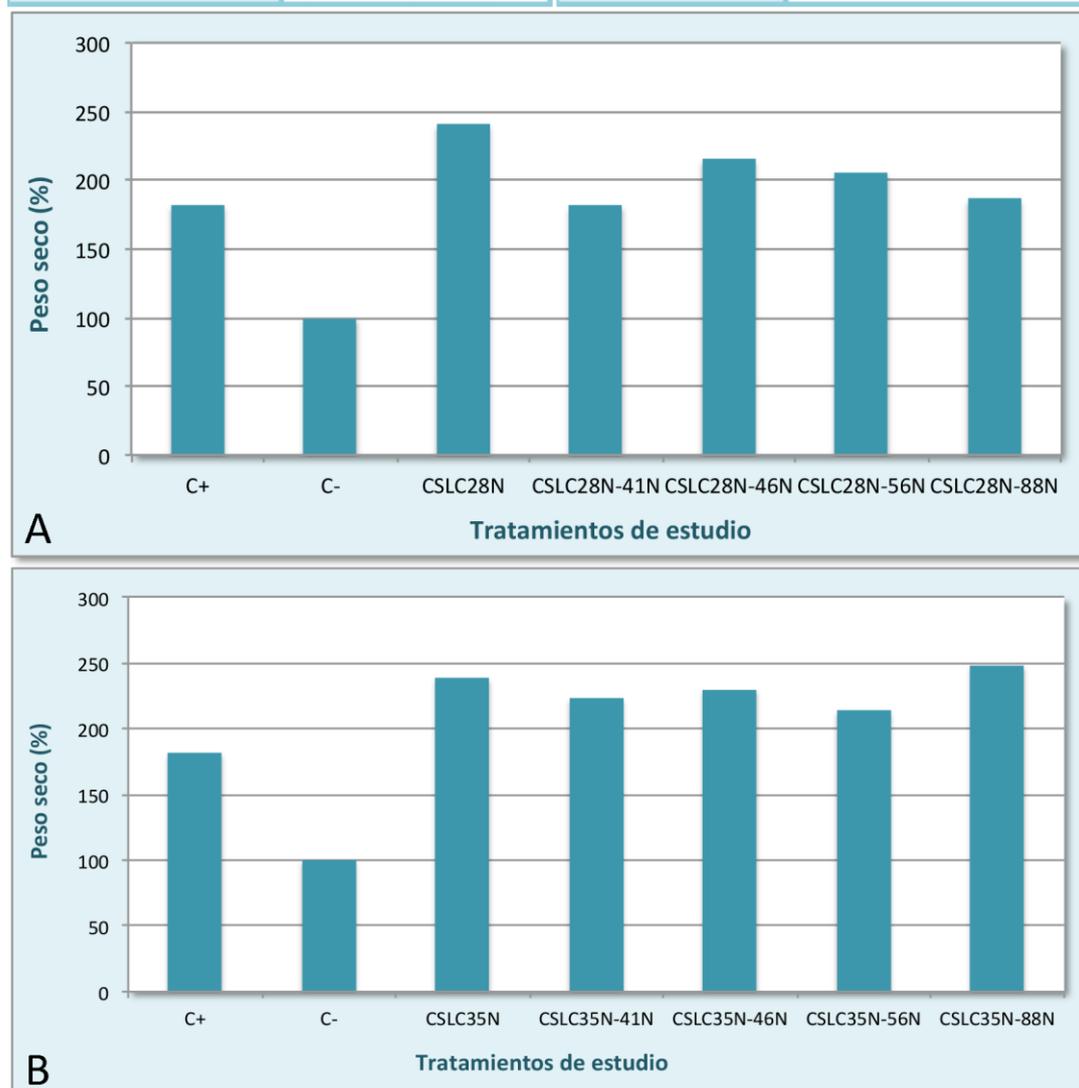


Figura 130. Peso seco de la parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N (A) y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (B) y las correspondientes coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas: *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N. El ensayo fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de invernadero. Las correspondientes gráficas se realizaron con los porcentajes de los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de al menos 25 plantas. Al control sin inocular y sin fertilizar (C-) se le asignó el 100%. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tablas, en las cuales los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

Como podemos observar, el tratamiento que mayor producción ofrece es la coinoculación entre *Mesorhizobium* sp. CSLC35 y *M. chokoriensis* CSLC88N, que como vimos en la figura 130B era el tratamiento cuyas plantas obtuvieron el mayor porte aéreo. Por debajo se encuentran los tratamientos inoculados de forma simple con las dos cepas de *Mesorhizobium* sp. CSLC28N y CSLC35N, con prácticamente la misma producción.

El peso seco del tratamiento con CSLC28N es estadísticamente significativo con cada una de las coinoculaciones realizadas con dicha cepa. Esto nos viene a confirmar lo que ya veníamos suponiendo y es que esta cepa es tan competitiva y tan buena noduladora que con el Nitrógeno que fija es más que suficiente para que la planta crezca de forma vigorosa, sin necesitar ningún aporte extra que podrían proporcionarles las bacterias endófitas con sus diferentes características PGPR. Además, hay que recordar que esta cepa es capaz de solubilizar fósforo, producir AIA en cantidades moderadas y formar biofilms, con lo que muy probablemente la planta también se vea beneficiada de ello.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos inoculados con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y los diferentes endófitos, alcanzando prácticamente todos los tratamientos el mismo peso, con excepción del tratamiento anteriormente mencionado: *Mesorhizobium* sp. CSLC35- *M. chokoriensis* CSLC88N

Hay que detenerse a observar los resultados obtenidos con los tratamientos coinoculados con la cepa *Bacillus arayabathai* CSLC41N y *Micromonospora* sp. CSLC88N y las dos cepas de *Mesorhizobium*. Podemos observar que se obtiene un mayor rendimiento en las plantas coinoculadas con dichas cepas y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N que con *M. jarvisii* CSLC28N.

## 1.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.

A la hora de realizar ensayos de inoculación en planta, no solamente se debe tener en cuenta la parte aérea y el peso seco obtenido en los diferentes tratamientos que se lleven a cabo, sino que hay que considerar también los nutrientes asimilados por las plantas dada su importancia relativa en la obtención de mayores rendimientos en el cultivo.

Podemos clasificar los elementos esenciales para la vida en macronutrientes y micronutriente (oligoelementos o elementos traza), según la concentración a la que aparecen en los tejidos vegetales y que la planta necesita para tener un correcto desarrollo (Epstein and Bloom, 2005). Ambos grupos de elementos intervienen en las diferentes funciones fisiológicas específicas y esenciales del metabolismo de las plantas (Epstein, 1965; Marschner, 1986). Los micronutrientes se requieren en pequeñas cantidades, actuando como activadores en diferentes reacciones enzimáticas. Entre los

microelementos se encuentran el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cobre (Cu), el molibdeno (Mo) o el zinc (Zn). Entre los macroelementos podemos encontrar el nitrógeno (N), el calcio (Ca), el fósforo (P) y el azufre (S).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) ayudan a la asimilación de estos elementos por parte de la planta, con el fin de mejorar su crecimiento y desarrollo. Por esta razón, decidimos analizar el contenido de ciertos elementos esenciales para la planta, con el objeto de averiguar si los coinoculantes endófitos, así como las dos cepas rizobianas, ayudaban a asimilar una mayor cantidad de estos elementos.

En lo referente al análisis de nitrógeno (figura 131), vemos que el contenido de este elemento es mayor en las plantas que fueron inoculadas con el fertilizante nitrogenado. En todos los casos, tanto las inoculaciones simples con las dos cepas del género *Mesorhizobium*, como en las respectivas coinoculaciones, vemos que las diferencias son estadísticamente significativas. Respecto a las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N, vemos que es la que presenta los valores más próximos al control fertilizado.

Tratamientos	%N	Tratamientos	%N
C+	5,74 ± 0,110 a	C+	5,74 ± 0,11 a
C-	4,72 ± 0,153 b,d	C-	4,72 ± 0,153 b,c
CSLC28N	5,14 ± 0,026 c	CSLC35N	4,6 ± 0,024 b
CSLC28N-41N	5,1 ± 0,035 c	CSLC35N-41N	4,75 ± 0,01 b,d
CSLC28N-46N	4,89 ± 0,016 c,d	CSLC35N-46N	4,81 ± 0,042 b,d
CSLC28N-56N	5,09 ± 0,085 c	CSLC35N-56N	4,92 ± 0,024 b,d
CSLC28N-88N	4,89 ± 0,069 c,d	CSLC35N-88N	4,98 ± 0,042 d

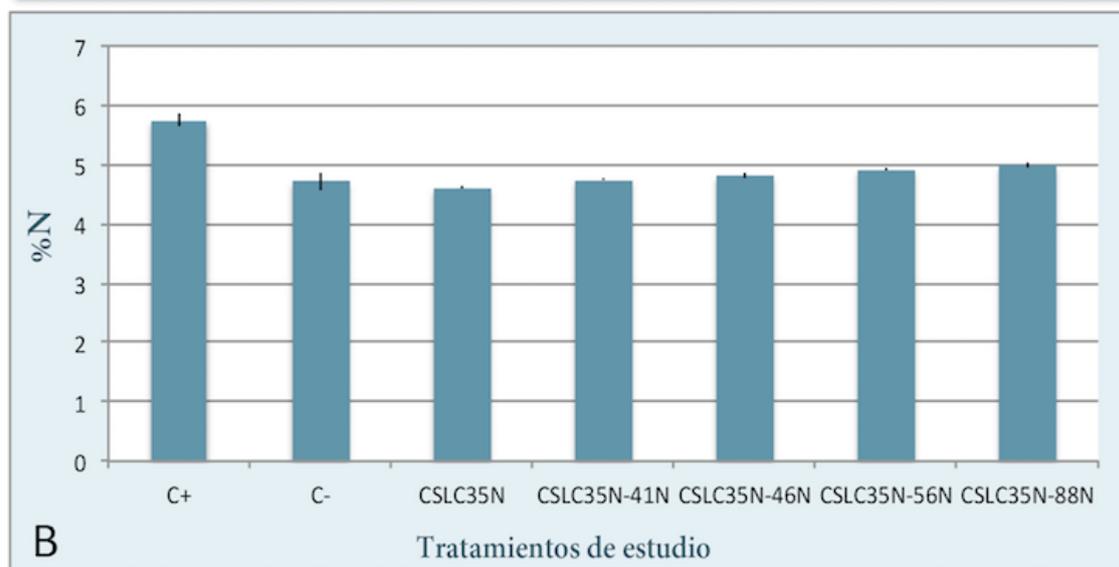
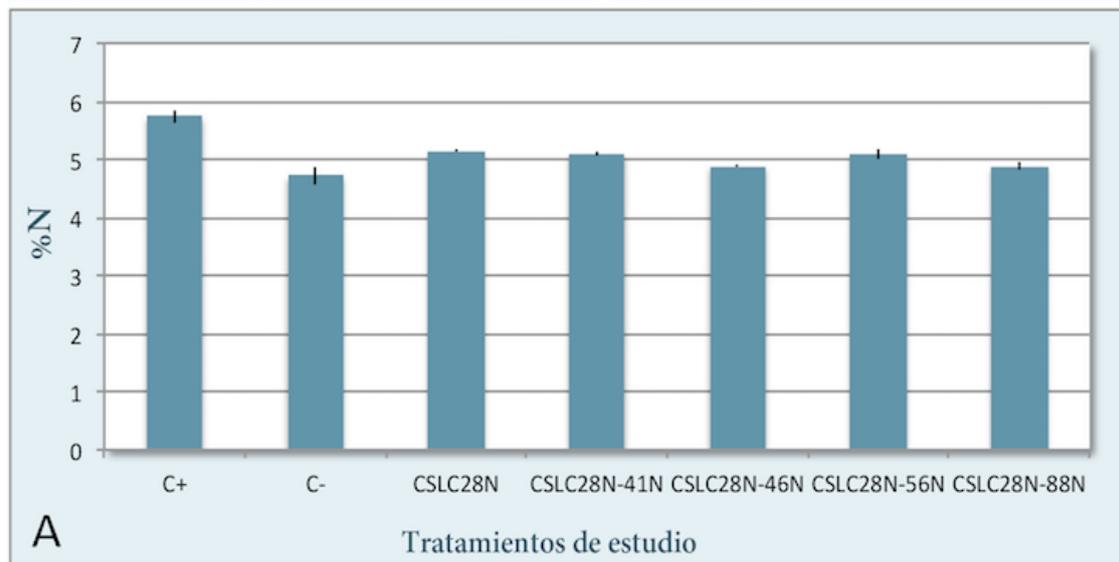


Figura 131. Cantidad de Nitrógeno (expresada en porcentaje) en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N (A) y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (B) y las correspondientes coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas: *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N. El ensayo fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de invernadero. Las correspondientes gráficas se realizaron con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de al menos 25 plantas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tablas, en las cuales los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

Atendiendo ahora al contenido de carbono (C), vemos que todas las plantas inoculadas con los diferentes tratamientos, presentan diferencias estadísticamente significativas con los dos controles sin inocular (figura 132). En la figura 132A, observamos que las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N presentan los valores más altos. En cambio, si comparamos este valor con algunos de los obtenidos en los tratamientos que vemos en la figura 132B, observamos que es algo inferior. En la figura 132B, también vemos que todas las plantas inoculadas presentan valores estadísticamente significativos con respecto a los controles sin inocular, obteniendo las coinoculaciones con *Bacillus arayabathai* CSLC41N y *Streptomyces* sp. CSLC56N porcentajes de carbono mayores.

Tratamientos	% C	Tratamientos	% C
C+	43,27 ± 0,175 a	C+	44,16 ± 0,134 a
C-	44,16 ± 0,134 b	C-	43,27 ± 0,175 b
CSLC28N	45,69 ± 0,146 c	CSLC <sub>35</sub> N	45,52 ± 0,06 c
CSLC28N-41N	44,22 ± 0,169 d	CSLC <sub>35</sub> N-41N	46,15 ± 0,075 d
CSLC28N-46N	45,22 ± 0,169 c,d	CSLC <sub>35</sub> N-46N	45,41 ± 0,128 c
CSLC28N-56N	45,22 ± 0,006 c,d	CSLC <sub>35</sub> N-56N	46,29 ± 0,149 d
CSLC28N-88N	45,33 ± 0,225 c,d	CSLC <sub>35</sub> N-88N	45,42 ± 0,157 c

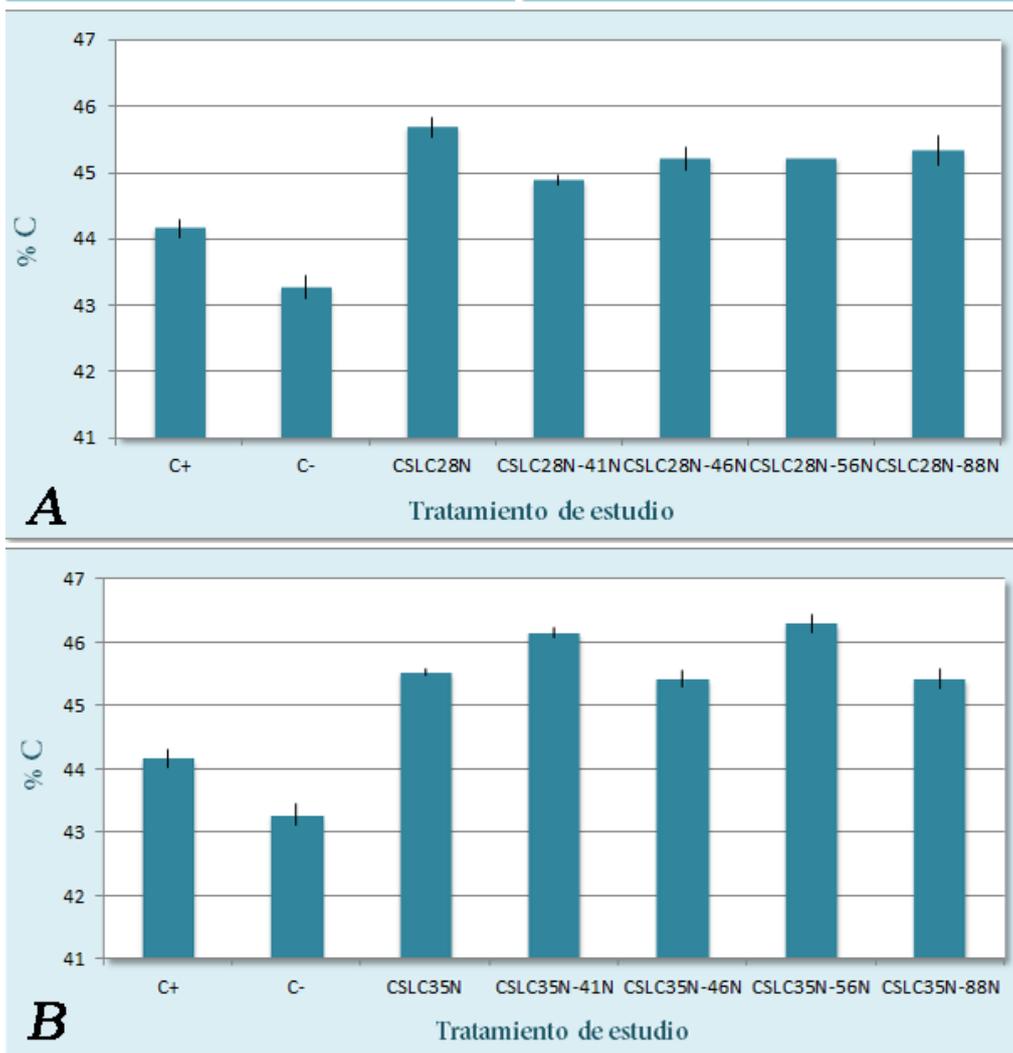


Figura 132. Cantidad de carbono (expresada en porcentaje) en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N (A) y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N (B) y las correspondientes coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas: *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N. El ensayo fue llevado a cabo bajo condiciones controladas de invernadero. Las correspondientes gráficas se realizaron con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de al menos 25 plantas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tablas, en las cuales los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

En líneas generales para los elementos analizados en las tablas que siguen a continuación (tablas 41 y 42), vemos que los mayores valores se reparten en las plantas que no fueron inoculadas, con valores estadísticamente significativos en algunos de ellos como son Mg, S, Al y Sr. Destaca entre el resto de tratamientos la coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N-*M. chokoriensis* CSLC88N con valores altos en Fe, K, Mg, Na, Al, Cu y Zn, siendo alguno de ellos significativamente mayores a los obtenidos para las plantas control sin inocular. Respecto al contenido en Na, destaca con valores estadísticamente significativos las plantas coinoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N-*B. aryabathai* CSLC41N.

La coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N-*Arthrobacter* sp. CSLC46N dio como resultado plantas con los valores más bajos en Fe, Mg, Ca, P, Al, B y Sr.

Tabla 41. Valores expresados en miligramos por kilogramo de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *L. corniculatus* inoculadas con los diferentes tratamientos realizados con *M. jarvisii* CSLC28N y sus respectivas coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas en ausencia de nitrógeno, así como en los dos controles, uno en presencia de nitrógeno y otro en ausencia del mismo. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \geq 0,05$ ). Significado de los colores resaltados en la tabla: **tratamiento con el valor más alto**; **2° tratamiento con el valor más alto**; **tratamiento con el valor más bajo**.

mg/Kg muestra	Fe	K	Mg	Mn	Ca	P	Na
C-	167,58 $\pm$ 18,84 a	16512,51 $\pm$ 582,891 b,c	4280,011 $\pm$ 53,28 a	70,78 $\pm$ 6,031 a,b	17311,254 $\pm$ 0,706 a,c	7552,95 $\pm$ 59,028 a	804,98 $\pm$ 9,758 a
C+	167,74 $\pm$ 19,72 a	14052,94 $\pm$ 181,233 a,d	5202,6 $\pm$ 60,39 b	76,58 $\pm$ 0,794 a	18515,99 $\pm$ 1085,957 a	4497,61 $\pm$ 359,123 b	963,92 $\pm$ 10,245 a,c
CSLC28N	180,59 $\pm$ 19,19 a,b,c	14464,23 $\pm$ 135,397 b	42388,71 $\pm$ 141,883 a,c	67,06 $\pm$ 0,957 a,b	13917,51 $\pm$ 573,78 b,c,d	3989,2 $\pm$ 11,142 b,c	949,71 $\pm$ 68,454 a,c
CSLC28N-41N	156,1 $\pm$ 8,073 a	13417,74 $\pm$ 52,045 c	4565,33 $\pm$ 13,041 a,d	65,89 $\pm$ 1,815 b	15697,74 $\pm$ 82,95 b,c	3694,93 $\pm$ 35,922 c	1179,44 $\pm$ 54,9 b
CSLC28N-46N	126,25 $\pm$ 7,52 a,b,d	15573,06 $\pm$ 161,232 a,d	3916,08 $\pm$ 172,39 c	76,91,831 a	12844,76 $\pm$ 43,87d	3687,79 $\pm$ 41,909 c	869,28 $\pm$ 32,536 a
CSLC28N-56N	133,24 $\pm$ 8,341 a,c,e	15428,75 $\pm$ 170,071 d	4491,79 $\pm$ 34,2 a,d	66,66 $\pm$ 1,649 b	15662,57 $\pm$ 114,39 c	3932,05 $\pm$ 57,677 b,c	925,26 $\pm$ 60,386 a
CSLC28N-88N	177,13 $\pm$ 5,964 a,d,e	16045,07 $\pm$ 687,237 d	4626,5 $\pm$ 110,57 d	73,26 $\pm$ 5,002 a,b	13456,31 $\pm$ 172,77 d	4133,83 $\pm$ 267,687 b,c	1092,44 $\pm$ 55,399 c,b

mg/Kg muestra	S	Al	B	Cu	Sr	Zn
C-	4308,93 $\pm$ 20,772 a	245,36 $\pm$ 20,416 a	41,217 $\pm$ 2,6588 a	13,17 $\pm$ 0,008 a	104,844 $\pm$ 0,697 a	51,94 $\pm$ 2.867 a
C+	3601,56 $\pm$ 371,666 b	208,07 $\pm$ 18,961 a	43,01 $\pm$ 0,26 a	12,14 $\pm$ 0,11 b	109,78 $\pm$ 3,359 a	42,79 $\pm$ 1,08 b
CSLC28N	2459,23 $\pm$ 132,858 c	370,31 $\pm$ 26,752 b	38,95 $\pm$ 1,245 b	11,58 $\pm$ 0,16 b	85,28 $\pm$ 3,702 b	34,96 $\pm$ 0,471 c
CSLC28N-41N	3156,85 $\pm$ 93,785 d	275,8 $\pm$ 3,345 c	39,45 $\pm$ 1,878 a,b	11,81 $\pm$ 0,16 b	88,95 $\pm$ 2,165 b	42,23 $\pm$ 0,916 b
CSLC28N-46N	2658,06 $\pm$ 8,679 c	94,75 $\pm$ 9,235 d	34,86 $\pm$ 0,309 c	11,69 $\pm$ 0,057 b	77,64 $\pm$ 1,151 c	40,2 $\pm$ 0,347 b
CSLC28N-56N	2513,18 $\pm$ 21,758 c	128,37 $\pm$ 6,642 d	39,82 $\pm$ 1,225 a	11,69 $\pm$ 0,293 b	90,52 $\pm$ 1,194 b	36,21 $\pm$ 0,465 c
CSLC28N-88N	2467,77 $\pm$ 82,341 c	304,96 $\pm$ 31,695 c	37,28 $\pm$ 0,8 b	13,27 $\pm$ 0,085 a	82,86 $\pm$ 0,239 c	49,75 $\pm$ 0,58 a

Tabla 42. Valores expresados en miligramos por kilogramo de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *L. corniculatus* inoculadas con los diferentes tratamientos realizados con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y sus respectivas coinoculaciones con las diferentes cepas endófitas en ausencia de nitrógeno, así como en los dos controles, uno en presencia de nitrógeno y otro en ausencia del mismo. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \geq 0,05$ ). Significado de los colores resaltados en la tabla: **tratamiento con el valor más alto**; **2° tratamiento con el valor más alto**; **tratamiento con el valor más bajo**.

mg/Kg muestra	Fe	K	Mg	Mn	Ca	P	Na
C-	167,58 $\pm$ 18,84 a	16512,51 $\pm$ 582,891 a	4280,011 $\pm$ 53,28 a	70,78 $\pm$ 6,031 a,d	17311,254 $\pm$ 0,706 a	7552,95 $\pm$ 59,028 a	804,98 $\pm$ 9,758 a
C+	167,74 $\pm$ 19,72 a	14052,94 $\pm$ 181,233 b,c	5202,6 $\pm$ 60,39 b	76,58 $\pm$ 0,794 a	18515,99 $\pm$ 1085,957 a	4497,61 $\pm$ 359,123 b,e	963,92 $\pm$ 10,245 b
CSLC35N	126,47 $\pm$ 18,84 a	14184,31 $\pm$ 212,734 b,c	3765,23 $\pm$ 82,85 c	68,709 $\pm$ 0,675 a,b,d	11305,021 $\pm$ 4,327 b	3731,47 $\pm$ 5,923 c,f	1063,56 $\pm$ 11,196 c
CSLC35N-41N	140,98 $\pm$ 19,72 a	13369,58 $\pm$ 169,39 c	3315,39 $\pm$ 131,76 d	59,38 $\pm$ 0,146	11634,58 $\pm$ 17,216 b	3491,74 $\pm$ 78,519 c,d	1133,87 $\pm$ 7,509 d
CSLC35N-46N	116,19 $\pm$ 7,46 a,b	14829,07 $\pm$ 462,907 b	3692,127 $\pm$ 32,6 c	62,36 $\pm$ 0,146 a,c,d	11780,75 $\pm$ 0,98 b	4194,94 $\pm$ 213,164 e,f	969,49 $\pm$ 49,384 b
CSLC35N-56N	154,82 $\pm$ 14,23 a	11209,57 $\pm$ 472,864 d	3460,5 $\pm$ 174,127 c,d	57,49 $\pm$ 3,525 c,d	11016,7 $\pm$ 142,644 b	3065,29 $\pm$ 68,204 d	841,98 $\pm$ 23,067 a
CSLC35N-88N	184,86 $\pm$ 39,84 a,b	13678,59 $\pm$ 62,012 b,c	3580,21 $\pm$ 32,13 c,d	62,38 $\pm$ 0,821 d	12514,65 $\pm$ 89,293 b	3871,92 $\pm$ 8,852 c,f	762,78 $\pm$ 25,937 a

mg/Kg muestra	S	Al	B	Cu	Sr	Zn
C-	4308,93 $\pm$ 20,772 a	245,36 $\pm$ 20,416 a,c	41,217 $\pm$ 2,6588 a	13,17 $\pm$ 0,008 a	104,844 $\pm$ 0,697 a	51,94 $\pm$ 2,867 a
C+	3601,56 $\pm$ 371,666 b	208,07 $\pm$ 18,961 a,d,c	43,01 $\pm$ 0,26 a	12,14 $\pm$ 0,11 a	109,78 $\pm$ 3,359 a	42,79 $\pm$ 1,08 b
CSLC35N	3731,47 $\pm$ 5,923 c,d,e	90,311 $\pm$ 14,569 b	33,98 $\pm$ 1,564 b,c	9,23 $\pm$ 0,078 b	55,565 $\pm$ 5,021 b	30,123 $\pm$ 0,251 c
CSLC35N-41N	3491,74 $\pm$ 78,519 c,e	245,49 $\pm$ 10,499 c	31,34 $\pm$ 1,157 b	11,15 $\pm$ 0,1 c	67,21 $\pm$ 0,907c	30,563 $\pm$ 0,395 c
CSLC35N-46N	4194,94 $\pm$ 213,164 d	177,81 $\pm$ 11,11 d	31,49 $\pm$ 0,425 b	10,29 $\pm$ 0,177 b,c	70,39 $\pm$ 0,313 c	33,86 $\pm$ 1,027 d
CSLC35N-56N	3065,29 $\pm$ 68,204 e	303,62 $\pm$ 27,151e	31 $\pm$ 1,172 b	10,72 $\pm$ 0,6 c	61,44 $\pm$ 2,262 b	33,1 $\pm$ 1,186 c,d
CSLC35N-88N	3871,92 $\pm$ 8,852 c,d	330,11 $\pm$ 5,583 e	36,35 $\pm$ 0,38 c	10,85 $\pm$ 0,27 c	72,5 $\pm$ 0,932 c	32,24 $\pm$ 0,284 c,d

Tras observar los valores obtenidos en cada uno de los elementos en las plantas de los diferentes tratamientos, volvemos a observar que los mayores valores se reparten entre las plantas sin inocular. En este caso no hay ningún tratamiento de inoculación que destaque por encima del resto, como así ocurrió con la coinoculación *M. jarvisii* CSLC28N-*M. chokoriensis* CSLC88N. Sí que destaca un tratamiento por presentar los valores más bajos en K, Mn, Ca, P, S y B, la coinoculación *Mesorhizobium* sp. CSLC35N-*Streptomyces* sp. CSLC56N.

En cualquier caso y, a excepción de los dos tratamientos en los que se obtuvieron los valores más bajos en los citados elementos, no podemos decir que algún tratamiento haya afectado de manera negativa al desarrollo nutricional de la planta. Además, en lo relativo al peso seco, hemos visto que todos los tratamientos fueron estadísticamente significativos respecto a los controles sin inocular, por lo que sin duda estos tratamientos son muy interesantes para seguir estudiándolos más detenidamente y en profundidad.

## 2. Ensayos en campo.

A continuación decidimos llevar a cabo ensayos en campo (figura 133) con plantas de *L. corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, para continuar con los estudios iniciados con estas dos cepas en invernadero. Quisimos a su vez hacer estudios con la cepa tipo de la nueva especie de *Mesorhizobium* aislada e identificada en el presente trabajo: *M. helmanticense* CSLC115N, para ver cómo se comportaba en campo con su planta hospedadora *L. corniculatus*.

El experimento se estableció en una tierra de *La Armuña*, perteneciente al municipio de Negrilla de Palencia (Salamanca).

*Lotus corniculatus* es una especie de crecimiento lento, si lo comparamos con el trébol o la alfalfa, no siendo adecuada para rotaciones cortas. Además, las plantas poseen menor índice foliar que la alfalfa o el trébol, por lo que no debemos esperar obtener mayor altura que la longitud que pueden alcanzar las plantas de la alfalfa, por ejemplo. Se debe así mismo evitar que los cortes realizados sean muy tempranos desde la fecha de la siembra, o muy tardíos durante la estación otoñal.

Los resultados obtenidos en campo son producto de tres réplicas realizadas en paralelo de cada uno de los tratamientos. Pasados cuatro meses de su inoculación, se procedió a recoger de cada tratamiento tres muestras diferentes. Para cada muestra se recogieron las plantas equivalentes a una superficie de 50 cm<sup>2</sup>, para que fuera lo más homogéneamente posible. Finalmente se pesó cada una de las muestras recogidas y se mandó una muestra molida representativa de cada uno de los tratamientos al Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC.

Se realizaron dos cortes, uno pasados 4 meses desde su inoculación (abril-agosto) y el segundo realizado a los dos meses desde el primer corte (principios de octubre) (figura 132).

En ningún caso el suelo fue tratado con ningún tipo de herbicida y/o abono. Tampoco fue añadido ningún tipo de fertilizante. Tan solo se añadió un fertilizante NPK a uno de los controles sin inocular y tras el primer corte.

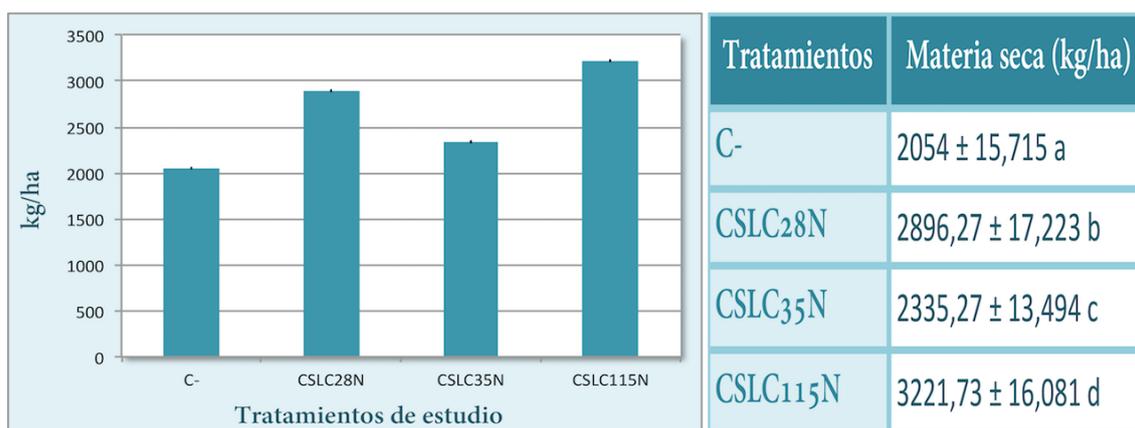


Figura 133. En la imagen podemos ver una selección de imágenes realizadas del crecimiento de *L. corniculatus* en campo. A) Plantas no inoculadas B) Plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N a los 4 meses desde su inoculación. C) Plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N a los 4 meses desde su inoculación. D) Plantas inoculadas con *M. helmanticense* CSLC115N a los 4 meses desde su inoculación.

## 2.1. Primer corte.

### 2.1.1. Fenotipo simbiótico.

Los datos relativos al rendimiento obtenido tras el primer corte (figura 134) son muy positivos si los comparamos con las plantas pertenecientes al tratamiento control sin inocular y sin aporte de fertilizante.



**Figura 134.** Producción obtenida de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticesnsis* CSLC115N. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en la zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en la tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

En la gráfica de la figura 134 podemos ver que el tratamiento que mayor rendimiento dio tras el primer corte fue el relativo a las plantas inoculadas con *M. helmanticense* CSLC115N, seguido muy de cerca por las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N. Ambos tratamientos resultaron significativamente mayores y también estadísticamente significativos respecto al control sin inocular. El tratamiento llevado a cabo con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N también resultó más productivo que el control sin inocular, pero el rendimiento es inferior al obtenido con los dos tratamientos previos.

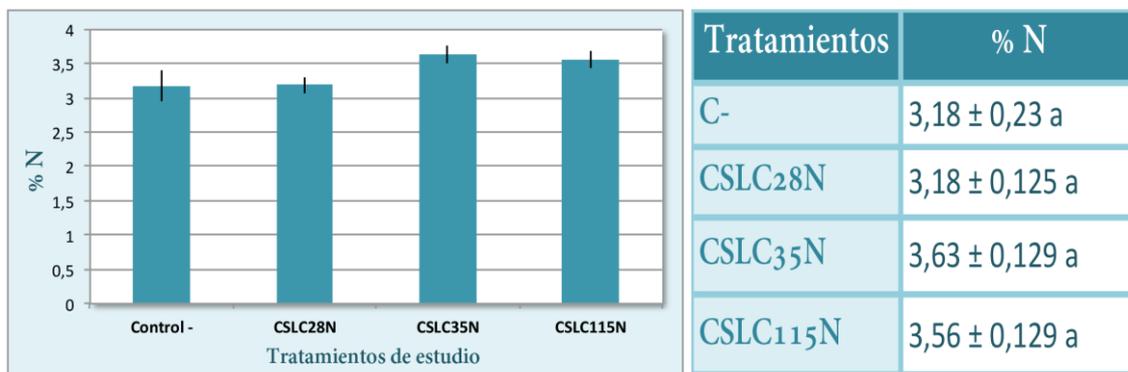
### 2.1.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.

Una vez conocida la producción obtenida por cada uno de los tratamientos a estudio, decidimos enviar una muestra seca representativa de cada uno de ellos para analizar su contenido nutricional, con el objetivo de averiguar si los inoculantes promueven una mayor asimilación de nutrientes beneficiosos para la planta.

Los resultados obtenidos por cada tratamiento respecto al contenido de nitrógeno los podemos ver en la figura 135. Las plantas correspondientes a los tratamientos con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N presentaron un contenido en nitrógeno ligeramente superior al asimilado por las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y aquellas correspondientes al tratamiento sin inocular, no siendo los valores en ningún caso estadísticamente significativos.

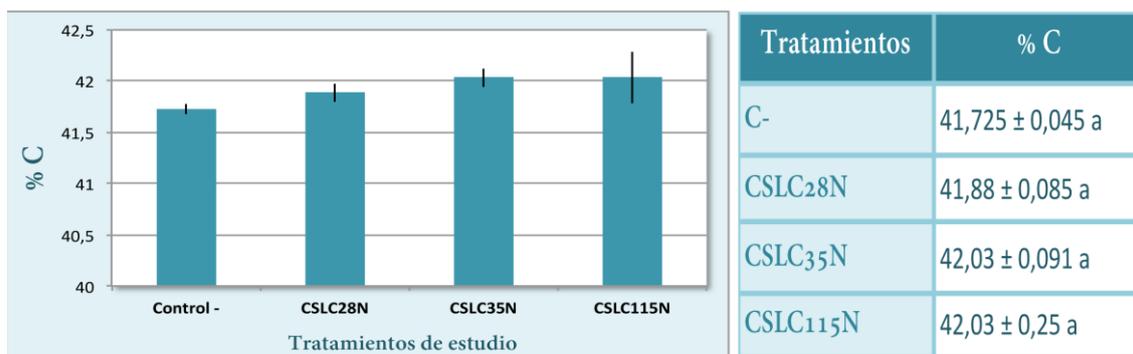
Acuna (Acuña 1998) trabajó con ocho variedades diferentes de *L. corniculatus* de las que obtuvo una media en contenido de nitrógeno de 3.2%, con un rango de valores que osciló entre 2.8%-3.8%. Estos datos nos podrían indicar que el contenido de

Nitrógeno obtenido en cada uno de nuestros tratamientos de nuestro estudio es bueno, ajustándose dentro del rango obtenido en el citado estudio.



**Figura 135.** Cantidad de Nitrógeno (expresada en porcentaje) en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense*. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en la zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en la tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

Los datos del % C (figura 136) en las plantas de cada uno de los tratamientos nos arrojan resultados similares a los obtenidos para el contenido de N. Es decir, nuevamente las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N presentan los valores más altos, sin ser estadísticamente significativos con los dos tratamientos restantes. Estos resultados nos revelan que la inoculación de los microorganismos permite una correcta asimilación de carbono por parte de la planta.



**Figura 136.** Cantidad de Carbono (expresada en porcentaje) en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense*. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en la tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

A continuación aparece una tabla (tabla 43) donde aparecen reflejadas las medias obtenidas por cada uno de los elementos esenciales analizados. En términos generales podemos hablar de medias muy próximas entre sí entre cada uno de los tratamientos del estudio.

Tan solo encontramos medias estadísticamente significativas en los siguientes elementos esenciales: Al, Ca, Fe, Li, Mg, Mn, Na, Pb, S y Ti. Y estos valores se encuentran repartidos entre los 4 tratamientos.

Tabla 43. Valores expresados en miligramos por kilogramo de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *L. corniculatus* inoculadas en campo con con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N en ausencia de nitrógeno. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \geq 0,05$ ). Significado de los colores resaltados en la tabla: **tratamiento con el valor más alto**; **2° tratamiento con el valor más alto**; **tratamiento con el valor más bajo**.

mg/Kg muestra	Al	B	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
Control -	64,665 $\pm$ 6,205 a	24,51 $\pm$ 0,16 a	15,4 $\pm$ 0,1 a	0,06 $\pm$ 0,012 a	0,173 $\pm$ 0,026 a	0,383 $\pm$ 0,038 a	6,537 $\pm$ 0,582 a	87,82 $\pm$ 1,78 a
CSLC28N	51,97 $\pm$ 4,373 ,b	25,96 $\pm$ 0,26 a,b	12,8 $\pm$ 0,4 a	0,043 $\pm$ 0,015 a	0,16 $\pm$ 0,036 a	0,44 $\pm$ 0,025 a	7,147 $\pm$ 0,353 a	82,95 $\pm$ 1,74 a
CSLC35N	61,375 $\pm$ 3,125 b	26,095 $\pm$ 0,425 b	15,35 $\pm$ 0,05 a	0,06 $\pm$ 0,012 a	0,177 $\pm$ 0,009 a	0,383 $\pm$ 0,032 a	6,203 $\pm$ 0,252 a	88,29 $\pm$ 1,78 b
CSLC115N	43,63 $\pm$ 6,404 a,b	26,63 $\pm$ 0,67 a,b	16,2 $\pm$ 0,7 b	0,053 $\pm$ 0,009 a	0,157 $\pm$ 0,02 a	0,44 $\pm$ 0,08 a	6,25 $\pm$ 0,287 a	75,56 $\pm$ 3,99 a,b

mg/Kg muestra	K	Li	Mg	Mn	Na	Ni	Pb	P
Control -	2,227 $\pm$ 0,45 a	0,635 $\pm$ 0,035 a	4,45 $\pm$ 0,05 a,c	130,245 $\pm$ 5,305 a	0,28 $\pm$ 0,03 a	2,275 $\pm$ 0,515 a	0,21 $\pm$ 0,02 a	2,77 $\pm$ 0,12 a
CSLC28N	2,465 $\pm$ 1,65 a	0,44 $\pm$ 0,03 a	3,5 $\pm$ 0,2 a	105,255 $\pm$ 3,375 b	0,49 $\pm$ 0,03 b	2,81 $\pm$ 0,06 a	0,133 $\pm$ 0,02 b	2,77 $\pm$ 0,0,03 a
CSLC35N	2,14 $\pm$ 1,11 a	0,645 $\pm$ 0,045 a	4,13 $\pm$ 0,09 c	108,295 $\pm$ 0,675 b	0,26 $\pm$ 0,03 a	2,595 $\pm$ 0,405 a	0,17 $\pm$ 0,012 a,b	3,1 $\pm$ 0 a
CSLC115N	2,167 $\pm$ 1,89 a	0,7 $\pm$ 0,02 b	4,65 $\pm$ 0,05 b	123,045 $\pm$ 3,605 a	0,22 $\pm$ 0,03 a	3 $\pm$ 0,298 a	0,2 $\pm$ 0,01 a	2,77 $\pm$ 1,2 a

mg/Kg muestra	Rb	S	Sr	Ti	Tl	Zn
Control -	31,775 $\pm$ 0,905 a	2,47 $\pm$ 0,07 a	52,395 $\pm$ 3,025 a	1,565 $\pm$ 0,325 a	30,45 $\pm$ 0,695 a	22,86 $\pm$ 2,365 a
CSLC28N	36,145 $\pm$ 3,395 a	2,5 $\pm$ 0,06 a,b	48,18 $\pm$ 3,09 a	1,55 $\pm$ 0,14 a,b	23,53 $\pm$ 0,82 b	25,93 $\pm$ 1,05 a
CSLC35N	35,065 $\pm$ 4,005 a	2,55 $\pm$ 0,05 b	45,443 $\pm$ 0,647 a	1,96 $\pm$ 0,05 b	27,93 $\pm$ 0,835 c	22,527 $\pm$ 1,142 a
CSLC115N	30,67 $\pm$ 0,33 a	2,2 $\pm$ 0,1 a,b	50,295 $\pm$ 2,515 a	1,23 $\pm$ 0,04 a	31,83 $\pm$ 1,06 a	22,41 $\pm$ 0,926 a

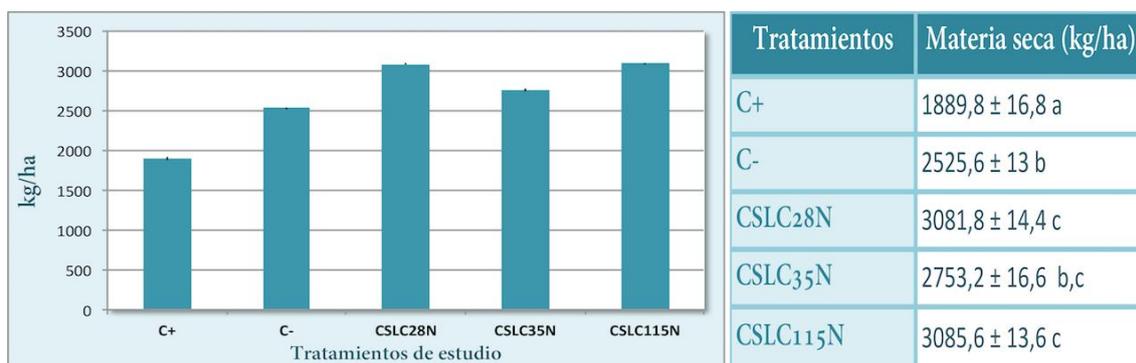
## 2.2. Segundo corte.

### 2.2.1. Fenotipo simbiótico

Pasados dos meses desde el primer corte, realizamos el segundo corte de las plantas de *L. corniculatus* inoculadas con los diferentes tratamientos, incluido un segundo Control sin inocular y al que se le añadió un fertilizante NPK. En esta ocasión queríamos comprobar si el fertilizante ayudaba a un mayor crecimiento de la leguminosa.

Como podemos ver en la figura 137 en este segundo corte se obtiene un peso de materia seca muy similar en dos tratamientos diferentes llevados a cabo con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. helmanticense* CSLC115N, cuyos valores son estadísticamente significativos respecto a los dos controles sin inocular. A pesar de ser los dos tratamientos de los cuales se ha obtenido mayor producción, hay diferencias entre ellos.

En el tratamiento llevado a cabo con *M. jarvisii* CSLC28N se ha notado un ligero incremento de producción respecto a la obtenida tras el primer corte. En el segundo caso, en las plantas inoculadas con *M. helmanticense* CSLC115N se denota una ligera disminución respecto al peso de la materia seca obtenida tras el primer corte.



**Figura 137.** Producción obtenida de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticensesnsis*. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en la zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos del segundo corte realizado para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en la tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

La comparación de estos resultados, así como los obtenidos tras el segundo corte, con otros estudios realizados alrededor del mundo se hace difícil por tratarse de condiciones climatológicas y ambientales diferentes, así como por el manejo de las prácticas agrícolas, que también difiere de una zona a otra. También hay que tener en cuenta la variedad de *L. corniculatus* empleada; en nuestro estudio hemos trabajado con la variedad Leo.

Sin embargo, para tener en cuenta alguna referencia vamos a comparar los resultados obtenidos en este estudio, con otros estudios realizados con diferentes variedades de *L. corniculatus* en diferentes partes del mundo. Se obtuvieron rendimientos anuales, relativos a la suma de tres cortes, de 4799, 6796 y 7696 kg/ha correspondientes a tres variedades diferentes de la variedad Leo, en Santiago de Chile (Acuna P 1998). En Reino Unido se obtuvieron producciones acumuladas relativas también a tres cortes de materia seca de 5900 a 7950 kg/ha en 8 variedades diferentes de *L. corniculatus* (Marley et al. 2006). Por otro lado en Italia, y en condiciones de pastoreo, obtuvieron 6640 kg/ha de producción media de materia seca durante cuatro años consecutivos (Pecetti et al. 2009).

Si sumamos la producción obtenida en los dos cortes realizados por cada uno de nuestros tratamientos obtenemos los siguientes rendimientos anuales (tabla 44).

**Tabla 44. Producción obtenida de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticesnse* tras el primer y segundo corte del experimento llevado a cabo en campo. Finalmente la última columna refleja el rendimiento total obtenido de los dos cortes.**

Tratamiento	Producción 1 <sup>er</sup> corte	Producción 2 <sup>o</sup> corte	Rendimiento anual
C+	-	1889 kg/ha	1889 kg/ha
C-	2054 kg/ha	2525 kg/ha	4579 kg/ha
CSLC28N	2896 kg/ha	3081 kg/ha	5977 kg/ha
CSLC35N	2335 kg/ha	2753 kg/ha	5088 kg/ha
CSLC115N	3221 kg/ha	3085 kg/ha	6306 kg/ha

Con estos datos podemos decir que a pesar de ser el primer año de establecimiento del cultivo de *L. corniculatus* en estas tierras y haber hecho solamente dos cortes, el rendimiento ha sido muy positivo. Destacan los tratamientos realizados con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. helmanticense* CSLC115N con una producción muy similar entre sí.

La ausencia de datos relativos al tratamiento control sin inocular y con aporte de fertilizante (C+) de la primera cosecha, esta justificada. En nuestros ensayos de campo no queríamos que ningún producto químico, además del fertilizante empleado en el control C+, influyera de algún modo en el crecimiento, desarrollo y nutrición de las plantas, razón por la cual no se adicionó herbicida alguno, previo a la siembra. Como consecuencia de ello, las malas hierbas crecieron de forma homóloga a las plantas de *L. corniculatus*, que se vieron beneficiadas al adicionarles el fertilizante químico, creciendo por encima de nuestras plantas de ensayo. Este incremento de malas hierbas originó un retraso del crecimiento de *L. corniculatus*, al verse estas ensombrecidas. Esto motivó y ocasionó que no pudiésemos recoger datos congruentes, relativos al tratamiento control C+, teniéndolo que descartar

Tras el primer corte, se limpió de forma manual, todos los tratamientos dejando las plantas de *L. corniculatus* limpias de malas hierbas. En el momento de la floración, se fertilizó de manera adecuada el tratamiento control C+. Pasados dos meses de la primera cosecha, se pudieron recoger los 5 tratamientos de estudio de forma adecuada.

Los resultados obtenidos refuerzan la idea de aplicar biofertilizantes en los cultivos agrícolas que como hemos visto, promueven de una manera muy eficiente el crecimiento vegetal. Hemos podido observar, como los inoculantes empleados en este estudio sobre plantas de *L. corniculatus*, ayudan a un desarrollo vegetativo de la planta sano y adecuado, favoreciéndolo por encima de las malas hierbas que crecieron en torno a las leguminosas. En el control +, por el contrario, al que únicamente se adicionó fertilizante nitrogenado (NPK), hemos observado como las plantas de estudio se veían retraídas en beneficio de las malas hierbas que crecían a su alrededor de una forma mucho más acusada y rápida.

El fertilizante ayuda a un crecimiento generalizado de las plantas sobre las que es aplicado, favoreciendo a aquellas que tengan un rápido desarrollo en detrimento de las que tengan un crecimiento más lento. El biofertilizante, por el contrario, ayuda al crecimiento y desarrollo de la planta leguminosa, en nuestro caso de *L. corniculatus*, para la que ha sido especialmente diseñado, sin beneficiarse de modo alguno otra planta que no sea ella. De esta manera, las plantas de los tratamientos inoculados con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N han tenido un progreso en su desarrollo vegetativo, significativamente superior que ellas que no fueron inoculadas, especialmente el control fertilizado.

### 2.2.2. Análisis cuantitativo de elementos esenciales.

Los resultados obtenidos respecto al contenido de Nitrógeno por parte de las plantas de cada uno de los tratamientos llevados a cabo los podemos ver en la figura 138.

Atendiendo a la gráfica de la figura 138 podemos decir que prácticamente todos los tratamientos presentaron el mismo contenido de Nitrógeno en planta, a excepción del control fertilizado y sin inocular, que fue ligeramente superior. Si observamos la tabla de la figura 138 vemos que el control fertilizado es estadísticamente significativo respecto al resto de tratamientos.

Los resultados del contenido de Nitrógeno para este segundo corte nos muestran que el tratamiento sin inocular y sin fertilizar, así como el tratamiento con *M. jarvisii* CSLC28N ha incrementado su valor; presentando en ambos cortes los dos tratamientos el mismo valor. El tratamiento realizado con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N ha disminuido ligeramente su contenido en Nitrógeno. Por el contrario, el tratamiento con *M. helmanticense* CSLC115N presenta exactamente el mismo contenido; es decir, ha mantenido su contenido en Nitrógeno tras el primer corte.



Figura 138. Cantidad de Nitrógeno (expresada en porcentaje) tras el segundo corte en campo, en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jaryvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense*. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en la zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

Respecto al contenido de carbono en planta, podemos observar en la figura 139 que el tratamiento del cual se obtuvo mayor valor fue el control sin inocular y sin fertilizar, siendo estadísticamente significativo respecto al resto de tratamientos. Los tratamientos realizados con *M. jaryvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N disminuyeron ligeramente su contenido en carbono respecto al primer corte realizado. En cambio, el tratamiento con *M. helmanticense* CSLC115 se mantuvo similar al valor obtenido tras el primer corte.

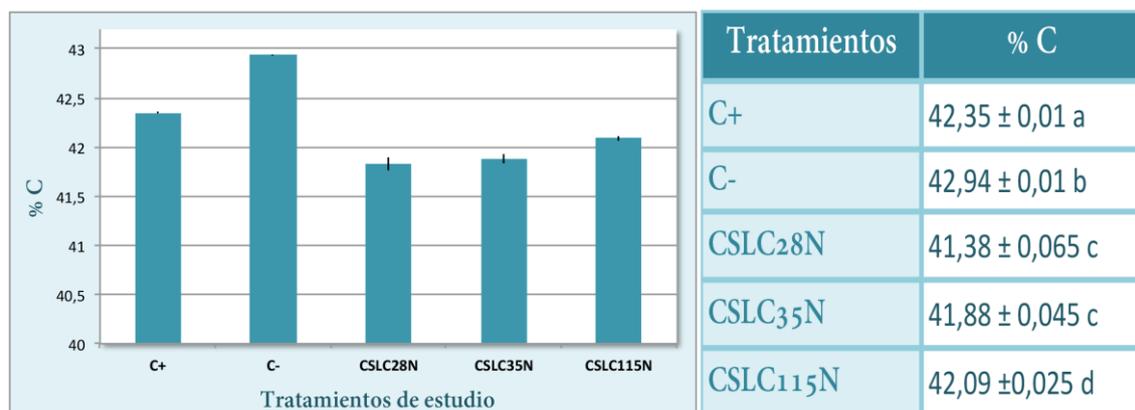


Figura 139. Cantidad de Carbono (expresada en porcentaje) tras el segundo corte en campo, en plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas con *M. jaryvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticensis*. El ensayo fue llevado a cabo en campo, en zona de *La Armuña* de Salamanca. La gráfica se realizó con los valores medios obtenidos para cada tratamiento de un experimento de tres réplicas. Los valores de la media y el error estándar de cada tratamiento aparecen reflejados en las tabla. Los valores seguidos de la misma letra no son estadísticamente significativos (Test de Fischer  $p \geq 0,01$ ).

En la tabla 45 aparecen reflejadas los valores medios obtenidos para los elementos esenciales analizados para cada uno de los tratamientos. En términos generales podemos decir que ha habido un aumento en todos los tratamientos en lo que se refiere a la asimilación de los mismos por parte de la planta. Estos elementos son: Al, Cr, Fe, Li, Mn, Na, Ni, Pb, S, Sr, Ti y Tl.

Dentro de algunos de estos elementos que incrementaron en el segundo corte su asimilación, las plantas tratadas con *M. jarvisii* CSLC28N mostraron el valor máximo. Estos elementos son el Al, Cr, Fe, Mn, Ni y Ti con valores estadísticamente significativos respecto a los controles y/o el resto de tratamientos inoculados.

Tabla 45. Valores expresados en miligramos por kilogramo de planta analizado en los principales elementos esenciales analizados en la parte aérea de *L. corniculatus* inoculadas en campo con con *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N en ausencia de nitrógeno. Los valores representan la media  $\pm$  el error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos según el test LSD protegido de Fisher ( $p \geq 0,05$ ). Significado de los colores resaltados en la tabla: **tratamiento con el valor más alto**; **2° tratamiento con el valor más alto**; **tratamiento con el valor más bajo**.

mg/Kg muestra	Al	B	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Li
Control +	448,545 $\pm$ 6,425 a	29,09 $\pm$ 0,423 a	20,03 $\pm$ 0,38 a	3,02 $\pm$ 0,02 a	6,91 $\pm$ 0,079 a	249,86 $\pm$ 3,22 a	31,1 $\pm$ 0,26 a	1,27 $\pm$ 0,06 a
Control -	126,08 $\pm$ 3,401 b	33,623 $\pm$ 1,1158 b	17,45 $\pm$ 0,45 b	0,825 $\pm$ 0,015 b	6,68 $\pm$ 0,1 a,d	108,875 $\pm$ 2,475 b	35,35 $\pm$ 0,35 b	0,473 $\pm$ 0,017 b
CSLC28N	611,61 $\pm$ 8,245 c	30,395 $\pm$ 0,375 a	19,95 $\pm$ 0,15 a	10,615 $\pm$ 0,155 c	7,83 $\pm$ 0,1 c	381,975 $\pm$ 15,665 d	36,55 $\pm$ 0,45 c	1,03 $\pm$ 0,05 d
CSLC35N	203,425 $\pm$ 15,959 d	24,387 $\pm$ 0,658 c	16,83 $\pm$ 0,52 b	1,885 $\pm$ 0,085 d	6,65 $\pm$ 0,09 d	136,985 $\pm$ 8,205 b,c	36,65 $\pm$ 0,35 c	0,455 $\pm$ 0,035 b
CSLC115N	247,393 $\pm$ 2,859 e	30,223 $\pm$ 0,16 a	19,03 $\pm$ 0,15 a,c	1,477 $\pm$ 0,013 e	7,327 $\pm$ 0,017 b	161,79 $\pm$ 0,91 c	31,9 $\pm$ 0,25 a	0,865 $\pm$ 0,045 c

mg/Kg muestra	Mg	Mn	Na	Ni	Pb	P	Rb	S
Control +	5,07 $\pm$ 0,09 a	164,485 $\pm$ 2,185 a	0,5 $\pm$ 0 a	2,53 $\pm$ 0,01 a	0,395 $\pm$ 0,015 a	3,95 $\pm$ 0,15 a	32,315 $\pm$ 0,185 a	2,97 $\pm$ 0,003 a
Control -	4,37 $\pm$ 0,15 b	142,095 $\pm$ 4,775 b	0,87 $\pm$ 0,03	2,44 $\pm$ 0,02 a	0,235 $\pm$ 0,005 b	2,35 $\pm$ 0,05 b	37,695 $\pm$ 0,495 a	2,57 $\pm$ 0,009 b,c
CSLC28N	4,73 $\pm$ 0,27 a,b	167,285 $\pm$ 3,485 a	0,37 $\pm$ 0 c	5,17 $\pm$ 0,05 b	0,39 $\pm$ 0,02 b	3,9 $\pm$ 0,2 a	27,165 $\pm$ 0,265 b	2,95 $\pm$ 0,005 a
CSLC35N	4,57 $\pm$ 0,15 b,d	117,22 $\pm$ 0,84 c	0,3 $\pm$ 0,03 d	2,135 $\pm$ 0,15 c	0,24 $\pm$ 0 b	2,4 $\pm$ 0 b	27,155 $\pm$ 0,015 b	2,47 $\pm$ 0,007 b,c
CSLC115N	4,97 $\pm$ 0,03 a,d	161,695 $\pm$ 1,415 a	0,5 $\pm$ 0 a	2,83 $\pm$ 0,005 d	0,26 $\pm$ 0,01 a	2,6 $\pm$ 0,1 b	31,427 $\pm$ 0,209 a	2,7 $\pm$ 0c

mg/Kg muestra	Sr	Ti	Tl	Zn
Control +	74,88 $\pm$ 0,8 a	11,1 $\pm$ 0,1 a	27,93 $\pm$ 0,42 a	19,76 $\pm$ 0,571 a
Control -	56,24 $\pm$ 0,65 b	3,52 $\pm$ 0,12 b	23,86 $\pm$ 0,14 b	16,5 $\pm$ 0,11 b
CSLC28N	71,82 $\pm$ 0,581 d	15,205 $\pm$ 0,665 c	25,77 $\pm$ 0,13 c	18,38 $\pm$ 0,49 a
CSLC35N	58,92 $\pm$ 0,975 b	4,883 $\pm$ 0,508 d	22,345 $\pm$ 0,095 d	14,503 $\pm$ 0,374 c
CSLC115N	69,03 $\pm$ 1,185 c	6,3 $\pm$ 0,056 e	24,92 $\pm$ 0,52 b,c	16,15 $\pm$ 0,24 b

Tomamos como ejemplo los resultados obtenidos en otros estudios realizados con *L. corniculatus* (Uzun et al. 2015) con algunos de los elementos esenciales. En este estudio trabajaron con semillas de *L. corniculatus* procedentes de diferentes localizaciones geográficas para tratar de determinar si su composición nutricional variaba en función de su origen. De todos los datos que obtuvieron, realizaron una serie de medias estadísticas con las que nosotros vamos a comparar algunos de nuestros resultados.

Respecto al calcio determinaron una asimilación media en planta de 18,64  $\pm$ 1,197 g/kg con un valor máximo de 21,87 g/kg y mínimo de 15,80 g/kg. En nuestros resultados obtuvimos un valor máximo en el tratamiento sin inocular y fertilizado de 20,03 g/kg  $\pm$ 0,38 y mínimo de 16,83 $\pm$ 0,52 en el tratamiento llevado a cabo con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N. Podríamos decir que estos resultados son muy similares a los que Uzun et al. obtuvieron en sus estudios.

La media que obtuvieron para el K fue de 12,26 $\pm$ 1,893 g/kg con un valor máximo de 19,07 g/kg y mínimo de 10,00 g/kg. Las plantas inoculadas con *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N mostraron en ambos casos una media en potasio de 36,55 g/kg. La media mínima en este elemento se observó para el tratamiento control sin inocular y fertilizado con un valor de 31.10 g/kg. Esto muestra unos datos de hasta tres veces superior a los que obtuvieron dichos investigadores en su trabajo. El potasio es un elemento esencial en la nutrición de la planta y se encuentra en pequeñas cantidades en el suelo, constituyendo una de las limitaciones del rendimiento de los cultivos. Estos resultados son por tanto muy positivos, porque la planta se va a beneficiar ampliamente de estos altos valores de K.

El tercer elemento en comparar es el Mg. Uzun et al. (2015) obtuvieron un valor medio de 3,55 mg/kg de Mg, con valor máximo de 4,33 mg/kg y mínimo de 2,90 mg/kg. Los valores medios de Mg medido en las plantas de nuestros tratamientos se mueven entre 5,07 mg/kg de máximo y 4,37 mg/kg de mínimo. El magnesio, aunque no suele ser un factor limitante en las plantas, se considera un bioelemento esencial al estar ligado a la molécula de clorofila y al metabolismo energético de la planta.

En lo que se refiere al fósforo encontramos unas medias máximas en los tratamientos control sin inocular y fertilizado y el inoculado con *M. jarvisii* CSLC28N. Este valor, similar en ambos tratamientos, fue de 3.95 mg/kg, ligeramente superior al valor máximo que Unzu *et al.* obtuvieron como valor máximo en sus estudios. Obtuvieron una media de 2,84 mg/kg, por lo que nuestros resultados se aproximan bastante a los que ellos obtuvieron para este elemento.

Es importante señalar que en ningún caso, la concentración obtenida para cada uno de los metales pesados analizados superó los niveles máximos recomendables en alimentos animales según la AAFCO (Association of American Feed Control), así como el Real Decreto 465/2003 sobre las sustancias indeseables en la alimentación

animal que, a su vez, viene regulada por la Directiva Europea 2002/32/CE sobre sustancias indeseables en la alimentación animal.

Con el análisis de todos los resultados obtenidos en cada una de las diferentes partes, podemos decir que las tres cepas inoculantes *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N son buenas candidatas para seguir siendo estudiadas como futuros biofertilizantes. Podemos destacar la cepa *M. jarvisii* CSLC28N con valores muy buenos de rendimiento, así como de composición nutricional. Estos datos demuestran que la competitividad y adaptación a tener en cuenta.

Estos resultados ponen de manifiesto un dato muy importante a tener en cuenta. La importancia de utilizar o aislar cepas nativas del entorno donde se quiera emplear el biofertilizante que constituya dicha cepa. Esto nos puede garantizar una mayor competitividad, por tener una mayor adaptación tanto al terreno como al ambiente. Los resultados de producción obtenidos con la nueva especie aislada de suelos de La Armuña, *M. helmanticense*, demuestran que la competitividad y la adaptación deben ser tenidas en cuenta a la hora de desarrollar un biofertilizante. La bacteria no solo debe tener capacidades PGPR, sino que debe ser además competitiva en ese suelo donde se vaya a emplear, para garantizar de esa manera una mejor adaptación al terreno y al ambiente.

### 3. Análisis del suelo.

Para comprobar los efectos acaecidos en el suelo antes y después de realizar los tratamientos de *L. corniculatus* con las diferentes cepas del género *Mesorhizobium*, realizamos un análisis iónico del suelo.

Para ello recogimos una muestra de suelo antes de realizar el ensayo y después de la segunda cosecha de la planta. Los datos aparecen reflejados como una media de dos muestras, por suelo, analizadas.

De los resultados recogidos en las tablas 46 y 47 podemos deducir que el contenido nutricional del suelo es adecuado, no modificándose de forma considerable las concentraciones de los diferentes elementos minerales después de las dos cosechas. Las pequeñas variaciones que se observan en los elementos tras la segunda cosecha consideramos que son consecuencia de la utilización de los mismos por las plantas para nutrirse, así como de la pequeña escorrentía que haya podido existir como consecuencia de los riegos regulares que se le proporcionaron a las plantas. La disminución de las concentraciones en cualquier caso es tan pequeña, que las consideramos despreciables.

Merece la pena señalar que el contenido de nitrógeno no varía y que la relación Carbono/ Nitrógeno (C/N) se encuentra dentro de los límites de lo que se considera una liberación media de Nitrógeno adecuada (8-12) en agricultura (Báscones Merino 2004).

Las plantas toman los nutrientes que necesitan del suelo. Cuando un elemento nutriente esencial para la planta se encuentra de forma insuficiente en el suelo, o bien hay una concentración elevada del mismo, los síntomas suelen ser visibles en la planta o bien, pueden no aparecer de forma visible, pero la planta se desarrollará de una forma más lenta de lo habitual. Cuando los efectos negativos son visibles, suelen ser indicativos de la deficiencia de los nutrientes en el suelo y pueden ocasionar un atrofia o reducción del crecimiento completo de la planta, clorosis de las hojas, necrosis o muerte de algunas zonas de las hojas, o bien de las hojas completas, entre otros muchos síntomas (Jones Jr 2012).

Las plantas de *Lotus corniculatus* utilizadas en nuestro estudio presentaron un desarrollo vegetativo normal y adecuado durante el tiempo que duró el ensayo de campo, sin denotar algún síntoma aparente o visible de enfermedad relacionada con la deficiencia de nutrientes. Por ello podemos concluir que el suelo de La Armuña, perteneciente al término municipal de Negrilla de Palencia (Salamanca), es adecuado y saludable para realizar actividades agrícolas.

**Tabla 46. Concentración del contenido de los elementos principales del suelo.**  
**Suelo A: suelo antes del tratamiento; suelo B: suelo después de la segunda cosecha.**

mg/Kg muestra	N	C	C/N	Ca	K	P
Suelo A	600	5400	9	4300	4300	800
Suelo B	600	5300	8,8	4300	3800	700

**Tabla 47. Concentración del contenido iónico de los minerales presentes en el suelo.**  
**Suelo A: suelo antes del tratamiento; suelo B: suelo después de la segunda cosecha.**

mg/Kg muestra	Al	As	Be	B	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	K	Li	Mg	Mn	Mo	Na	Ni
Suelo A	15900	0,09	0,96	4,02	0,17	<0,01	29,10	11,02	10411,26	4300	12,87	2700	354,50	0,24	150	10,80
Suelo B	15500	<0,01	0,82	3,81	0,15	<0,01	29,30	9,22	9282,21	3800	11,40	2500	309,49	0,18	1560	8,51

mg/Kg muestra	Pb	Rb	Sb	Se	S	Ti	Tl	V	Zn
Suelo A	11,53	27,78	0,54	1,84	22,08	166,84	21,41	18,02	28,89
Suelo B	10,21	24,22	0,75	3,42	20,64	172,12	20,15	16,22	25,59





*DISCUSIÓN*  
*GENERAL*



Existe en la sociedad una palpable preocupación relacionada con el rápido y contante aumento demográfico, que se encuentra concentrado principalmente en el mundo en desarrollo, y en el que están incluidos África, el Medio Oriente y partes de América Latina. Este crecimiento demográfico lleva asociada una crisis alimentaria sin precedentes, debido a que no existe en la Tierra suficientes recursos para poder abastecer tal cantidad de población. Se estima que en el año 2050 la cifra de la población mundial alcanzará los 9.600 millones, según la Organización de las Naciones Unidas.

La situación actual provoca que el desarrollo económico y social de los próximos años requiera un cambio en el modelo de crecimiento económico en España, en la Unión Europea y en el resto de los países en general. En este sentido, *La estrategia de Lisboa para el crecimiento y el empleo*, iniciada en 2005, establece un conjunto de políticas y reformas para que el marco regulador y económico de Europa sea más propicio a la investigación y la innovación, asumiendo la necesidad perentoria de avanzar hacia la sociedad del conocimiento y apostar firmemente por la competitividad, basada cada vez más en la ciencia y la tecnología, lo que requiere de un capital científico-tecnológico sólido sobre el que apoyarse. En esta tesitura, son muchos los aspectos susceptibles de cambio. Entre ellos, existe en la sociedad una palpable preocupación ante el empleo excesivo de agentes químicos en los cultivos. En la actualidad nos encontramos en un momento en el que se necesitan más alimentos que nunca para abastecer a toda la población, sin embargo esta producción agrícola se ve menguada por la degradación indebida de las tierras y el abuso de las sustancias químicas con las que se trabaja.

El aumento de las enfermedades respiratorias y de alergias, el incremento de las infecciones parasitarias o la toxicidad directa por NO<sub>2</sub>, son solo algunos de los efectos más importantes que sobre la salud humana genera el abuso indebido de fertilizantes químicos nitrogenados. En los ecosistemas también es palpable su efecto, con una disminución considerable de la biodiversidad asociada a los sistemas terrestres y acuáticos, el aumento de las enfermedades asociadas a plagas, el aumento de la acidificación, eutrofización y concentración de nitratos de aguas potables o la emisión de gases, constituyen solo algunos de los problemas medioambientales (Chen 2006; Erisman et al. 2011). Para hacer frente al uso y abuso de los fertilizantes químicos, que han provocado y provocan graves problemas ambientales y de salud pública, se deben buscar alternativas y soluciones.

Frente a las indudables desventajas ambientales y de salud pública que presentan los fertilizantes químicos, podemos contraponer los beneficios de los biofertilizantes. Los biofertilizantes son sustancias que contienen microorganismos vivos que ayudan, entre otros aspectos, a la expansión del sistema radicular y a una mejor germinación de la semilla. La adopción y uso eficaz de biofertilizantes microbianos en agricultura está llamada a ser una de las tecnologías clave para asegurar la sostenibilidad y productividad de este sector tan importante para las economías y las sociedades de todos

los países. Los microorganismos del suelo juegan un papel importante en la regulación de la dinámica de la descomposición de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrientes para las plantas, tales como N, P y S. Al mismo tiempo, los inoculantes microbianos constituyen un componente importante de la gestión integrada de los nutrientes, que conduce a una agricultura sostenible.

Afortunadamente, los microorganismos tienen la ventaja potencial de poder ser aplicados de tal manera, que sus efectos positivos sobre las plantas se mejoren notablemente (Tikhonovich y Provorov, 2009). Un aumento del uso de los microorganismos en los sistemas agrícolas podría permitir reducciones en la utilización de fertilizantes inorgánicos, agua, herbicidas y pesticidas, sin impacto en el rendimiento. Por ello es fundamental explorar en sistemas modelo seguro, que sean fuente de bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Las leguminosas de grano y forraje se cultivan en unas 180 millones de Ha, equivalentes al 12-15% de la superficie cultivable de la Tierra. Las forrajeras han sido la base para la producción de leche y carne desde hace siglos (Russelle, 2001). Además, su inclusión es fundamental en los infértiles suelos de sabana de los trópicos y subtrópicos. Se han cultivado por sus semillas o legumbres comestibles, para utilizarlas en forrajes e incluso también como ornamentales. Además, se pueden extraer a partir de ellas aceites, tinturas o principios activos medicinales. Muchas legumbres establecen una relación simbiótica con especies del género *Rhizobium*, que forman nódulos en las raíces para fijar nitrógeno atmosférico. Estos nódulos, son nichos ecológicos muy específicos y concretos y considerados seguros en cuanto a la presencia de patógenos. La presencia de estos nódulos en las raíces de las leguminosas, y por lo tanto la presencia de las bacterias que los producen, ha permitido a las leguminosas triunfar y consolidarse en ambientes muy diversos.

Esta adaptabilidad de las leguminosas, convierte al género *Lotus* en plantas muy importantes desde un punto de vista económico, ya que se utilizan como cultivos altamente productivos en sistemas de pastoreos en una amplia gama de paisajes, incluyendo algunos sometidos con frecuencia a ambientes y condiciones del suelo extremas (Blumenthal y McGraw, 1999). Conocer la diversidad y la abundancia de los microorganismos que nodulan en las especies de *Lotus*, es un enfoque valioso para una mayor selección y aplicación de las cepas como inoculantes. Estas cepas no sólo deben ser eficientes en la fijación del nitrógeno, como ocurre para bacterias del grupo de los rizobia, sino que también deben ser capaces de competir favorablemente con los microorganismos nativos de la planta y la rizosfera circundante. Por lo tanto, la formación de inoculantes requiere una selección previa y adecuada de los microorganismos.

Por supuesto, este análisis de la diversidad microbiana, aplicada a la interacción con las plantas, afecta no sólo al ámbito agrícola sino que repercute directamente en otros aspectos de la sociedad, entre los que se incluyen los ambientales y sanitarios. En

consecuencia, el objetivo general de esta investigación es mejorar la producción agrícola, incluidos los cultivos de elevado interés económico, favoreciendo la germinación, el crecimiento vegetal y la resistencia de las plantas, enfocándolo desde el punto de vista de la interacción microorganismo-planta, y así poder formular biofertilizantes multifuncionales seguros.

Los estudios realizados hasta la fecha sobre nódulos de *Lotus corniculatus*, se han centrado principalmente en las especies del género *Mesorhizobium* de forma aislada. Sin embargo, en los resultados obtenidos mediante el presente trabajo, hemos podido vislumbrar que esta planta tiene una gran diversidad de microorganismos endosimbiontes y endofíticos asociados a ella. De un total de 90 cepas aisladas de tres plantas diferentes, 52 de los aislados presentaban una elevada heterogeneidad morfológica entre ellas; a diferencia de las 38 restantes que presentaban un aspecto mucoso y blanquecino característico de bacterias rizobianas fijadoras de nitrógeno. En ese punto, decidimos separar las 90 cepas en dichos dos grupos para realizar mejor los diferentes análisis de caracterización genotípica (Capítulo I) y posteriormente los relacionados con la caracterización fenotípica (Capítulo II).

El análisis de los perfiles RAPD y TP-RAPD, nos confirmó que la diversidad de bacterias aisladas de nódulos de *L. corniculatus* era más alta de la esperada tanto a nivel infraespecífico, como a nivel de subespecie y especie. Los 52 aislados endofitos se distribuyeron en 18 grupos TP-RAPD diferentes y las 38 cepas endosimbiontes restantes en 11 grupos TP-RAPD; por lo que podíamos intuir que existían, al menos, 29 especies o subespecies diferentes. Para confirmarlo, el siguiente paso fue realizar un análisis del gen ribosómico 16S.

En primer lugar, se seleccionaron diferentes representantes de los 18 grupos TP-RAPD obtenidos para las bacterias endofitas, para llevar a cabo el análisis del gen ribosómico 16S. Los resultados obtenidos de realizar dicho análisis nos llevó a dividir este grupo tan heterogéneo en tres filos diferentes: Phylum *Proteobacteria* Phylum *Firmicutes* y Phylum *Actinobacteria*.

Es necesario señalar que el análisis del gen ribosómico 16S no resulta concluyente para delimitar las cepas dentro de una especie, siendo necesario complementarlo con otros análisis, entre los que podemos citar el análisis de los genes *recA*, *atpD*, *gyrB* y *rpoB*, y estudios de hibridación AND-ADN, entre otra serie de análisis para determinar su caracterización fenotípica, en el caso de las cepas que posiblemente pertenezcan a una nueva especie. Tal es el caso de las cepas *Roseomonas* sp. CSLC45N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Microbacterium* sp. CSLC118N, *Paenibacillus* sp. CSLC76N y *Lysinibacillus* sp. CSLC72N, cuyos porcentajes de similitud con las especie más próxima fueron en todos los casos inferiores al 99%.

La biodiversidad obtenida se ve reflejada también, en la diversidad de familias a las que pertenecen los 90 aislados. Más de la mitad de las bacterias endofitas aisladas

quedan englobadas dentro del filo *Actinobacteria*: 38 cepas repartidas en 4 familias diferentes. Dentro del filo *Firmicutes* encontramos 9 cepas, repartidas también en 4 familias distintas. Finalmente, en el filo *Proteobacteria* encontramos las 5 cepas restantes distribuidas, a su vez, en otras 4 familias distintas.

Aunque inicialmente se pensaba que en el interior de los nódulos únicamente podían existir las bacterias que los inducían, es decir, bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno, en los últimos años diversos estudios han demostrado que otros grupos bacterianos están presentes en el interior de estos nichos radiculares de las leguminosas, demostrando la presencia de un amplio rango y diversidad de bacterias simbióticas y no simbióticas en el interior de los nódulos, tanto Gram+ como Gram- (Velázquez et al. 2013).

Está ampliamente constatado en la bibliografía, la presencia de *Micromonospora* en el interior de nódulos de una amplia variedad de leguminosas (Trujillo et al. 2006; Trujillo et al. 2007; Cerda 2008; Carro et al. 2010; Trujillo et al. 2010; Martínez-Hidalgo 2012; Carro et al. 2016a; Carro et al. 2016b), habiéndose demostrado además la implicación que estas bacterias tienen en la promoción del crecimiento vegetativo de las mismas. Nuestros estudios confirman y refuerzan la idea de que la presencia de estas bacterias en el interior de los nódulos no es fortuita, recalcando la presencia de 20 cepas aisladas de nódulos de *L. corniculatus* identificadas y distribuidas en, al menos, 5 especies diferentes de *Micromonospora*. Estos resultados no hacen más que destacar la hipótesis del importante papel ecológico que las bacterias de este género parecen tener con las leguminosas.

Como señalábamos con anterioridad, se ha constatado la presencia de una amplia diversidad de bacterias no simbióticas en el interior de nódulos de diferentes leguminosas, conviviendo en lo que parece una perfecta armonía con las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. Ejemplos de ello son bacterias de los géneros *Paracoccus*, *Sphingomonas*, *Inquilinus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Staphylococcus*, *Lysinibacillus* y *Bacillus* cohabitando nódulos con bacterias rizobianas de los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*(*Ensifer*) en nódulos de *Sphaerophysa salsula* (Deng et al. 2011); también se han encontrado bacterias de los géneros *Methylobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium* y *Arthrobacter* en el interior de nódulos de *Lespedeza* sp. con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (Palaniappan et al. 2010). Del mismo modo también se han encontrado bacterias de *Paenibacillus* en nódulos de diferentes especies de *Glycyrrhiza* spp. (Li et al. 2012) y de *Acinetobacter* en nódulos de *Glycine max* (Li et al. 2008).

Todos estos estudios van en concordancia con la diversidad de bacterias aisladas de nódulos que nosotros hemos hallado en *Lotus corniculatus* cohabitando, en este caso particular, con una amplia diversidad de especies del género *Mesorhizobium*. Es la primera vez que se tiene constancia de tal diversidad de especies cohabitando los

nódulos de *L. corniculatus*, lo cual vuelve a poner de manifiesto, una vez más, el posible papel ecológico que las bacterias endofíticas parecen tener en el interior de los nódulos de las leguminosas, a las que *a priori* no parece causarles perjuicio alguno. En el caso de las Actinobacterias, se sabe que son capaces de producir una amplia gama de metabolitos secundarios, actuando como agentes de biocontrol contra patógenos fúngicos y como reguladores del crecimiento de la planta (Gadelhak et al. 2005; Valdés et al. 2005; Hirsch and Valdés 2010; Martínez-Hidalgo et al. 2014; Martínez-Hidalgo et al. 2015a).

En nuestro trabajo también hemos aislado cepas de los géneros *Dermaococcus* y *Roseomonas*, cuyo aislamiento del interior de nódulos no se había constado hasta ahora. Estos dos géneros se pueden incluir, por tanto, dentro de la lista de bacterias endofíticas capaces de entrar y cohabitar en el interior de nódulos de leguminosas, con diferentes géneros de bacterias tanto endofíticas, como endosimbiontes de estos hospedadores.

La presencia de bacterias que no son las tradicionales rizobia en el interior de nódulos de leguminosas ha sido referido en numerosos estudios, como ya hemos ido analizando. Sin embargo, nuestros estudios revelan la compleja interacción que se establece entre las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Mesorhizobium* y bacterias endofíticas no fijadoras de nitrógeno en las plantas de *L. corniculatus* que crecen en un clima templado en Europa Occidental. Estos hallazgos han sido previamente analizados en estudios realizados en Bélgica (De Meyer et al. 2015), donde observaron la compleja interacción que se establece entre los tradicionales rizobios y bacterias endofíticas en diferentes leguminosas. Entre las leguminosas con las que estos autores trabajaron se encuentran dos especies de *Lotus*, *L. corniculatus* y *L. pedunculatus*. Del interior de nódulos de plantas de *L. corniculatus* aislaron endofitos indentificados en 11 géneros diferentes: *Actinoplanes* sp., *Arthrobacter* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Acylobacter* sp., *Inquilinus* sp., *Phyllobacterium* sp., *Xanthobacteraceae* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Xanthomonas* sp. Así mismo, estudiaron la diversidad endofítica asociada a nódulos de *L. pedunculatus*, aislando bacterias no simbióticas distribuidas en 12 géneros diferentes: *Aeromicrobium* sp., *Curtobacterium* sp., *Plantibacter* sp., *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Chryseobacterium* sp., *Acinetobacter* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp., y *Xanthomonas* sp. A pesar de que nuestros resultados ponen de manifiesto una mayor diversidad de bacterias no fijadoras de nitrógeno asociadas a nódulos de *L. corniculatus*, los resultados obtenidos por De Meyer (De Meyer et al. 2015), refuerzan y confirman la diversidad de bacterias que lleva asociada la leguminosa *L. corniculatus* en sus nódulos, hasta ahora poco estudiada.

La diversidad de bacterias simbióticas en el interior de nódulos de *L. corniculatus* también ha quedado demostrada a raíz del análisis de los genes 16S, *recA*, *atpD* y *glnII*. De tal manera que las 38 cepas del género *Mesorhizobium* aisladas se distribuyeron en cinco clusters y dos linajes independientes, dentro del género

*Mesorhizobium*. Es decir, 7 especies diferentes entre las que encontramos *M. jarvisii*, *M. caraganae* y tres grupos filogenéticamente divergentes a las especies actualmente descritas dentro del género *Mesorhizobium* y que con toda probabilidad se identificarán como nuevas especies. De hecho, uno de ellos ya ha sido descrito como *M. helmanticense* (Marcos-García et al. 2017).

También hay que destacar, que estos grupos filogenéticos están ampliamente distribuidos a nivel mundial y las cepas que son capaces de nodular *L. corniculatus*, están distribuidas en varios países de Europa, América y Asia, como así demostramos en estudios previos (Marcos-García et al. 2015). Tres de estos grupos incluyen las especies de *Mesorhizobium* que recientemente se han descrito como endosimbiontes de *L. corniculatus*: *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015b).

La diversidad de bacterias rizobianas que pueden establecer simbiosis con *L. corniculatus* no ha sido muy estudiada hasta ahora. Nuestros resultados ponen de manifiesto la elevada diversidad filogenética de cepas que pueden nodular *L. corniculatus* en suelos salmantinos de Carbajosa de la Sagrada; esto nos permite predecir que con toda probabilidad se descubrirá aún más diversidad a medida que se investiguen otros ecosistemas (Marcos-García et al. 2015).

Por otro lado, el análisis filogenético del gen *nodC*, el cual permite identificar las cepas a nivel de simbiovar (Peix et al. 2015), nos mostró que a pesar de que nuestras cepas de *Mesorhizobium* se identificaron en especies filogenéticamente divergentes entre sí, todas se encuentran filogenéticamente relacionadas con el simbiovar *loti*, característico de las especies que nodulan *Lotus* spp. Esto puede ser posible gracias a la transferencia horizontal de genes que juega un papel muy importante en la diversificación de las poblaciones naturales de rizobios en el campo (Ampomah and Huss-Danell 2011). La transferencia de genes simbióticos dentro de las especies de rizobios y entre especies estrechamente relacionadas ocurre con frecuencia (Masson-Boivin et al. 2009a; Marek-Kozaczuk et al. 2013; Saidi et al. 2014; Peix et al. 2015). Por citar un ejemplo, el simbiovar *ciceri*, que confiere la capacidad de nodular *Cicer*, no se encuentra únicamente en la especie *Mesorhizobium ciceri*, sino que está distribuido en otras muchas especies del género *Mesorhizobium* (Rogel et al. 2011; Laranjo et al. 2012), entre las que podemos citar *M. amorphae* y *M. tianshanense*, capaces de nodular *Cicer arietinum* (garbanzo) y sin embargo, originalmente cuando se describieron estas dos especies, no podían nodularlo (Rivas et al. 2007; Rogel et al. 2011). Debemos señalar que la capacidad de una cepa para nodular varias leguminosas está relacionada con la presencia en su genoma o en diversos plásmidos de diferentes genes de nodulación, pero también con la promiscuidad de las propias leguminosas (Peix et al. 2015).

Una vez que se estudió la elevada diversidad filogenética de los nódulos de *L. corniculatus* de la comarca salmantina de Carbajosa de la Sagrada, el siguiente paso para encontrar cepas candidatas a formar futuros biofertilizantes, pasaba por realizar la

caracterización fenotípica de cada una de los 90 aislados (Capítulo II). Debemos tener en cuenta que los diferentes géneros bacterianos son componentes vitales de los suelos y están involucrados en varias de las actividades bióticas que acontecen en el ecosistema del suelo, haciéndolo más dinámico al intercambio de nutrientes y más sostenible para la producción de los cultivos (Ahemad et al., 2009 y Chandler et al., 2008). Además, son capaces de estimular el crecimiento de las plantas mediante la movilización de los nutrientes en el suelo, la producción de numerosos reguladores del crecimiento de las plantas, a la vez que confieren protección a las mismas contra agentes fitopatógenos, mejorando la estructura del suelo y actuando como agentes biorremediadores de los suelos contaminados, al ser capaces de captar elementos tóxicos (Ahemad, 2012, Ahemad and Malik, 2011, Hayat et al., 2010, Rajkumar et al., 2010 and Braud et al., 2009).

Los resultados obtenidos fueron muy positivos en los diferentes tipos de ensayos realizados *in vitro*, pudiéndose intuir el elevado potencial que presentan los diferentes géneros de bacterias aisladas, tanto de las cepas simbióticas como de las endofíticas. Para que los cultivos agrícolas sean sostenibles y menos dependientes de los fertilizantes químicos, es muy importante conocer los mecanismos de los que dispone la bacteria y que puedan contribuir a la mejora del crecimiento de la planta sobre la que va a ser aplicada (Ashrafuzzaman et al. 2009). Por eso, es esencial conocer la interacción microorganismo-planta para una correcta utilización y aplicación del mismo.

Debido a las limitaciones tanto de tiempo como de espacio, únicamente se escogieron 4 cepas endófitas, identificadas dentro de 4 géneros distintos, para realizar ensayos de co-inoculación en planta: *Bacillus aryabathai* CSLC41N, *Arthrobacter* sp. CSLC46N, *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N. Las cuatro cepas escogidas presentaban un compendio de características PGPR.

Las cuatro cepas seleccionadas son capaces de solubilizar fósforo, el segundo mineral más importante del mundo a nivel nutricional para la planta, después del nitrógeno. Las bacterias solubilizadoras de fosfato, presentan la capacidad de mejorar la fertilidad del suelo y su salud, al ser capaces de convertir las formas insolubles del P en formas asimilables para la planta. A través de la capacidad de quelar o solubilizar sideróforos que presentan las bacterias, como es el caso de las cepas *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. chokoriensis* CSLC88N, la planta se beneficia del aporte de este nutriente que es el hierro. Además de unirse al hierro, los sideróforos tienen la capacidad de unirse a una amplia variedad de metales existentes en el suelo, como el Al, el Pb y el Cd, actuando de esta manera como agente biorremediador para la planta en suelos contaminados con estos metales (Parmar and Chakraborty 2016).

Otra característica a tener en cuenta para el futuro inoculante es su capacidad para producir fitohormonas, como las auxinas, dentro de las cuales el ácido 3-indol-acético se considera una de las más importantes (Ashrafuzzaman et al. 2009). Estas hormonas vegetales son muy útiles en la agricultura porque regulan diversos procesos

del desarrollo vegetal, incluyendo la organogénesis, como el crecimiento de raíces y respuestas celulares tales como la expansión celular, la división y la diferenciación, así como la regulación de genes (Ryu and Patten 2008)(Ashrafuzzaman et al. 2009). Los resultados de este análisis nos revelaron una elevada heterogeneidad entre las diferentes cepas endófitas del estudio. En relación a esto, las cuatro cepas escogidas sí que presentaron homogeneidad entre ellas, con producciones de 0,32-0,33 g/mL de 3-indol-acético.

Es destacable apuntar que en cantidades altas, la auxina inhibe el crecimiento de las raíces primarias, aunque puede promover la formación de nuevas raíces secundarias. (Aloni et al. 2006). Se tiene constancia de que la producción de ácido 3-indol-acético por parte de bacterias PGPR puede variar entre diferentes especies y cepas, estando también influenciada por las condiciones de cultivo, la etapa de crecimiento y la disponibilidad de sustrato (Gusain et al. 2015). También es muy importante a tener en cuenta a la hora de utilizar un bioinoculante, las posibles fluctuaciones ambientales así como las limitaciones de macronutrientes que puedan acontecer, porque bajo ciertas situaciones de estrés la bacteria debe ser capaz de mantener su competitividad en la rizosfera y la liberación de AIA de las células bacterianas pueden ser directamente utilizado para el beneficio de la planta a la que la bacteria esté asociada (Malhotra and Srivastava 2009).

También se determinó la capacidad de los aislados para producir celulosa y formar biofilms. La capacidad de producir celulosa por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal puede ser un factor esencial en la formulación de bioinoculantes, porque les proporcionará la capacidad de adherirse a la superficie de las plantas y colonizarlas, además de poder formar con posterioridad biofilms que contribuyan al crecimiento, desarrollo y defensa de la planta. Debemos recordar que la formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos y que el crecimiento en biofilm les ofrece ventajas importantes como la protección de los microorganismos frente a la acción de agentes adversos, el incremento de la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, a la vez que se facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo de esta manera la posibilidad de deshidratación, y se posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas ventajas pueden incrementar la capacidad de supervivencia de dichos microorganismos (Costerton, *et al.*, 1999; Donlan, 2002).

Otra característica a destacar de todo inoculante es su capacidad de producir enzimas celulásicas. A nivel agrícola, las bacterias degradadoras de celulosa que producen celulasas, pueden desempeñar un papel fundamental en la colonización de las plantas, aumentando la competitividad para alcanzar los nichos del interior de las mismas, además de poder adquirir la capacidad de disminuir los efectos negativos que los posibles patógenos pudieran ocasionar en las plantas (Menendez et al. 2015). El proceso de infección que se establece en la mayoría de las leguminosas comienza con la penetración de los rizobios a través de los pelos radicales. La producción de estas

enzimas podría estar implicada directamente con la rotura de la celulosa presente en los pelos radicales, siendo una vía de entrada a la planta por parte del microorganismo. De hecho, algunos autores han relacionado de una forma directa estos enzimas con el proceso de infección primaria en el trébol (Robledo et al. 2008).

Una vez seleccionadas las 4 bacterias endófitas PGPR para realizar los ensayos de co-inoculación en plantas de *L. corniculatus*, necesitábamos seleccionar los mejores simbiontes fijadores de nitrógeno.

Así, el siguiente paso fue realizar ensayos de nodulación en planta de *L. corniculatus* (Capítulo IV), donde pudimos comprobar que las 38 cepas aisladas de *Mesorhizobium*, identificadas dentro de 7 grupos filogenéticos, algunos divergentes entre sí, tienen la capacidad de volver a nodular su planta hospedadora. De esta manera, *M. caraganae* CSLC04N y CSLC10N, *M. helmanticense* CSLC19N, CSLC37N y CSLC115N, *Mesorhizobium* sp. CSLC22N, *Mesorhizobium* sp. CSLC05N, CSLC06N, CSLC18N, CSLC31N y CSLC40N, *Mesorhizobium* sp. CSLC07N, CSLC15N, CSLC17N y CSLC24N, *Mesorhizobium* sp. CSLC30N y las dos especies filogenéticamente divergentes a las cepas tipo de las diferentes especies de *Mesorhizobium* existentes, y que corresponde a las cepas *Mesorhizobium* sp. CSLC09N, CSLC14N, CSLC27N y CSLC32N y *Mesorhizobium* sp. CSLC26N, CSLC35N y CSLC42N, pasan a ser endosimbiontes de *L. corniculatus*; junto con las actualmente descritas *M. loti*, *M. erdmanii* y *M. jarvisii* (Martínez-Hidalgo et al. 2015b). Estos hallazgos suponen toda una revelación, al encontrar nuevas especies de *Mesorhizobium*, filogenéticamente divergentes a los endosimbiontes naturales de *L. corniculatus*, capaces de nodular esta planta, a la vez de cohabitar un mismo nódulo con otros endosimbiontes identificados en diferentes especies.

De la observación de la cinética de nodulación, del número total de nódulos formados y de la estructura interna de los nódulos formados, llegamos a la conclusión de que todas y cada una de las 38 cepas son capaces de volver a nodular su planta hospedadora de una forma eficiente y sana para la planta. Aunque se observan diferencias respecto a la variabilidad del número de nódulos efectivos e inefectivos formados, así como de la cinética de nodulación entre las diferentes cepas, está claro que todas son capaces de nodular con éxito la planta. Sin embargo, dos cepas sobresalieron por encima de las demás en dos aspectos: respecto a la cinética de nodulación, observando un crecimiento lineal y ascendente hasta el final del ensayo, como respecto al número de nódulos totales inducidos, de los cuales más de la mitad eran efectivos (de color rosáceo). *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, fueron los dos endosimbiontes escogidos para realizar los ensayos de co-inoculación.

Las características que como PGPR puedan tener estas dos cepas endosimbiontes son también muy importantes, porque la planta se puede proveer de una mayor cantidad de nutrientes que son suministrados, tanto por las bacterias endofitas,

como previamente hemos analizado, como por las bacterias endosimbiontes, a las que hay que añadir su gran capacidad para fijar nitrógeno atmosférico y hacerlo asimilable para la planta.

El siguiente paso del estudio, una vez conocidas tanto la identidad como las características de nuestras cepas de estudio, fue realizar ensayos de co-inoculación con el objetivo de saber y observar cómo se comportan los microorganismos endófitos al ser inoculados junto con endosimbiontes de la propia planta (Capítulo IV). Diferentes estudios de coinoculación realizados con cepas simbiotes y diferentes géneros de bacterias endofíticas, ya habían mostrado los excelentes resultados que supone realizar estas combinaciones aplicadas a leguminosas. Observaron un crecimiento efectivo de la planta, así como un aumento de la nodulación al realizar las coinoculaciones con actinobacterias tales como *Streptomyces*, *Bacillus* o *Micromonospora* (Saini et al. 2015; Solans et al. 2015). Nuestros resultados confirman los hallazgos realizados por estos autores, confirmando el potencial que presentan nuestras cepas, previamente determinadas por los ensayos de caracterización fenotípica realizados en condiciones de laboratorio.

En cualquiera de las coinoculaciones llevadas a cabo, con uno u otro endosimbionte, las plantas presentaron un aspecto totalmente sano, y la morfología de los nódulos, tanto efectivos como inefectivos, que fueron inducidos eran completamente normales; es decir, nódulos determinados característicos de *L. corniculatus*. También es de destacar que en cualquiera de los tratamientos llevados a cabo, ambos endosimbiontes fueron capaces de volver a nodular su hospedador, sin perjudicarlo de algún modo la presencia de las bacterias endófitas que consiguieron entrar en el interior de los nódulos, como así pudimos comprobar al aislar de nuevo cada una de ellas de su interior. Por tanto, una vez más se vuelve a demostrar la presencia de bacterias no simbióticas en el interior de los nódulos. Es decir, estas bacterias tienen la capacidad, una vez aisladas, de volver a entrar en el interior de los nódulos y cohabitarlos con los endosimbiontes de la planta, pudiendo ser recuperados con posterioridad.

El mecanismo que las bacterias endófitas empleen para entrar en su interior no ha sido del todo esclarecido y, en nuestros estudios, no lo hemos podido llegar a determinar. Sin embargo, se han llevado a cabo ensayos de nodulación en *Arachys hypogaea* (cacahuete), donde han podido volver a recuperar del interior de los nódulos formados, las cepas co-inoculadas de *Bradyrhizobium* con diferentes cepas de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Pseudomonas* (Ibáñez et al. 2009). Estos autores pusieron de manifiesto la capacidad de estas bacterias endófitas para colonizar los nódulos durante e incluso después de su formación, mediante experimentos de coinoculación retardada. Además, pudieron comprobar también su capacidad para promover el crecimiento vegetal en esta leguminosa, mediante ensayos de inoculación de cada una de estas bacterias endófitas en la planta de cacahuete; así como un aumento de la formación de nódulos cuando estas bacterias se encontraban en coinoculación con *Bradyrhizobium*.

En nuestros análisis de visualización de la estructura interna de los nódulos inducidos en cultivo hidropónico, hemos podido observar algunas alteraciones relativas a la organización interna del tratamiento llevado a cabo con *M. jarvisii* CSLC28N y *Arthrobacter* sp. CSLC46N. Respecto a los tratamientos realizados con *M. jarvisii* CSLC28N y *Streptomyces* sp. CSLC56N y *M. jarvisii* CSLC28N y *M. chokoriensis* CSLC88N, observamos células definidas, sin observar de forma nítida los simbiosomas en su interior. Estas estructuras tan peculiares en ningún caso se observaron en los nódulos inducidos por *M. jarvisii* CSLC28N cuando fue inoculada de forma simple, por lo que deducimos que tienen que ser debidas a la coinoculación realizada con cada una de estas dos cepas endófitas. En cambio, los nódulos observados de las coinoculaciones realizadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N tienen una estructura interna perfectamente definida y organizada, con los simbiosomas claramente definidos.

La observación de los nódulos inducidos en el ensayo llevado a cabo en invernadero nos mostró una estructura interna nodular perfectamente definida y organizada. En esta ocasión los nódulos efectivos presentaban un mayor tamaño que los vistos hasta ahora en los ensayos llevados a cabo en cultivo hidropónico. Esto es perfectamente comprensible si tenemos en cuenta que la superficie de crecimiento que poseen las plantas al ser cultivadas en macetas, en los ensayos de invernadero, es mayor que la superficie de crecimiento que proporciona el tubo.

De estos resultados podemos obtener la potencial aplicación agronómica que las bacterias aisladas en este estudio, del interior de nódulos de *L. corniculatus* poseen. Hemos podido comprobar las capacidades PGPR que tienen *in vitro* y hemos comprobado que, además, en coinoculación son capaces de convivir y cohabitar un mismo nicho, bacterias simbiotes y endófitas, sin causarle perjuicio a la planta ni, aparentemente, entre ellas; confirmando de esta manera los resultados obtenidos previamente por Ibáñez et al. (Ibáñez et al. 2009).

Una vez demostrado y comprobado que el proceso de nodulación se desarrolla de una manera normal y eficiente, el siguiente paso era conocer el proceso de adhesión e infección que tiene lugar entre *Mesorhizobium* y *L. corniculatus*, con el fin de conocer las diferentes etapas de colonización, así como las posibles entradas del rizobio en el interior de su hospedador (Capítulo V). En la mayoría de las leguminosas la infección más frecuente que se produce con las bacterias rizobianas es la vía canónica, pero se conocen dos vías de entrada más: a través de “cracks”, heridas o grietas directamente en la pared celular de la planta; y por último penetrando por los espacios intercelulares (Capoen et al. 2010; Madsen et al. 2010; Mateos et al. 2011). En el caso de *Lotus*, algunos autores han observado que un único genotipo de *Lotus* puede ser infectado a través de diferentes vías (Gossmann et al. 2012).

De los resultados de infección y colonización llevados a cabo con los endosimbiontes *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N en semillas de

*L. corniculatus* hemos podido demostrar que ambas cepas tienen la capacidad de adherirse, infectar y nodular de una manera eficiente este hospedador, penetrando por vía canónica a través de canales de infección, hasta finalmente formar nódulos funcionales y efectivos. Estos resultados van en concordancia con ensayos previos, donde no solamente observaron la estructura interior de los nódulos determinados de *Lotus* (Masson-Boivin et al. 2009b), sino la presencia de canales de infección en el proceso de infección nodular (Oldroyd and Downie 2008; Gibson et al. 2008). Del mismo modo, pudimos observar como ambas bacterias, utilizando la misma vía de entrada, son capaces de convivir y cohabitar el interior de los nódulos de una forma conjunta comportándose de tal modo como endosimbiontes naturales de dicho hospedador, una situación que hasta ahora no había sido observada.

Una vez demostrado el potencial que poseen nuestras bacterias y que el proceso de colonización, infección y nodulación se llevaba a cabo de una manera natural y en armonía con la planta, tanto en presencia única del endosimbionte, como junto con las diferentes bacterias endofíticas, quisimos avanzar un paso más en la búsqueda del mejor inoculante para la leguminosa forrajera *L. corniculatus* (Capítulo VI). El objetivo era demostrar la capacidad de promover el crecimiento vegetativo de nuestras cepas inoculantes, de las que previamente habíamos constatado su potencial PGPR en los diferentes cultivos y ensayos *in vitro* llevados a cabo en el laboratorio. Estudios llevados a cabo por otros autores demostraron la capacidad de promover el crecimiento vegetativo en diferentes cultivos, después de observar previamente el potencial PGPR de los inoculantes *in vitro* (García-Fraile et al. 2012; Flores-Félix et al. 2013; Flores-Félix et al. 2015; Jiménez-Gómez et al. 2016; Díez-Méndez et al. 2016).

De los estudios llevados a cabo en invernadero con plantas de *L. corniculatus* con nuestras cepas simbióticas y endofíticas, previamente seleccionadas, merece la pena destacar que a grandes rasgos, las plantas inoculadas y coinoculadas con la cepa *Mesorhizobium* sp. CSLC35N presentan mayor porte aéreo que las inoculadas y coinoculadas con *M. jarvisii*. CSLC28N. Además, los 5 tratamientos realizados con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, tanto la inoculación simple como las cuatro coinoculaciones, presentan diferencias estadísticamente significativas con los dos tratamientos control. Respecto al rendimiento obtenido, nuevamente vuelve a destacar el tratamiento llevado a cabo con *Mesorhizobium* sp. CSLC35 y *M. chokoriensis* CSLC88N.

Un dato curioso que llama la atención es que el rendimiento obtenido del tratamiento llevado a cabo con *M. jarvisii* CSLC28N es eficiente por sí solo. Es decir, esta cepa es tan competitiva y tan buena noduladora, que con el nitrógeno que fija y con el aporte de fósforo y ácido 3-indol-acético que es capaz de producir, es suficiente para promover un positivo crecimiento vegetativo de la planta. Estos resultados refuerzan la idea de realizar ensayos de caracterización fenotípica, así como de nodulación en el

caso de las bacterias simbióticas, que nos permitan discriminar y seleccionar entre una amplia diversidad de bacterias, las que presenten mayor potencial PGPR.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) ayudan a la asimilación de diferentes elementos nutritivos por parte de la planta, con el fin de mejorar su crecimiento y desarrollo. Por esta razón, decidimos analizar el contenido de ciertos elementos esenciales para la planta, con el objeto de averiguar si los coinoculantes endófitos, así como las dos cepas rizobianas, ayudaban a asimilar una mayor cantidad de estos elementos.

Las plantas del tratamiento llevado a cabo con *M. jarvisii* CSLC28N presentó unos valores del contenido de nitrógeno, muy próximos a las plantas que fueron inoculadas con el tratamiento C+ (sin inocular y fertilizado). Respecto al contenido de carbono, destaca este tratamiento también por encima de los dos controles; sin embargo, aunque a grandes rasgos los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos son bastante homogéneos, son superiores los datos obtenidos de las plantas inoculadas con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Bacillus aryabathai* CSLC41N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *Streptomyces* sp. CSLC56N.

Haciendo balance del contenido de elementos y oligoelementos analizados en las planta de cada uno de los tratamientos, podemos afirmar que en ningún caso los tratamientos empleados han afectado de manera negativo al desarrollo nutricional de la planta. Todos los tratamientos son susceptibles de seguir siendo estudiados, con el objetivo de encontrar el más eficiente y productivo a nivel agrícola. Sin embargo, podemos destacar el tratamiento coinoculado con *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. chokoriensis* CSLC88N, por la promoción del crecimiento vegetativo de la planta, el rendimiento, el contenido de nitrógeno asimilado por la planta, así como de Fe y Al, que hemos podido observar de los análisis realizados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en sus estudios, donde llevaron a cabo la coinoculación de un rizobio con una *Micromonospora*, en *L. tenuis* obteniendo un incremento tanto de la biomasa vegetal, como de la nodulación, respecto a la inoculación individual con el rizobio (Solans et al. 2015).

Una vez más, se vuelve a demostrar el potencial que presentan las actinobacterias y el género *Bacillus* para, en coinoculación con distintas especies de rizobia, promover de una manera eficiente el crecimiento vegetativo de la leguminosa hospedadora (Martínez-Hidalgo et al. 2014; Saini et al. 2015; Solans et al. 2015).

El último paso para completar los estudios iniciados, era comprobar el potencial agronómico que las dos bacterias endosimbiontes poseen directamente en campo (Capítulo VI). Se añadió un tercer tratamiento, *M. helmanticense* CSLC115N, porque nos interesaba saber y observar cómo se comportaba esta nueva especie de *Mesorhizobium* en campo con su planta hospedadora *L. corniculatus*.

Con nuestros ensayos de campo hemos podido comprobar un incremento en el rendimiento de *L. corniculatus*, destacando de forma positiva los tratamientos realizados con *M. jarvisii* CSLC28N y *M. helmanticense* CSLC115N, con un rendimiento anual acumulativo de dos cortes de 5.977 Kg/ha y 6.306 Kg/ha, respectivamente. El rendimiento obtenido por *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, fue ligeramente inferior a los dos anteriores, 5088 Kg/ha. Pero, en general, estos rendimientos se correlacionan con los obtenidos en esta misma leguminosa forrajera en diferentes partes del mundo (Acuna P 1998; Marley et al. 2006; Pecetti et al. 2009); y merece la pena destacar que en esos estudios se realizaron tres cortes del cultivo, mientras que nosotros únicamente llevamos a cabo dos.

Tomados todos los resultados en conjunto de los diferentes estudios llevados a cabo, podemos decir que las tres cepas inoculantes *M. jarvisii* CSLC28N, *Mesorhizobium* sp. CSLC35N y *M. helmanticense* CSLC115N son buenas candidatas para seguir siendo estudiadas como futuros biofertilizantes, destacando por encima la cepa *M. jarvisii* CSLC28N por el rendimiento y la composición nutricional obtenidos en las plantas inoculadas con dicha bacteria. Por tanto, habríamos alcanzado el objetivo inicial propuesto al inicio de esta Tesis Doctoral: la búsqueda de la cepa o cepas, seguras para el hombre y no patógenas para la planta, capaces de suministrarle y aportar los nutrientes que el cultivo necesita, a la vez que promueve un crecimiento vegetativo óptimo para la planta que se traduce en un incremento del rendimiento.

Por otro lado, es muy importante recalcar la importancia de emplear como inoculantes aquellas bacterias que sean competitivas en el terreno donde serán utilizadas, para garantizar una mejor adaptación al terreno. De ahí radica la importancia de aislar cepas nativas del entorno donde se quiera emplear el biofertilizante. La competitividad de la bacteria, en adición a las capacidades PGPR que presente, garantizará una mayor colonización en la planta que se traducirá en el mayor crecimiento vegetativo de la planta. Esto lo hemos podido observar y de esta manera demostrar, gracias a los estudios llevados a cabo en campo y los resultados obtenidos a través de ellos, con la cepa *M. helmanticense* CSLC115N.

Otra de las líneas de investigación que abrimos en esta Tesis doctoral, es el potencial uso biotecnológico que se puede obtener de algunos de nuestros aislados (Capítulo III). Vivimos en un mundo cada vez más globalizado que abusa de manera indiscriminada de los recursos naturales de los que dispone la Tierra. En este sentido, buscar alternativas económicas que den un respiro al planeta se ha convertido en las últimas décadas en una de las líneas prioritarias dentro del mundo de la investigación. Los microorganismos aislados en este trabajo, son capaces de producir multitud de sustancias que como hemos podido observar hasta ahora, tienen un destino eminentemente agrícola. Sin embargo, el potencial biotecnológico que poseen los microorganismos, abre un amplio abanico de posibilidades donde ser aplicados y utilizados. Tal es caso de los microorganismos productores de biopolímeros, como la celulosa y los ácidos polihidroxialcanoatos, muy útiles y utilizados en diferentes

campos de la industria, como son agricultura, ciencia de los alimentos y forestales, farmacia y medicina entre otras (Convenio sobre la Diversidad Biológica, Artículo 2. Uso de Términos, Naciones Unidas. 1992) (Karl Ereky, 1919)(Spiekermann et al. 1999; Shamala et al. 2003).

A raíz de los diferentes estudios llevados a cabo relativos al análisis e identificación de los expolisacáridos producidos por nuestras cepas de estudio, pudimos comprobar la producción de celulosa o un derivado de la misma por parte de *M. helmanticense* CSLC19N, *Mesorhizobium* sp. CSLC23N y *Mesorhizobium* sp. CSLC24N. No obstante, debido a los resultados obtenidos tras el análisis físico de difracción de Rayos X y FTIR, es posible que la correcta identificación de celulosa se esté viendo enmascarada por algunos elementos que generen distorsión en su caracterización, no pudiendo esclarecer correctamente su identificación. No obstante, ha quedado demostrado que esta cepas, junto con *Mesorhizobium* sp. CSLC09N, CSLC26N y CSLC30N, son capaces de producir dos biopolímeros con la capacidad de adherirse a la superficie vítrea, lo que denota el potencial que presentan las bacterias del género *Mesorhizobium* a nivel biotecnológico.

Este potencial biotecnológico se vio confirmado tras realizar el análisis de la producción de ácidos polihidroxicanoatos (PHAs) (Capítulo III). De la totalidad de cepas de *Mesorhizobium*, 20 presentaron capacidad para formar gránulos citoplasmáticos fluorescentes de color anaranjado, como así pudimos comprobar al observar una muestra representativa de cada uno de ellos con el microscopio de fluorescencia. Los resultados de la identificación resultaron muy reveladores, porque las 20 cepas son capaces de producir ácido 3-hidroxi-butírico (3HB;  $C_4H_6O_2$ ), es decir, el monómero que constituye poli-3-hidroxi-butirato, el PHA de cadena corta que con mayor frecuencia producen los microorganismos (Spiekermann et al. 1999; Luengo et al. 2003). Además, también se identificaron los monómeros 3-hidroxi-pentanoico, también llamado 3-hidroxi-valerato o ácido 3-hidroxi-valérico (3HV;  $C_5H_{10}O_3$ ); 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD;  $C_{16}H_{32}O_3$ ) y ácido 3-hidroxi-hexadecanoico (3HHD,  $C_{16}H_{32}O_3$ ).

De entre las 20 cepas productoras, tan solo *M. jarvisii* CSLC36N es capaz de formar de manera moderada, monómeros de 3HHD, además de los monómeros PHB, PHV y 3HDD, lo cual le confiere un elevado potencial para la formación de diferentes copolímeros, que son de los tipos de polihidroxicanoatos bacterianos más deseados e interesantes que hasta ahora se han descubierto (Takahashi et al. 1994). Sin embargo, la cepa *M. caraganae* CSLC10N destaca entre las demás por su capacidad de producir la mayor cantidad de monómeros PHB y PHV, siendo capaz también, de forma moderada, de producir monómeros de 3HHD.

En general, creemos que las cepas del género *Mesorhizobium* analizadas en este estudio, particularmente la cepa *M. jarvisii* CSLC36N, deberían ser consideradas para realizar estudios más exhaustivos basados en la optimización de la producción de PHAs.

Además, podemos concluir a raíz de la identificación de los PHAs, que la producción de los mismos es dependiente de cepa y no de especie.

Después de analizar y estudiar algunos de los biopolímeros producidos por las cepas aisladas del interior de nódulos de *L. corniculatus* e identificadas en diferentes especies del género *Mesorhizobium*, podemos destacar el enorme potencial tecnológico que proporciona dicho género. En este trabajo se muestra la capacidad que poseen diferentes especies del género *Mesorhizobium* de producir de forma simultánea varios biopolímeros con amplias posibilidades de estudio y de aplicación a nivel industrial.

Uno de los mayores retos que persigue la sociedad del siglo XXI es la producción de una agricultura racional y sostenible. Prácticas agrícolas que vayan encaminadas a disminuir el uso que actualmente se tiene de los plaguicidas, fertilizantes y herbicidas de origen químico y que tantos costos ambientales y de salud pública se han derivado de su abuso (Berg 2009). Desafortunadamente, a pesar de que los microorganismos asociados a las plantas cumplen importantes funciones del ecosistema, en suelos y plantas, la interacción beneficiosa microorganismo-planta fue ignorada por mucho tiempo en las estrategias de mejoramiento agrícolas.

La proporción de bacterias aisladas que expresan rasgos promotores del crecimiento de las plantas es mucho mayor de lo que en general se preveía (Cattelan et al. 1999; Fürnkranz et al. 2009). En rasgos generales, existen dos posibilidades de influir en el potencial antagonista y/o promotor del crecimiento de las plantas. El primero mediante la gestión del potencial microbiano autóctono a través, por ejemplo de la introducción en el cultivo de enmiendas orgánicas o inorgánicas (Hallmann et al. 1999; Conn and Lazarovits 2000). La segunda posibilidad es mediante el empleo de microorganismos autóctonos que actúen como agentes de biocontrol y/o promotores del crecimiento de las plantas (Compant et al. 2005; Weller 2007). Además, en la última década la popularidad de los inoculantes microbianos ha aumentado sustancialmente, debido a que los diferentes estudios que se han ido llevando a cabo en torno a ellos han mejorado su eficacia y consistencia (Thakore 2006; Berg 2009).

Por todo ello, en la búsqueda de un futuro agrícola más sostenible, es necesario seguir estudiando e investigando el potencial que presentan diferentes fuentes de obtención de microorganismos potenciales PGPR en la búsqueda por conseguir un biofertilizante adecuado para cada tipo de cultivo. Con la presente Tesis Doctoral, hemos dado un paso más en la búsqueda por encontrar el biofertilizante más adecuado para la leguminosa forrajera *Lotus corniculatus*, estudiando la comunidad bacteriana aislada de sus propios nódulos radiculares en una región geográfica concreta del oeste de la Península Ibérica. Hemos demostrado el potencial que presentan las diferentes bacterias simbióticas y endófitas aisladas en el presente estudio, en la promoción del crecimiento vegetativo de dicha leguminosa, y que vienen derivadas tanto del potencial PGPR que presentan ambos grupos, así como de la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias endosimbiontes. A todo ello se suma el potencial biotecnológico hallado en las

bacterias del género *Mesorhizobium*, a través de la capacidad de las mismas de producir diferentes biopolímeros.

Por tanto, teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, hemos alcanzado el principal objetivo propuesto al inicio de nuestro trabajo, la búsqueda de un futuro biofertilizante para *Lotus corniculatus*. No obstante, después de analizar todos los resultados, y en base al potencial agrícola y biotecnológico que han demostrado nuestros aislados, también deducimos que se debe seguir trabajando y analizando las posibles diversas capacidades de las bacterias simbióticas y no simbióticas obtenidas en este trabajo.





# CONCLUSIONES



A continuación se exponen las principales conclusiones extraídas de esta Tesis Doctoral:

1. En este trabajo se ha documentado por primera vez la presencia como endófitos en el interior de nódulos de *L. corniculatus* de cepas de los géneros *Dermacoccus* y *Roseomonas* lo que unido a la heterogeneidad de aislados obtenidos de los nódulos de una misma planta, nos permite concluir que la diversidad de bacterias endófitas aisladas de nódulos de *Lotus corniculatus* de plantas cultivadas en un único suelo es más alta de la esperada y documentada hasta la fecha, como así hemos podido comprobar al realizar los diferentes ensayos de caracterización genotípica, encontrando al menos 25 especies diferentes incluídas en 17 géneros distintos.
2. A raíz de los resultados obtenidos del análisis filogenético de los genes 16S ARNr, *recA* y *atpD* hemos podido comprobar la existencia de 7 grupos filogenéticamente divergentes del género *Mesorhizobium*, concluyendo que la diversidad de bacterias endosimbiontes de *L. corniculatus* es mayor de la esperada y documentada hasta la fecha. Además, los resultados obtenidos del análisis de los genes 16S ARNr, *recA* y *atpD*, confirman que la diversidad filogenética de cepas con la capacidad de nodular *L. corniculatus* en diferentes continentes y países, es muy elevada. Esta conclusión se refuerza con la descripción de la nueva especie, *M. helmanticense*.
3. Hasta la fecha los endosimbiontes naturales descritos de *L. corniculatus* eran *M. loti*, *M. jarvisii* y *M. erdmanii* a los que ahora hay que sumar las especies *M. caraganae* y *M. helmanticense* descritas en este trabajo como endosimbiontes de esta planta. Sin embargo, el análisis filogenético del gen *nodC*, ha demostrado que las especies del género *Mesorhizobium* aisladas en el presente estudio son portadoras del simbiovar *loti*, el cual probablemente han adquirido mediante eventos de transferencia genética horizontal por lo que de nuevo se demuestra que este tipo de mecanismos son fundamentales para que las especies de *Mesorhizobium* y de rhizobia en general, amplíen su rango de hospedador y sean capaces de colonizar nuevos nichos naturales.
4. Este trabajo ha demostrado que dos especies diferentes de *Mesorhizobium*, *M. jarvisii* CSLC28N y *Mesorhizobium* sp. CSLC35N, son capaces de invadir y cohabitar un mismo nódulo de *L. corniculatus* sin que exista una competencia que incida negativamente en la supervivencia de alguna de las dos bacterias o que cause algún tipo de reacción negativa en la planta hospedadora, por lo que a priori podrían diseñarse biofertilizantes seguros y eficaces para *L. corniculatus* en base a varias cepas de diferentes especies.
5. Tras los resultados obtenidos de los ensayos de producción vegetal podemos decir que *M. jarvisii* CSLC28N y *M. helmanticense* CSLC115N son buenos

- candidatos para diseñar y desarrollar biofertilizantes eficientes para la leguminosa forrajera *L. corniculatus*.
6. El análisis y la determinación de ácidos polihidroxicanoatos producidos por bacterias del género *Mesorhizobium* aisladas de nódulos de *L. corniculatus*, nos ha llevado a la identificación de cuatro monómeros diferentes: 3-hidroxi-butírico (3HB); 3-hidroxi-valérico (3HV; C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>); 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD; C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>); 3-hidroxi-hexadecanoico (3HHD; C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>). Además, hemos comprobado que esta capacidad es dependiente de cepa y no de especie por lo que podemos afirmar que los nódulos de leguminosas constituyen una fuente potencial inexplorada de bacterias productoras de PHAs.
  7. Algunos de los aislados obtenidos en este trabajo se han mostrado como interesantes bacterias productoras de biopolímeros con enlaces  $\beta$ ,1-4 entre los que se encuentra la celulosa, por lo que en base a los datos obtenidos, cepas del género *Mesorhizobium* pueden constituir una alternativa medioambientalmente sostenible y económicamente atractiva para la obtención de este bioproducto u otros similares con potencial biotecnológico.
  8. La competitividad en los procesos de colonización de la raíz por parte de cepas del género *Mesorhizobium*, va ligada a la capacidad de producir celulasas puntuales y a la capacidad de las cepas para producir celulosa, ya que ambas cualidades son indispensables para que las bacterias sean capaces de desarrollar un biofilm competente.
  9. Los datos obtenidos en este trabajo, han permitido ampliar el conocimiento sobre especies de bacterias que pueden actuar como endófitos y endosimbiontes en nódulos de *L. corniculatus*, y vislumbrar sus posibles implicaciones ecológicas y agrícolas, creando un valioso recurso para futuros trabajos en áreas relacionadas con la investigación de bacterias endófitas y endosimbiontes de leguminosas.



## *BIBLIOGRAFÍA*



- Abd-Alla MH** (1994) Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. Lett Appl Microbiol 18:294–296. doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00873.x
- Abel K, Deschmertzing H, Peterson JI** (1963) Classification of microorganisms by analysis of chemical composition I. Feasibility of utilizing gas chromatography. J Bacteriol 85:1039–44.
- Acebes Ginovés JR, Oliva Tejera F** (2007) Current status and uses of the endemic *Lotus* to the Canary Islands. Lotus Newslett 37:65–66.
- Acuña HP** (1998) Varietal comparison of three species of genus *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) in soils with aptitude for cropping rice. Agric. técnica 58:7–14.
- Ahemad M, Khan MS** (2012) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. Chemosphere 86:945–950. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.013
- Ahemad M, Malik A** (2012) Bioaccumulation of Heavy Metals by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. Bacteriol. J. 2:12–21.
- Ahmed A, Hasnain S** (2010) Auxin producing *Bacillus* sp. : auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. Pure Appl Chem 1:813–319.
- Akduman B, Uygun M, Çoban EP, et al** (2013) Reversible Immobilization of Urease by Using Bacterial Cellulose Nanofibers. Appl Biochem Biotechnol 171:2285–2294. doi: 10.1007/s12010-013-0541-3.
- Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T** (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. Appl Environ Microbiol 66:3393–8. doi: 10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000.
- Alexander DB, Zuberer DA** (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils 12:39–45. doi: 10.1007/BF00369386
- Allan GJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, et al** (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: *Loteae*). Mol Phylogenet Evol 32:123–138. doi: 10.1016/j.ympev.2003.11.018
- Allan GJ, Porter JM** (2000) Tribal delimitation and phylogenetic relationships of *Loteae* and *Coronilleae* (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. Am J Bot 87:1871–81.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. Ann Bot 97:883–893. doi: 10.1093/aob/mcl027
- Ammon HPT, Ege W, Oppermann M, et al** (1995) Improvement in the Long-Term Stability of an Amperometric Glucose Sensor System by Introducing a Cellulose Membrane of Bacterial Origin. Anal Chem 67:466–471. doi: 10.1021/ac00098a036.
- Ampomah OY, Huss-Danell K** (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. Syst Appl Microbiol 34:267–275. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.006.

- Andrews M, James EK, Cummings SP, et al** (2003) Use of Nitrogen Fixing Bacteria Inoculants as a Substitute for Nitrogen Fertiliser for Dryland Gramineous Crops: Progress Made, Mechanisms of Action and Future Potential.
- Anjum A, Zuber M, Zia KM, et al** (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol* 89:161–174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Arambarri AM** (2000) A Cladistic Analysis of the New World Species of *Lotus* L. (Fabaceae, Loteae). *Cladistics* 16:283–297. doi: 10.1111/j.1096-0031.2000.tb00284.x
- Arora NK, Khare E, Oh JH, et al** (2008) Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:581–585. doi: 10.1007/s11274-007-9505-5.
- Ashrafuzzaman M, Hossen F, Ismail M, et al** (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth.
- Ausmees N, Jonsson H, Høglund S, et al** (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 145:1253–1262. doi: 10.1099/13500872-145-5-1253
- Ayres JF, Kelman WM, Blumenthal MJ** (2008) The Sharna greater *Lotus* (*Lotus uliginosus* Schkuhr) germplasm—potential for low latitude environments. *Lotus Newslett* 38:7–19.
- Badri D V, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM** (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Ball P.** (1968) *Dorycnium, Lotus, Tetragonolobus*. In: Tutin V., Heywood N., Burges D., et al. (eds) a *Europaea*, vol. 2., Cambridge University Press, Cambridge, pp 182–183.
- Banuelos GS, Mead R, Wu L, et al** (1992) Differential selenium accumulation among forage plant species grown in soils amended with selenium-enriched plant tissue. *J Soil Water Conserv* 47:338–342.
- Banziger S, Tobler PDN, Brandl H** (2001) The formation of reserve polymers in *Bacillus megaterium*. *Microb Ecol Course* 2–5.
- Barrett-Lennard EG** (2003) The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant Soil* 253:35–54. doi: 10.1023/A:1024574622669
- Barud HS, Ribeiro SJL, Carone CLP, et al** (2013) Optically Transparent Membrane Based on Bacterial Cellulose / Polycaprolactone. *Polimeros* 23:135–138. doi: 10.1590/S0104-14282013005000018
- Báscones Merino E** (2004) Análisis de suelo y consejos de abonado. *Inea* 65.
- Beerling DJ, Berner RA** (2005) Feedbacks and the coevolution of plants and atmospheric CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1302–5. doi: 10.1073/pnas.0408724102
- Behan-Pelletier VM** (2003) *Acari* and *Collembola* biodiversity in Canadian agricultural soils. *Can J Soil Sci* 83:279–288. doi: 10.4141/S01-063
- Bello Gil D, Brandl H** (2007) Selección de Bacterias Productoras de Poli-hidroxibutirato. *Icidca* 2:18.

- Berg G** (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11-18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Bergey DH** (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams&Wilkins 428:787.
- Berlanga Herranz M, Montero MT, Hernández Borrell J, Guerrero Lemus R** (2006) Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *Int Microbiol Off J Spanish Soc Microbiol* ISSN 1139-6709, Vol 9, No 2, 2006, págs 95-102 9:95–102.
- Beuselinck PR, Belesky DP** (1999) *Lotus* Species Used in Reclamation, Renovation, and Revegetation. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 133–143.
- Beuselinck PR, Kirkbride JH** (1999) Systematics and Distribution. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 1–20
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN** (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:199–209. doi: 10.1007/s00253-008-1567-2
- Bhuwal AK, Singh G, Aggarwal NK, et al** (2013) Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *Int J Biomater* 2013:752821. doi: 10.1155/2013/752821
- Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, et al** (2005) Bacterial Cellulose. In: Vandamme EJ, De Baets S, Steinbüchel A (eds) *Biopolymers Online*.
- Binde DR, Menna P, Bangel EV, et al** (2009) rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:897-908. doi: 10.1007/s00253-009-1927-6
- Blumenthal MJ, McGraw RL** (1999) *Lotus* adaptation, use, and management. *Trefoil Sci Technol Lotus*, 97–119.
- Borah B, Thakur PS, Nigam JN** (2002) The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol* 92:776–783. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01590.x
- Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54:1977–82.
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T** (2009) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74:280-286. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.013
- Brenner SE** (1995) Blast, blitz, blocks and beauty; sequence comparison on the net. *Trends Genet* 11:330–331.
- Brewin NJ** (1991) Development of the Legume Root Nodule. *Annu Rev Cell Biol* 7:191–226. doi: 10.1146/annurev.cb.07.110191.001203
- Brewin NJ** (2004) Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*–Legume Symbiosis. *CRC Crit Rev Plant Sci* 23:293–316. doi: 10.1080/07352680490480734

- Brewin NJ, Rae AL, Perotto S, et al** (1994) Bacterial and Plant glycoconjugates at the *Rhizobium*-legume interface. Biochemical Society symposium 60, pp. 61-73.
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X** (2000) Keys to symbiotic harmony. J Bacteriol 182:5641–52. doi: 10.1128/JB.182.20.5641-5652.2000
- Brown RM, Romanovicz DK** (1976) Biogenesis and structure of Golgi-derived cellulosic scales in *Pleurochrysis*. I. Role of the endomembrane system in scale assembly and exocytosis. Appl Polym Symp 28:537–585.
- Brussaard L, Caron P, Campbell B, et al** (2010) Reconciling biodiversity conservation and food security: scientific challenges for a new agriculture. Curr Opin Environ Sustain 2:34–42. doi: 10.1016/j.cosust.2010.03.007
- Buxton DR** (1996) Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. Anim Feed Sci Technol 59:37–49. doi: 10.1016/0377-8401(95)00885-3
- Buzzell RI, Wilsie CP** (1964) Seed Production Potential of Flowering Types in Birdsfoot Trefoil1. Crop Sci 4:436. doi: 10.2135/cropsci1964.0011183X000400040034x
- Calderón-Vázquez C, Alatorre-Cobos F, Simpson-Williamson J, Herrera-Estrella L** (2009) Maize Under Phosphate Limitation. In: Handbook of Maize: Its Biology. Springer New York, New York, NY, pp 381–404
- Campos LP, Raelson JV, Grant WF** (1994) Genome relationships among *Lotus* species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor Appl Genet 88–88:417–422. doi: 10.1007/BF00223654
- Capoen W, Oldroyd G, Goormachtig S, Holsters M** (2010) *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. New Phytol 186:340–345. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03124.x
- Cardona Echavarría AC, Mora Martínez AL, Marín Montoya M** (2013) Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. Rev Fac Nac Agron Medellín 66:7129–7140.
- Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, et al** (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresour Technol 102:7354–7360. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.081
- Carreño Pineda LD, Caicedo Mesa LA, Martínez Riascos CA** (2012) Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. Ing y Cienc 8:307–335.
- Carro L, Martínez-Molina E, Trujillo ME** (2010) *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. Int J Syst Evol Microbiol 60:331-337. doi: 10.1099/ijms.0.012708-0
- Carro L, Riesco R, Spröer C, Trujillo ME** (2016a) *Micromonospora luteifusca* sp. nov. isolated from cultivated *Pisum sativum*. Syst Appl Microbiol 39:237-242. doi: 10.1016/j.syapm.2016.04.003
- Carro L, Riesco R, Spröer C, Trujillo ME** (2016b) *Micromonospora ureilytica* sp. nov., *Micromonospora noduli* sp. nov. and *Micromonospora vinacea* sp. nov., isolated from *Pisum sativum* nodules. Int J Syst Evol Microbiol 66:3509-3514. doi: 10.1099/ijsem.0.001231
- Cassida KA, Griffin TS, Rodriguez J, et al** (2000) Protein Degradability and Forage Quality in Maturing Alfalfa, Red Clover, and Birdsfoot Trefoil. Crop Sci 40:209. doi: 10.2135/cropsci2000.401209x

- Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ** (1999) Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci Soc Am J* 63:1670. doi: 10.2136/sssaj1999.6361670x
- Centeno-Leija S, Huerta-Beristain G, Giles-Gómez M, et al** (2014) Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:687–696. doi: 10.1007/s10482-014-0124-5
- Cerda C** (1996) Deficiencias nutritivas y nodulación en establecimiento de especies forrajeras del género *Lotus*, en suelos arcillosos. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción.
- Cerda E** (2008) Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal.
- Chao Y, Ishida T, Sugano Y, Shoda M** (2000) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnol Bioeng* 68:345–352. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M
- Chavez-Pacheco JL, Martinez-Yee S, Contreras ML, et al** (2005) Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *J Appl Microbiol* 99:1130–1140. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02708.x
- Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS** (2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol Biotechnol* 47:107–124.
- Chen G-Q, Wu Q** (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:6565–6578. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- Chen J** (2006) The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility.
- Cherian BM, Leao AL, de Souza SF, et al** (2011) Cellulose Nanocomposites for High-Performance Applications. In: *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 539–587
- Chun J, Lee J-H, Jung Y, et al** (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259–2261. doi: 10.1099/ijms.0.64915-0
- Colvin JR** (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry. *Acad Press Inc* 543–570.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, et al** (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951–9. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
- Conn KL, Lazarovits G** (2000) Soil factors influencing the efficacy of liquid swine manure added to soil to kill *Verticillium dahliae*. *Can J Plant Pathol* 22:400–406. doi: 10.1080/07060660009500459
- Correa OS, Aranda A, Barneix AJ** (2001) Effects of pH on growth and nodulation of two forage legumes. *J Plant Nutr* 24:1367–1375. doi: 10.1081/PLN-100106987
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP** (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.
- Cronquist A** (1988) The evolution and classification of flowering plants. Edition 2.
- Curl EA, Truelove B** (1986) The Structure and Function of Roots. Springer Berlin Heidelberg, pp 9–54

- Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM** (2006) Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27:145–151. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035
- Da Re S, Le Quéré B, Ghigo J-M, Beloin C** (2007) Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl Environ Microbiol* 73:3391–403. doi: 10.1128/AEM.02625-06
- Davey ME, O’toole GA** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- De Hoff PL, Brill LM, Hirsch AM** (2009) Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* 282:1–15. doi: 10.1007/s00438-009-0460-8
- De la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutiérrez-Martín CB, et al** (2000) Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J Clin Microbiol* 38:1016-22.
- De los Santos GG, Steiner JJ, Beuselinck PR** (2001) Adaptive Ecology of *L.* Genotypes. *Crop Sci* 41:564. doi: 10.2135/cropsci2001.412564x.
- De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A** (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83:1-11. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.002
- De Meyer SE, Van Hoorde K, Vekeman B, et al** (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 43:2384–2396. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.08.005.
- Degtjareva G V., Kramina TE, Sokoloff DD, et al** (2008) New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). *Wulfenia* 15:35–49.
- Dénarié J, Debellé F, Promé J-C** (1996) *Rhizobium* Lipo-Chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503–535. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002443
- Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, et al** (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. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x.
- Díaz P, Borsani O, Monza J** (2005) *Lotus*-related species and their agronomic importance. In: *Lotus japonicus* Handbook. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 25–37.
- Díez-Méndez A, Menéndez E, Celador-Lera L, Rivas R** (2016) Increase of saffron production using a bio-inoculant. *N Biotechnol* 33:422. doi: 10.1016/j.nbt.2015.10.024
- Ding S-Y, Himmel ME** (2006) The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. doi: 10.1021/JF051851Z
- Dobre L-M, Stoica-Guzun A, Stroescu M, et al** (2011) Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. *Chem Pap* 66.
- Donlan RM** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9).
- Downie JA** (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots.
- Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131:900–10. doi: 10.1104/pp.102.018150

- Dubey V, Saxena C, Singh L, et al** (2002) Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Sep Purif Technol* 27:163–171. doi: 10.1016/S1383-5866(01)00210-6
- Egamberdiyeva D** (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl Soil Ecol* 36:184–189. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.02.005
- Ehlke NJ, Vellekson DJ, Lyman BE** (1996) Selection for Biological Nitrogen Fixation and Nitrogen Utilization in Birdsfoot Trefoil. *Crop Sci* 36:104. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600010019x
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR** (1996) Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation Signals. *Cell* 85:673–681. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81234-9
- Epstein E, Bloom AJ** (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. In: 2nd edn.
- Erismán JW, Galloway J, Seitzinger S, et al** (2011) Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. This review comes from a themed issue on Carbon and nitrogen cycles Edited. *Curr Opin Environ Sustain* 3:281-290. doi: 10.1016/j.cosust.2011.08.012
- Escaray FJ, Rosique FJC, Scambato AA, et al** (2010) Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *L Degrad Dev* 21:n/a-n/a. doi: 10.1002/ldr.970
- Fernandes AN, Thomas LH, Altaner CM, et al** (2011) Nano structure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1195-203. doi: 10.1073/pnas.1108942108
- Firbank LG, Petit S, Smart S, et al** (2008) Assessing the impacts of agricultural intensification on biodiversity: a British perspective.
- Fjellstrom RG, Beuselinck PR, Steiner JJ** (2001) RFLP marker analysis supports tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *TAG Theor Appl Genet* 102:718–725. doi: 10.1007/s001220051702
- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, et al** (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:876–882. doi: 10.1002/jpln.201300116
- Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, et al** (2015) Plants Probiotics as a Tool to Produce Highly Functional Fruits: The Case of *Phyllobacterium* and Vitamin C in Strawberries. *PLoS One* 10:e0122281. doi: 10.1371/journal.pone.0122281
- Frick CM, Germida JJ, Farrell RE** (1999) Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. *Tech Semin Chem spills* 105–124.
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, et al** (2011) Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:23–46. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039
- Fterich A, Mahdhi M, Lafuente A, et al** (2012) Taxonomic and symbiotic diversity of bacteria isolated from nodules of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in arid soils of Tunisia. *Can J Microbiol* 58:738-751. doi: 10.1139/w2012-048
- Fu L, Zhang J, Yang G** (2013) Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr Polym* 92:1432–1442. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM** (2006) A feeling for the micro-organism: Structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Bot J Linn Soc* 150:79–88. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00492.x
- Fürnkranz M, Müller H, Berg G** (2009) Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *J Plant Dis Prot* 116:149-155. doi: 10.1007/BF03356303

- Gadelhak GG, El-Tarabily KA, Al-Kaabi FK** (2005) Insect Control Using Chitinolytic Soil Actinomycetes as Bio- control Agents. *Int J Agric Biol* 8530:7-4.
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:280–300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004
- Galibert F, Finan TM, Long SR, et al** (2001) The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293(5530), 668–672.
- Gao C, Yan T, Du J, et al** (2014) Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising  $\epsilon$ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocoll* 36:204–211. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.015
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, et al** (2012) *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS One* 7:e38122. doi: 10.1371/journal.pone.0038122
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG** (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, et al** (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2037–2048. doi: 10.1099/00207713-51-6-2037
- Gauthier P, Lumaret R, Bedecarrats A** (1997) Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *TAG Theor Appl Genet* 95:629–636. doi: 10.1007/s001220050605
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al** (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137:1228–35. doi: 10.1104/pp.105.060871
- Geurts R, Bisseling T** (2002) *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14 Suppl:S239-49. doi: 10.1105/TPC.002451
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42:413–41. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427
- Gillett JB** (1958) *Lotus* in Africa South of the Sahara (Excluding the Cape Verde Islands and Socotra) and Its Distinction from *Dorycnium*. *Kew Bull* 13:361. doi: 10.2307/4118089
- Gordon SA, Weber RP** (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192–5.
- Gossmann JA, Markmann K, Brachmann A, et al** (2012) Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytol* 196:561-573. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04281.x
- Gouda MK, Swellam AE, Omar SH** (2001) Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol Res* 156:201–207. doi: 10.1078/0944-5013-00104
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R** (1989) The murine and *Drosophila homeobox* gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57:367–378. doi: 10.1016/0092-8674(89)90912-4

- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131:872–7. doi: 10.1104/pp.017004
- Grande Cruz CJ, Jaime C** (2015) Desarrollo de Nanocompuestos de Celulosa Bacteriana para Aplicaciones Biomédicas.
- Grant WF** (1995) A chromosome atlas and interspecific – intergenetic index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). *Can J Bot* 73:1787–1809. doi: 10.1139/b95-191
- Grant WF** (2004) List of *Lotus corniculatus* (Birdsfoot trefoil), *L. uliginosus/L. pedunculatus* (Big trefoil), *L. glaber* (Narrowleaf trefoil) and *L. subbiflorus* cultivars. Part 1. Cultivars with known or tentative country of origin. *LOTUS Newsl* 34:12.
- Grant WF, Small E** (1996) The origin of the *Lotus corniculatus* (Fabaceae) complex: a synthesis of diverse evidence. *Can J Bot* 74:975–989. doi: 10.1139/b96-122
- Gresshoff PM, Rolfe BG** (1978) Viability of *Rhizobium* bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts. *Planta* 142:329–333. doi: 10.1007/BF00385085
- Greuter W, Burdet HM, Long G** (1989) Conservatoire et Jardin botanique de la Ville Genève/Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Genève-Berlin.
- Gulash M, Ames P, Larosiliere RC, Bergman K** (1984) Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl Environ Microbiol* 48:149–52.
- Gusain YS, Kamal R, Mehta CM, et al** (2015) Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *J Environ Biol* 36:301-307.
- Haag AF, Arnold MFF, Myka KK, et al** (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis.
- Haimer E, Wendland M, Schluffer K, et al** (2010) Loading of Bacterial Cellulose Aerogels with Bioactive Compounds by Antisolvent Precipitation with Supercritical Carbon Dioxide. *Macromol Symp* 294:64–74. doi: 10.1002/masy.201000008
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW** (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895–914. doi: 10.1139/m97-131
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J. W.** (1999) Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol Biochem* 31:551-560. doi: 10.1016/S0038-0717(98)00146-1
- Han TX, Han LL, Wu LJ, et al** (2008) *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2610-2618. doi: 10.1099/ij.s.0.2008/000125-0
- Hayat R, Ali S, Amara U, et al** (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579-598. doi: 10.1007/s13213-010-0117-1
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, et al** (1994) Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* 105:787–797. doi: 10.1104/PP.105.3.787
- Hind N** (2008) 619. *Lotus maculatus*. *Curtis's Bot Mag* 25:146–157. doi: 10.1111/j.1467-8748.2008.00613.x

- Hirai A, Horii F, Kitamaru R (1987)** Transformation of native cellulose crystals from cellulose Ib to Ia through solid-state chemical reactions. *Macromolecules* 20:1440–1442. doi: 10.1021/ma00172a057
- Hirsch AM, Lum MR, Downie JA (2001)** What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Physiol* 127:1484–92. doi: 10.1104/PP.010866
- Hirsch AM, Valdés M (2010)** *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* 42:536-542. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.023
- Hodgson DA (1989)** Bacterial diversity: the range of interesting things that bacteria do. In: *Genetics of bacterial diversity*. pp 3–22
- Huber GW, Sara Iborra A, Corma A (2006)** Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. doi: 10.1021/CR068360D
- Humphry DR, Andrews M, Santos SR, et al (2007)** Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertiliser on graminaceous crops in Russia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:105–113. doi: 10.1007/s10482-006-9100-z
- Ibáñez F, Angelini J, Taurian T, et al (2009)** Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* 32:49-55. doi: 10.1016/j.syapm.2008.10.001
- Iglesias O, Rivas R, Garcá-a-Fraile P, et al (2007)** Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett* 277:210-216. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00968.x
- Ishihara M, Matsunaga M, Hayashi N, Tišler V (2002)** Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme Microb Technol* 31:986–991. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00215-6
- James EK, Crawford RMM (1998)** Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. *J Exp Bot* 49:599–609. doi: 10.1093/jxb/49.320.599
- Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ (1982)** *Rhizobiurn loti* , a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *Appl Biochem Div* 378–380.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, et al (1997)** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:895–898. doi: 10.1099/00207713-47-3-895
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, et al (1998)** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23:403–405.
- Jeong S Il, Lee SE, Yang H, et al (2010)** Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. *Mol Cell Toxicol* 6:370–377. doi: 10.1007/s13273-010-0049-7
- Jiménez-Gómez A, Menéndez E, Flores-Félix JD, et al (2016)** Effective Colonization of Spinach Root Surface by *Rhizobium*. In: *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing, Cham, pp 109–122
- Jonas R, Farah LF (1998)** Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59:101–106. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3
- Jones DA, Turkington R (1986)** Flora biológica de las islas británicas. *Lotus corniculatus* L. *J Ecol* 74:1185–1212.
- Jones Jr JB (2012)** *Plant nutrition and soil fertility manual.*, Second edi. CRC press

- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, et al** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5:619–633. doi: 10.1038/nrmicro1705
- Joo G-J, Kim Y-M, Lee I-J, et al** (2004) Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnol Lett* 26:487–491. doi: 10.1023/B:BILE.0000019555.87121.34
- Jung JY, Khan T, Park JK, Chang HN** (2007) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean J Chem Eng* 24:265–271. doi: 10.1007/s11814-007-5058-4
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al** (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7:331–8. doi: 10.1093/DNARES/7.6.331
- Kaschuk G, Leffelaar PA, Giller KE, et al** (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses.
- Kathiraser Y, Aroua MK, Ramachandran KB, Tan IKP** (2007) Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *J Chem Technol Biotechnol* 82:847–855. doi: 10.1002/jctb.1751
- Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J** (2006) The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp 163–200
- Keshk SM** (2014) Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *J Bioprocess Biotech*. doi: 10.4172/2155-9821.1000150
- Kiersi ET, Denison RF** (2008) Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 215–236.
- Kijne JW** (1975) The fine structure of pea root nodules. 1. Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol Plant Pathol* 5:75–79. doi: 10.1016/0048-4059(75)90072-7
- Kimura DK** (1980) Likelihood methods for the von. *77:765–776*.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58:169–188. doi: 10.1016/j.mimet.2004.04.006
- Klemm D, Kramer F, Moritz S, et al** (2011) Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew Chemie Int Ed* 50:5438–5466. doi: 10.1002/anie.201001273
- Klemm D, Schumann D, Kramer F, et al** (2006) Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. In: *Polysaccharides II*. Springer Berlin Heidelberg, pp 49–96
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S** (2001) Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26:1561–1603. doi: 10.1016/S0079-6700(01)00021-1
- Kosmas C, Danalatos N., Gerontidis S** (2000) The effect of land parameters on vegetation performance and degree of erosion under Mediterranean conditions. *CATENA* 40:3–17. doi: 10.1016/S0341-8162(99)00061-2
- Kowalska-Ludwicka K, Cala J, Grobelski B, et al** (2013) Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. *Arch Med Sci* 9:527–534. doi: 10.5114/aoms.2013.33433
- Krieg NR, Holt JG** (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1:234–254.

- Kuykendall LD** (1989) Influence of Glycine max nodulation on the persistence in soil of a genetically marked *Bradyrhizobium japonicum* strain. *Plant Soil* 116:275–277. doi: 10.1007/BF02214558
- Laranjo M, Young JPW, Oliveira S** (2012) Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Syst Appl Microbiol* 35:359–367. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.002
- Lassen P** (1986) *Hymenocarpos cornicina*, *Hymenocarpos lotoides*, *Hymenocarpos hamosus*. *Willdenowia* 16:112.
- Le Floch A., Jourdes M., Teissedre P-L.** (2015) Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydr Res* 417:94–102. doi: 10.1016/j.carres.2015.07.003
- Lee K-Y, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A** (2014) More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. *Macromol Biosci* 14:10–32. doi: 10.1002/mabi.201300298
- Lee SY** (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 49:1–14. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P
- León Barrios M, Yépez JP, Hidalgo PM, et al** (2014) Diversidad genética de rizobios que nodulan *Cicer canariense* en el Parque Nacional de La Caldera de Taburiente y su evaluación como biofertilizantes.
- León RJC, Burkart SE, Movia CP** (1979) La vegetación de la República Argentina: Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado. *Acional de Tecnología Agropecuaria. Serie Fotogeográfica*, 17.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, et al** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781–784. doi: 10.1038/344781a0
- Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX** (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40:238–246. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.08.014
- Li L, Sinkko H, Montonen L, et al** (2012) Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol Ecol* 79:46–68. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01198.x
- Lodeiro AR, López-García SL, Vázquez TE., Favelukes G** (2000) Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin.
- Lorite MJ, Donate-Correa J, del Arco-Aguilar M, et al** (2010a) *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Syst Appl Microbiol* 33:282–290. doi: 10.1016/j.syapm.2010.03.006
- Lorite MJ, Flores-Félix JD, Peix Á, et al** (2016) *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Syst Appl Microbiol* 39:557–561. doi: 10.1016/j.syapm.2016.09.003
- Lorite MJ, Muñoz S, Olivares J, et al** (2010) Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:4019–26. doi: 10.1128/AEM.02555-09

- Lorite MJ, Muñoz S, Olivares J, et al** (2010b) Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate lotus spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:4019-26. doi: 10.1128/AEM.02555-09
- Luengo JM, García B, Sandoval, A., Naharro, G., y Olivera, E. R.** (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 251-260.
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Mabberley DJ** (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge university press.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, et al** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1:1–12. doi: 10.1038/ncomms1009
- Malek W** (1992) The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 158:26–28. doi: 10.1007/BF00249061
- Malhotra M, Srivastava S** (2009) Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol* 45:73-80. doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.05.006
- Mandel M, Marmur J** (1968) [109] Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol* 12:195–206. doi: 10.1016/0076-6879(67)12133-2
- Mano H, Morisaki H** (2008) Minireview Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes Env* 23:109–117. doi: 10.1264/jsme2.23.109
- Marcos-García M, Menéndez E, Cruz-González X, et al** (2015) The high diversity of *Lotus corniculatus* endosymbionts in soils of northwest Spain. *Symbiosis* 67:11-20. doi: 10.1007/s13199-015-0368-5
- Marcos-García M, Menéndez E, Ramírez-Bahena MH, et al** (2017) *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Marek-Kozaczuk M, Leszcz A, Wielbo J, et al** (2013) *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3.22 harboring nod genes of the *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* cluster. *Syst Appl Microbiol* 36:252-258. doi: 10.1016/j.syapm.2013.01.005
- Marley CL, Cook R, Barrett J, et al** (2006) The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. *Vet Parasitol* 138:280–290. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.029
- Martínez-Hidalgo P** (2012) Endophytic actinobacteria isolated from nodules of *Medicago sativa*: Analysis of their biodiversity and agronomic potential as PGPR. Tesis Doctoral.
- Martínez-Hidalgo P, Galindo-Villardón P, Igual JM, et al** (2014) *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Sci Rep* 4:6389. doi: 10.1038/srep06389

**Martínez-Hidalgo P, García JM, Pozo MJ** (2015a) Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Front Microbiol* 6:922. doi: 10.3389/fmicb.2015.00922

**Martínez-Hidalgo P, Martínez-Molina E, Mateos PF, et al** (2015b) Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1703-1708. doi: 10.1099/ijso.0.000164

**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. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004

**Mateos PF, Baker DL, Petersen M, et al** (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium* –legume symbiosis. *Can J Microbiol* 47:475–487. doi: 10.1139/w01-039

**Mateos PF, Baker DL, Philip-Hollingsworth S, et al** (1995) Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* 41:202–207. doi: 10.1139/m95-028

**Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, et al** (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 58:1816–22.

**Mateos PF, Rivas R, Robledo M, et al** (2011) The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. In: *Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 167–194

**Mateos PF, Rivas R, Robledo M, et al** (2011) The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. En: *Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 167-194

**Mendoza R, Escudero V, García I** (2005) Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant Soil* 275:305–315. doi: 10.1007/s11104-005-2501-3

**Menendez E, García-Fraile P, Rivas R** (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng* 2:163-182. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.163

**Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, et al** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5230–5. doi: 10.1073/pnas.0600912103

**Miller SH, Elliot RM, Sullivan JT, Ronson CW** (2007) Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Microbiology* 153:3184–3195. doi: 10.1099/mic.0.2007/006924-0

**Miñón DP, Sevilla GH, Montes L, Fernández ON** (1990) *Lotus tenuis*: Leguminosa Forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico n° 98 Unidad Integr. Balcarce* 16.

**Mokhtar R, Mohamed VA, Arbi G** (2006) Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). *South African Journal of Botany*, 73(4), 623-631.

**Moreno JC** (2010) Lista Roja 2008 de la flora vascular española.

- Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, et al** (2014) Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 37:208–215. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.007
- Mousavi SA, Willems A, Nesme X, et al** (2015) Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst Appl Microbiol* 38:84–90. doi: 10.1016/j.syapm.2014.12.003
- Mulcahy DL, Cresti M, Sansavini S, et al** (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Sci Hortic (Amsterdam)* 54:89–96. doi: 10.1016/0304-4238(93)90057-W
- Mulder C, Boit A, Bonkowski M, et al** (2001) A belowground perspective on Dutch agroecosystems: how soil organisms interact to support ecosystem services. In: *Advances in Ecological Research*. pp 277–357
- Murphy PJ, Wexler W, Grzemeski W, et al** (1995) Rhizopines—Their role in symbiosis and competition. *Soil Biol Biochem* 27:525–529. doi: 10.1016/0038-0717(95)98627-Z
- Nakayama A, Kakugo A, Gong JP, et al** (2004) High Mechanical Strength Double-Network Hydrogel with Bacterial Cellulose. *Adv Funct Mater* 14:1124–1128. doi: 10.1002/adfm.200305197
- Neunhäuserer C, Berreck M, Insam H** (2001) Remediation of Soils Contaminated with Molybdenum using Soil Amendments and Phytoremediation. *Water Air Soil Pollut* 128:85–96. doi: 10.1023/A:1010306220173
- Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA** (2008) Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Curr Microbiol* 57:449–453. doi: 10.1007/s00284-008-9228-3
- O’Gara F, Shanmugam KT** (1976) Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N<sub>2</sub> as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 437:313–321. doi: 10.1016/0304-4165(76)90001-5
- Oke V, Long SR** (1999) Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* 2:641–646. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00035-1
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The Rules of Engagement in the Legume–Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119–144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Naranjo-Suárez J, et al** (2005) Population genetic differentiation in taxa of *Lotus* (Fabaceae: *Loteae*) endemic to the Gran Canarian pine forest. *Heredity (Edinb)* 94:199–206. doi: 10.1038/sj.hdy.6800598
- Paau AS, Bloch CB, Brill WJ** (1980) Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 143:1480–90.
- Pajuelo E, Carrasco JA, Romero LC, et al** (2007) Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol) lyase under metal stress. *Plant Biol* 9:672–681.
- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, et al** (2010) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils* 46:807–816. doi: 10.1007/s00374-010-0485-5

- Papadopoulos YA, Kelman WM** (1999) Traditional Breeding of Species. In: Trefoil: The Science and Technology of *Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 187–198
- Parmar HY, Chakraborty H** (2016) Study on siderophore producing bacteria and its applications. *Int J Psychother* 7:9496-9502. doi: 10.1080/13569080050020272
- Patten CL, Glick BR** (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220. doi: 10.1139/m96-032
- Pecetti L, Annicchiarico P, Battini F, Cappelli S** (2009) Adaptation of forage legume species and cultivars under grazing in two extensive livestock systems in Italy. *Eur J Agron* 30:199–204. doi: 10.1016/j.eja.2008.10.001
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ** (2015) Bacterial Associations with Legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci* 34:17-42. doi: 10.1080/07352689.2014.897899
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, et al** (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:847–850. doi: 10.1099/ijs.0.02966-0
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201. doi: 10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000
- Polhill RM** (1981) *Loteae* DC (1825). Advances in legume systematics.
- Priest F, Ramos-Cormenzana A, Tindall BJ** (2012) Bacterial diversity and systematics. Springer Science & Business Media.,
- Proctor M, Yeo P, Lack A** (1996) The Natural History of Pollination. Harper Collins Publishers
- Puppo A, Groten K, Bastian F, et al** (2004) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* 165:683–701. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x
- Qian J, Parker MA** (2002) Contrasting *nifD* and Ribosomal Gene Relationships Among *Mesorhizobium* from *Lotus oroboides* in Northern Mexico. *Syst Appl Microbiol* 25:68-73. doi: 10.1078/0723-2020-00095
- Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ** (1992) Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J* 2:385–395. doi: 10.1111/j.1365-313X.1992.00385.x
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H** (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28:142-149. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002
- Rajwade JM, Paknikar KM, Kumbhar J V.** (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2491–2511. doi: 10.1007/s00253-015-6426-3
- Ramírez-Bahena MH, Hernández M, Peix Á, et al** (2012) Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 35:334-341. doi: 10.1016/j.syapm.2012.05.003
- Real D, Warden J, Sandral GA, et al** (2008) Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Aust J Exp Agric* 48:480. doi: 10.1071/EA07110
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC** (2003) Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol* 87:137-146. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2

- Reeve W, Sullivan J, Ronson C, et al** (2014) Genome sequence of the *Lotus corniculatus* microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R88B.
- Rejili M, Jaballah SALWA, Ferchichi A** (2008) Understanding physiological mechanism of *Lotus creticus* plasticity under abiotic stress and in arid climate: a review. LOTUS Newsl 38,:20–36.
- Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C** (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. Trends Microbiol 24:63-75. doi: 10.1016/j.tim.2015.10.007
- Ren W, Beard RW** (2005) Consensus seeking in multiagent systems under dynamically changing interaction topologies. IEEE Trans Automat Contr 50:655–661. doi: 10.1109/TAC.2005.846556
- Rengasamy P** (2006) World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot 57:1017–23. doi: 10.1093/jxb/erj108
- Rengasamy P, Chittleborough D, Helyar K** (2003) Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. Plant Soil 257:249–260. doi: 10.1023/A:1027326424022
- Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E** (2009) Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiol Insights 2:51.
- Rivas R, Laranjo M, Mateos PF, et al** (2007a) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. Lett Appl Microbiol 44:412-418. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02086.x
- Rivas R, Peix A, Mateos PF, et al** (2007b) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 23–33
- Rivas R, Velázquez E, Palomo J-L, et al** (2002) Rapid Identification of *Clavibacter michiganensis* Subspecies *sepedonicus* Using Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA (TP-RAPD) Fingerprints. Eur J Plant Pathol 108:179–184. doi: 10.1023/A:1015044911913
- Rivas R, Velázquez E, Valverde A, et al** (2001) A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis 22:1086–1089. doi: 10.1002/1522-2683(200106)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, et al** (2003) Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that Nodulates and Fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. Syst Appl Microbiol 26:47–53. doi: 10.1078/072320203322337308
- Robertson JG, Lyttleton P** (1984) Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. Journal of cell science, 69(1), 147-157.
- Robinson PH, Grattan SR, Getachew G, et al** (2004) Biomass accumulation and potential nutritive value of some forages irrigated with saline-sodic drainage water. Anim Feed Sci Technol 111:175–189. doi: 10.1016/S0377-8401(03)00213-X
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, et al** (2011) Development of Functional Symbiotic White Clover Root Hairs and Nodules Requires Tightly Regulated Production of Rhizobial Cellulase CelC2. Mol Plant-Microbe Interact 24:798–807. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0249
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velazquez E, et al** (2008) *Rhizobium cellulase* CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc Natl Acad Sci 105:7064–7069. doi: 10.1073/pnas.0802547105

- Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, et al** (2012) Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* 11:125. doi: 10.1186/1475-2859-11-125
- Robledo EA, Kmiecik K, Oplinger ES, et al** (1998) Trifolixotoxin Production Increases Nodulation Competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under Agricultural Conditions. *Appl Environ Microbiol* 64:2630–3.
- Rodríguez-Riaño T, Olivencia AO, Devesa JA** (1999) *Biología floral en Fabaceae*. Editorial CSIC-CSIC Press
- Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E** (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* 34:96-104. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.015
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E** (2006) Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:827–837. doi: 10.1094/MPMI-19-0827
- Ross P, Mayer R, Benziman M** (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55:35–58.
- Russell M** (2001) Alfalfa. *Am Sci* 89:252. doi: 10.1511/2001.3.252
- Ryu RJ, Patten CL** (2008) Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* 190:7200-8. doi: 10.1128/JB.00804-08
- Saeki K** (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cell Mol Life Sci* 68:1327–1339. doi: 10.1007/s00018-011-0650-5
- Saidi S, Ramirez-Bahena M-H, Santillana N, et al** (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:242-247. doi: 10.1099/ijs.0.052191-0
- Saini R, Kumar V, Dudeja SS, Pathak D V** (2015) Beneficial Effects of Inoculation of Endophytic Bacterial Isolates from Roots and Nodules in Chickpea. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4:207-221.
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–25.
- Saleh-Lakha S, Glick BR** (2006) Plant growth-promoting bacteria. *Mod soil Microbiol* 503–520.
- Sanchez DIH, Pieckenstain FEL, Escaray F, et al** (2011) Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant Cell Environ* 34:605–617. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02266.x
- Sangkharak K, Prasertsan P** (2012) Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol* 58:173–182. doi: 10.2323/jgam.58.173
- Saranya V, Poornimakkani, Krishnakumari MS, et al** (2012) Quantification of Intracellular Polyhydroxyalkanoates by Virtue of Personalized Flow Cytometry Protocol. *Curr Microbiol* 65:589–594. doi: 10.1007/s00284-012-0198-0
- Sasser M** (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.

- Schönian G, Meusel O, Tietz HJ, et al** (2009) Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses* 36:171–179. doi: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00746.x
- Schwyn B, Neilands JB** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA** (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 128(5), 1193-1201.
- Shamala TR, Chandrashekar A, Vijayendra SVN, Kshama L** (2003) Identification of polyhydroxyalkanoate ( PHA ) -producing *Bacillus* spp . using the polymerase chain reaction ( PCR ). 369–374.
- Shaw SL, Dumais J, Long SR** (2000) Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 124:959–70. doi: 10.1104/PP.124.3.959
- Shezad O, Khan S, Khan T, Park JK** (2009) Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. *Korean J Chem Eng* 26:1689–1692. doi: 10.1007/s11814-009-0232-5
- Shoda M, Sugano Y** (2005) Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng* 10:1–8. doi: 10.1007/BF02931175
- Sieberer BJ, Chabaud M, Timmers AC, et al** (2009) A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol* 151:1197–1206.
- Singh RS, Singh RJ, Chung GH, Nelson RL** (2007) Landmark research in legumes. *Genome* 50:525–537. doi: 10.1139/G07-037
- Sleugh B, Moore KJ, George JR, Brummer EC** (2000) Binary Legume–Grass Mixtures Improve Forage Yield, Quality, and Seasonal Distribution. *Agron J* 92:24. doi: 10.2134/agronj2000.92124x
- Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ** (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* 169:4294–301. doi: 10.1128/JB.169.9.4294-4301.1987
- Smith BM, Diaz A, Daniels R, et al** (2009) Regional and Ecotype Traits in *Lotus corniculatus* L., with Reference to Restoration Ecology. *Restor Ecol* 17:12–23. doi: 10.1111/j.1526-100X.2007.00327.x
- Sokoloff DD** (1998) Morphological and taxonomical study of the genus *Anthyllis* and principles of revision of Loteae tribe (Papilionaceae). Tesis Doctoral.
- Solans M, Ruiz OA, Wall LG** (2015) Effect of actinobacteria on *Lotus tenuis* – *Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. *Symbiosis* 65:33–37. doi: 10.1007/s13199-015-0315-5
- Somerville C** (2006) Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53–78. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.022206.160206
- Sotelo M, Irisarri P, Lorite MJ, et al** (2011) Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Appl Soil Ecol* 49:197-207. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.005

- Spaink HP** (2002) Plant–microbe interactions: A receptor in symbiotic dialogue. *Nature* 417:910–911. doi: 10.1038/417910a
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, et al** (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171:73–80. doi: 10.1007/s002030050681
- Sprent JI** (2001) Nodulation in legumes. *Royal Botanic Gardens*. pp. 1-13
- Stackebrandt E, Goebel BM** (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846-849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846
- Steinbüchel A** (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromol Biosci* 1:1–24. doi: 10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B
- Steiner JJ** (1999) Birdsfoot Trefoil Origins and Germplasm Diversity. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 81–96
- Stevenson FJ, Cole MA** (1999) Micronutrients and toxic metals. *Cycles of Soils* 369–418.
- Stoica-Guzun A, Stroescu M, Jipa I, et al** (2012) The Effect of UV-Irradiation on Poly(vinyl alcohol) Composites with Bacterial Cellulose. *Macromol Symp* 315:198–204. doi: 10.1002/masy.201250524
- Stoutjesdijk PA, Sale PW, Larkin PJ, et al** (2001) Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Funct Plant Biol* 28:1063. doi: 10.1071/PP01012
- Stubbe J, Tian J** (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Nat Prod Rep* 20:445. doi: 10.1039/b209687k
- Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, et al** (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci* 92:8985-8989. doi: 10.1073/pnas.92.19.8985
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, et al** (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184:3086-95. doi: 10.1128/JB.184.11.3086-3095.2002
- Surma-Ślusarska B, Presler S, Danielewicz D** (2008) Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from *Acetobacter Xylinum*. *Culture for Application in Papermaking*. *Fibres Text East Eur* 108--111.
- Sutton WD, Paterson AD** (1980) Effects of the plant host on the detergent sensitivity and viability of *Rhizobium* bacteroids. *Planta* 148:287–292. doi: 10.1007/BF00380040
- Taiz L, Taiz E, Zeiger E, et al** (2006) *Fisiología vegetal/Plant physiology*. (No. 581.1). Universitat Jaume I.
- Takahashi K, Murakami T, Kamata A, et al** (1994) Pharmacokinetic Analysis of the Absorption Enhancing Action of Decanoic Acid and Its Derivatives in Rats. *Pharm Res* 11:388-392. doi: 10.1023/A:1018908903475
- Talavera S, Castroviejo S** (1991) *Flora ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares (Vol. 1)*. Editorial CSIC-CSIC Press.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–9. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Teakle NL, Tyerman SD** (2010) Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ* 33:566–589. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02060.x
- Thakore Y** (2006) The biopesticide market for global agricultural use.. *Ind Biotechnol* 2:194–208.
- Thompson J, Gibson TJ, Plewniak F, et al** (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876
- Tikhonovich IA, Provorov NA** (2009) From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration. *Ann Appl Biol* 154:341–350. doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00306.x
- Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, et al** (2010) The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* 4:1265–1281. doi: 10.1038/ismej.2010.55
- Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Fernandez-Molinero C, et al** (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. doi: 10.1099/ijs.0.65192-0
- Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Schumann P, et al** (2006) *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2381–2385. doi: 10.1099/ijs.0.64449-0
- Uzun F, Dönmez HB, Ocak N** (2015) Genetic potential of wild birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) seeds collected from different geographical locations regarding to nutrient composition and nutritive value. *Agrofor Syst* 89:963–972. doi: 10.1007/s10457-015-9828-4
- Valdés M, Pérez N-O, Estrada-de-los Santos P, et al** (2005) Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen †. 71:460–466. doi: 10.1128/AEM.71.1.460
- Valverde A, Fterich A, Mahdhi M, et al** (2010) *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2182–2186. doi: 10.1099/ijs.0.014241-0
- van Berkum P, Eardly BD** (2002) The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 68:1132–6. doi: 10.1128/AEM.68.3.1132-1136.2002
- van Diepeningen AD, de Vos OJ, Korthals GW, van Bruggen AHC** (2006) Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Appl Soil Ecol* 31:120–135. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.03.003
- van Rhijn P, Vanderleyden J** (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124–42.
- van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AA, Kijne JW** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* 64:88–94.
- Vance CP** (1983) *Rhizobium* Infection and Nodulation: A Beneficial Plant Disease. *Annu Rev Microbiol* 37:399–424. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.002151

- Vandamme EJ, De Baets S, Vanbaelen A, et al** (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab* 59:93–99. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00185-7
- Velazquez E, Igual JM, Willems A, et al** (2001) *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1011–1021. doi: 10.1099/00207713-51-3-1011
- Velázquez E, Martínez-Hidalgo P, Carro García, L. A, et al** (2013) Nodular endophytes: an untapped diversity. En: *Beneficial Plant-Microbial Interactions*. pp 214-236
- Verma VC, Singh SK, 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. doi: 10.1002/jobm.201000155
- Vervoorst FB** (1967) La vegetación de la República Argentina. VII. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado, Prov. de Buenos Aires. INTA
- Videira E, Castro P, Sá-Pereira F, et al** (2007) Use of *Lotus/Rhizobium* symbiosis in regeneration of polluted soils. *Lotus Neslett* 37:87–88.
- Vincent JM** (1970) The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. *A Man Pract Study Root-Nodule Bact* 1–13.
- Wang H, Bian L, Zhou P, et al** (2013) Core–sheath structured bacterial cellulose/polypyrrole nanocomposites with excellent conductivity as supercapacitors. *J Mater Chem A* 1:578–584. doi: 10.1039/C2TA00040G
- Wang S, Hao B, Li J, et al** (2014) Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. *BMC Genomics* 15:440. doi: 10.1186/1471-2164-15-440
- Wardle DA** (1995) Impacts of Disturbance on Detritus Food Webs in Agro-Ecosystems of Contrasting Tillage and Weed Management Practices. *Adv Ecol Res* 26:105–185. doi: 10.1016/S0065-2504(08)60065-3
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al** (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463-464. doi: 10.1099/00207713-37-4-463
- Wei B, Yang G, Hong F** (2011) Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. *Carbohydr Polym* 84:533–538. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.017
- Wei GH, Wang ET, Chen WX, et al** (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lepedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2219–2230. doi: 10.1099/00207713-52-6-2219
- Weller DM** (2007) *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology* 97:250-256. doi: 10.1094/PHYTO-97-2-0250
- Wen L, Kallenbach RL, Williams JE, et al** (2002) Performance of steers grazing rhizomatous and nonrhizomatous birdsfoot trefoil in pure stands and in tall fescue mixtures. *J Anim Sci* 80:1970. doi: 10.2527/2002.8071970x
- Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Kubik-Komar A, Skorupska A** (2007) Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. *Can J Microbiol* 53:957–967. doi: 10.1139/W07-053

- Wild A** (2003) Soils, land and food: managing the land during the twenty-first century.
- Williams GH** (1998) L'intérêt des lotiers: un possible renouveau (revue bibliographique). *Fourrages* 116:329–324.
- Wojciechowski MF** (2003) Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. *Adv Legum Syst* 10:5–35.
- Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, et al** (2012) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J Gen Appl Microbiol* 58:397–404. doi: 10.2323/jgam.58.397
- Yanet Ixtaina V, Merced Mujica M** (2010) Seedling vigor response of *Lotus tenuis* populations to contrasting variations of water, light and nutrient availability. *Agrociencia (Montecillo)* 44:31–41.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G** (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* 47:138–145. doi: 10.1016/j.ejsobi.2010.11.001
- Zakhia F** (2004) Diversité des bactéries hotes de légumineuses mediterraneennes en Tunisie et au Liban. PhD thesis, Université de Montpellier, France
- Zemenchik RA, Albrecht KA, Shaver RD** (2002) Improved Nutritive Value of Kura Clover– and Birdsfoot Trefoil–Grass Mixtures Compared with Grass Monocultures. *Agron J* 94:1131. doi: 10.2134/agronj2002.1131

- Abd-Alla MH** (1994) Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Lett Appl Microbiol* 18:294–296. doi: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00873.x
- Abel K, Deschmertzing H, Peterson JI** (1963) Classification of microorganisms by analysis of chemical composition I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J Bacteriol* 85:1039–44.
- Acebes Ginovés JR, Oliva Tejera F** (2007) Current status and uses of the endemic *Lotus* to the Canary Islands. *Lotus Newslett* 37:65–66.
- Acuña HP** (1998) Varietal comparison of three species of genus *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) in soils with aptitude for cropping rice. *Agric. técnica* 58:7–14.
- Ahemad M, Khan MS** (2012) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere* 86:945–950. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.11.013
- Ahemad M, Malik A** (2012) Bioaccumulation of Heavy Metals by Zinc Resistant Bacteria Isolated from Agricultural Soils Irrigated with Wastewater. *Bacteriol. J.* 2:12–21.
- Ahmed A, Hasnain S** (2010) Auxin producing *Bacillus* sp. : auxin quantification and effect on the growth *Solanum tuberosum*. *Pure Appl Chem* 1:813–319.
- Akduman B, Uygun M, Çoban EP, et al** (2013) Reversible Immobilization of Urease by Using Bacterial Cellulose Nanofibers. *Appl Biochem Biotechnol* 171:2285–2294. doi: 10.1007/s12010-013-0541-3.
- Alami Y, Achouak W, Marol C, Heulin T** (2000) Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl Environ Microbiol* 66:3393–8. doi: 10.1128/AEM.66.8.3393-3398.2000.
- Alexander DB, Zuberer DA** (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12:39–45. doi: 10.1007/BF00369386
- Allan GJ, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A, et al** (2004) Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: *Loteae*). *Mol Phylogenet Evol* 32:123–138. doi: 10.1016/j.ympev.2003.11.018
- Allan GJ, Porter JM** (2000) Tribal delimitation and phylogenetic relationships of *Loteae* and *Coronilleae* (Faboideae: Fabaceae) with special reference to *Lotus*: evidence from nuclear ribosomal ITS sequences. *Am J Bot* 87:1871–81.
- Aloni R, Aloni E, Langhans M, Ullrich CI** (2006) Role of Cytokinin and Auxin in Shaping Root Architecture: Regulating Vascular Differentiation, Lateral Root Initiation, Root Apical Dominance and Root Gravitropism. *Ann Bot* 97:883–893. doi: 10.1093/aob/mcl027
- Ammon HPT, Ege W, Oppermann M, et al** (1995) Improvement in the Long-Term Stability of an Amperometric Glucose Sensor System by Introducing a Cellulose Membrane of Bacterial Origin. *Anal Chem* 67:466–471. doi: 10.1021/ac00098a036.
- Ampomah OY, Huss-Danell K** (2011) Genetic diversity of root nodule bacteria nodulating *Lotus corniculatus* and *Anthyllis vulneraria* in Sweden. *Syst Appl Microbiol* 34:267–275. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.006.

- Andrews M, James EK, Cummings SP, et al** (2003) Use of Nitrogen Fixing Bacteria Inoculants as a Substitute for Nitrogen Fertiliser for Dryland Graminaceous Crops: Progress Made, Mechanisms of Action and Future Potential.
- Anjum A, Zuber M, Zia KM, et al** (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int J Biol Macromol* 89:161–174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Arambarri AM** (2000) A Cladistic Analysis of the New World Species of *Lotus* L. (Fabaceae, Loteae). *Cladistics* 16:283–297. doi: 10.1111/j.1096-0031.2000.tb00284.x
- Arora NK, Khare E, Oh JH, et al** (2008) Diverse mechanisms adopted by fluorescent *Pseudomonas* PGC2 during the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:581–585. doi: 10.1007/s11274-007-9505-5.
- Ashrafuzzaman M, Hossen F, Ismail M, et al** (2009) Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth.
- Ausmees N, Jonsson H, Høglund S, et al** (1999) Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiology* 145:1253–1262. doi: 10.1099/13500872-145-5-1253
- Ayres JF, Kelman WM, Blumenthal MJ** (2008) The Sharnae greater *Lotus* (*Lotus uliginosus* Schkuhr) germplasm—potential for low latitude environments. *Lotus Newslett* 38:7–19.
- Badri D V, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM** (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. *Curr Opin Biotechnol* 20:642–650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- Ball P.** (1968) *Dorycnium, Lotus, Tetragonolobus*. In: Tutin V., Heywood N., Burges D., et al. (eds) a *Europaea*, vol. 2., Cambridge University Press, Cambridge, pp 182–183.
- Banuelos GS, Mead R, Wu L, et al** (1992) Differential selenium accumulation among forage plant species grown in soils amended with selenium-enriched plant tissue. *J Soil Water Conserv* 47:338–342.
- Banziger S, Tobler PDN, Brandl H** (2001) The formation of reserve polymers in *Bacillus megaterium*. *Microb Ecol Course* 2–5.
- Barrett-Lennard EG** (2003) The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. *Plant Soil* 253:35–54. doi: 10.1023/A:1024574622669
- Barud HS, Ribeiro SJL, Carone CLP, et al** (2013) Optically Transparent Membrane Based on Bacterial Cellulose / Polycaprolactone. *Polimeros* 23:135–138. doi: 10.1590/S0104-14282013005000018
- Báscones Merino E** (2004) Análisis de suelo y consejos de abonado. *Inea* 65.
- Beerling DJ, Berner RA** (2005) Feedbacks and the coevolution of plants and atmospheric CO<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1302–5. doi: 10.1073/pnas.0408724102
- Behan-Pelletier VM** (2003) *Acari* and *Collembola* biodiversity in Canadian agricultural soils. *Can J Soil Sci* 83:279–288. doi: 10.4141/S01-063
- Bello Gil D, Brandl H** (2007) Selección de Bacterias Productoras de Poli-hidroxibutirato. *Icidca* 2:18.

- Berg G** (2009) Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:11-18. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7
- Bergey DH** (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams&Wilkins 428:787.
- Berlanga Herranz M, Montero MT, Hernández Borrell J, Guerrero Lemus R** (2006) Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *Int Microbiol Off J Spanish Soc Microbiol ISSN 1139-6709*, Vol 9, No 2, 2006, págs 95-102 9:95–102.
- Beuselinck PR, Belesky DP** (1999) *Lotus* Species Used in Reclamation, Renovation, and Revegetation. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 133–143.
- Beuselinck PR, Kirkbride JH** (1999) Systematics and Distribution. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 1–20
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN** (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:199–209. doi: 10.1007/s00253-008-1567-2
- Bhuwal AK, Singh G, Aggarwal NK, et al** (2013) Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *Int J Biomater* 2013:752821. doi: 10.1155/2013/752821
- Bielecki S, Krystynowicz A, Turkiewicz M, et al** (2005) Bacterial Cellulose. In: Vandamme EJ, De Baets S, Steinbüchel A (eds) *Biopolymers Online*.
- Binde DR, Menna P, Bangel EV, et al** (2009) rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:897-908. doi: 10.1007/s00253-009-1927-6
- Blumenthal MJ, McGraw RL** (1999) *Lotus* adaptation, use, and management. *Trefoil Sci Technol Lotus*, 97–119.
- Borah B, Thakur PS, Nigam JN** (2002) The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *J Appl Microbiol* 92:776–783. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01590.x
- Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54:1977–82.
- Braud A, Jézéquel K, Bazot S, Lebeau T** (2009) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* 74:280-286. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.013
- Brenner SE** (1995) Blast, blitz, blocks and beauty; sequence comparison on the net. *Trends Genet* 11:330–331.
- Brewin NJ** (1991) Development of the Legume Root Nodule. *Annu Rev Cell Biol* 7:191–226. doi: 10.1146/annurev.cb.07.110191.001203
- Brewin NJ** (2004) Plant Cell Wall Remodelling in the *Rhizobium*–Legume Symbiosis. *CRC Crit Rev Plant Sci* 23:293–316. doi: 10.1080/07352680490480734

- Brewin NJ, Rae AL, Perotto S, et al** (1994) Bacterial and Plant glycoconjugates at the *Rhizobium*-legume interface. Biochemical Society symposium 60, pp. 61-73.
- Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X** (2000) Keys to symbiotic harmony. J Bacteriol 182:5641–52. doi: 10.1128/JB.182.20.5641-5652.2000
- Brown RM, Romanovicz DK** (1976) Biogenesis and structure of Golgi-derived cellulosic scales in *Pleurochrysis*. I. Role of the endomembrane system in scale assembly and exocytosis. Appl Polym Symp 28:537–585.
- Brussaard L, Caron P, Campbell B, et al** (2010) Reconciling biodiversity conservation and food security: scientific challenges for a new agriculture. Curr Opin Environ Sustain 2:34–42. doi: 10.1016/j.cosust.2010.03.007
- Buxton DR** (1996) Quality-related characteristics of forages as influenced by plant environment and agronomic factors. Anim Feed Sci Technol 59:37–49. doi: 10.1016/0377-8401(95)00885-3
- Buzzell RI, Wilsie CP** (1964) Seed Production Potential of Flowering Types in Birdsfoot Trefoil1. Crop Sci 4:436. doi: 10.2135/cropsci1964.0011183X000400040034x
- Calderón-Vázquez C, Alatorre-Cobos F, Simpson-Williamson J, Herrera-Estrella L** (2009) Maize Under Phosphate Limitation. In: Handbook of Maize: Its Biology. Springer New York, New York, NY, pp 381–404
- Campos LP, Raelson JV, Grant WF** (1994) Genome relationships among *Lotus* species based on random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor Appl Genet 88–88:417–422. doi: 10.1007/BF00223654
- Capoen W, Oldroyd G, Goormachtig S, Holsters M** (2010) *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. New Phytol 186:340–345. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03124.x
- Cardona Echavarría AC, Mora Martínez AL, Marín Montoya M** (2013) Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. Rev Fac Nac Agron Medellín 66:7129–7140.
- Carreira P, Mendes JAS, Trovatti E, et al** (2011) Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. Bioresour Technol 102:7354–7360. doi: 10.1016/j.biortech.2011.04.081
- Carreño Pineda LD, Caicedo Mesa LA, Martínez Riascos CA** (2012) Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. Ing y Cienc 8:307–335.
- Carro L, Martínez-Molina E, Trujillo ME** (2010) *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. Int J Syst Evol Microbiol 60:331-337. doi: 10.1099/ijms.0.012708-0
- Carro L, Riesco R, Spröer C, Trujillo ME** (2016a) *Micromonospora luteifusca* sp. nov. isolated from cultivated *Pisum sativum*. Syst Appl Microbiol 39:237-242. doi: 10.1016/j.syapm.2016.04.003
- Carro L, Riesco R, Spröer C, Trujillo ME** (2016b) *Micromonospora ureilytica* sp. nov., *Micromonospora noduli* sp. nov. and *Micromonospora vinacea* sp. nov., isolated from *Pisum sativum* nodules. Int J Syst Evol Microbiol 66:3509-3514. doi: 10.1099/ijsem.0.001231
- Cassida KA, Griffin TS, Rodriguez J, et al** (2000) Protein Degradability and Forage Quality in Maturing Alfalfa, Red Clover, and Birdsfoot Trefoil. Crop Sci 40:209. doi: 10.2135/cropsci2000.401209x

- Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ** (1999) Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci Soc Am J* 63:1670. doi: 10.2136/sssaj1999.6361670x
- Centeno-Leija S, Huerta-Beristain G, Giles-Gómez M, et al** (2014) Improving poly-3-hydroxybutyrate production in *Escherichia coli* by combining the increase in the NADPH pool and acetyl-CoA availability. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105:687–696. doi: 10.1007/s10482-014-0124-5
- Cerda C** (1996) Deficiencias nutritivas y nodulación en establecimiento de especies forrajeras del género *Lotus*, en suelos arcillosos. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Concepción.
- Cerda E** (2008) Aislamiento de *Micromonospora* de nódulos de leguminosas tropicales y análisis de su interés como promotor del crecimiento vegetal.
- Chao Y, Ishida T, Sugano Y, Shoda M** (2000) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnol Bioeng* 68:345–352. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000505)68:3<345::AID-BIT13>3.0.CO;2-M
- Chavez-Pacheco JL, Martinez-Yee S, Contreras ML, et al** (2005) Partial bioenergetic characterization of *Gluconacetobacter xylinum* cells released from cellulose pellicles by a novel methodology. *J Appl Microbiol* 99:1130–1140. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02708.x
- Chawla PR, Bajaj IB, Survase SA, Singhal RS** (2009) Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol Biotechnol* 47:107–124.
- Chen G-Q, Wu Q** (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26:6565–6578. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- Chen J** (2006) The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility.
- Cherian BM, Leao AL, de Souza SF, et al** (2011) Cellulose Nanocomposites for High-Performance Applications. In: *Cellulose Fibers: Bio- and Nano-Polymer Composites*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 539–587
- Chun J, Lee J-H, Jung Y, et al** (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2259–2261. doi: 10.1099/ijss.0.64915-0
- Colvin JR** (1980) The biosynthesis of cellulose: Plant biochemistry. Acad Press Inc 543–570.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, et al** (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71:4951–9. doi: 10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005
- Conn KL, Lazarovits G** (2000) Soil factors influencing the efficacy of liquid swine manure added to soil to kill *Verticillium dahliae*. *Can J Plant Pathol* 22:400–406. doi: 10.1080/07060660009500459
- Correa OS, Aranda A, Barneix AJ** (2001) Effects of pH on growth and nodulation of two forage legumes. *J Plant Nutr* 24:1367–1375. doi: 10.1081/PLN-100106987
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP** (1999) Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections.
- Cronquist A** (1988) The evolution and classification of flowering plants. Edition 2.
- Curl EA, Truelove B** (1986) The Structure and Function of Roots. Springer Berlin Heidelberg, pp 9–54

- Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM** (2006) Microbial cellulose: the natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27:145–151. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.035
- Da Re S, Le Quéré B, Ghigo J-M, Beloin C** (2007) Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Appl Environ Microbiol* 73:3391–403. doi: 10.1128/AEM.02625-06
- Davey ME, O’toole GA** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847–67. doi: 10.1128/MMBR.64.4.847-867.2000
- De Hoff PL, Brill LM, Hirsch AM** (2009) Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* 282:1–15. doi: 10.1007/s00438-009-0460-8
- De la Puente-Redondo VA, del Blanco NG, Gutiérrez-Martín CB, et al** (2000) Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *J Clin Microbiol* 38:1016-22.
- De los Santos GG, Steiner JJ, Beuselinck PR** (2001) Adaptive Ecology of *L.* Genotypes. *Crop Sci* 41:564. doi: 10.2135/cropsci2001.412564x.
- De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A** (2015) A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 83:1-11. doi: 10.1016/j.soilbio.2015.01.002
- De Meyer SE, Van Hoorde K, Vekeman B, et al** (2011) Genetic diversity of rhizobia associated with indigenous legumes in different regions of Flanders (Belgium). *Soil Biol Biochem* 43:2384–2396. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.08.005.
- Degtjareva G V., Kramina TE, Sokoloff DD, et al** (2008) New data on nrITS phylogeny of *Lotus* (Leguminosae, Loteae). *Wulfenia* 15:35–49.
- Dénarié J, Debellé F, Promé J-C** (1996) *Rhizobium* Lipo-Chitoooligosaccharide Nodulation Factors: Signaling Molecules Mediating Recognition and Morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503–535. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.002443
- Deng ZS, Zhao LF, Kong ZY, et al** (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. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01063.x.
- Díaz P, Borsani O, Monza J** (2005) *Lotus*-related species and their agronomic importance. In: *Lotus japonicus* Handbook. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 25–37.
- Díez-Méndez A, Menéndez E, Celador-Lera L, Rivas R** (2016) Increase of saffron production using a bio-inoculant. *N Biotechnol* 33:422. doi: 10.1016/j.nbt.2015.10.024
- Ding S-Y, Himmel ME** (2006) The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. doi: 10.1021/JF051851Z
- Dobre L-M, Stoica-Guzun A, Stroescu M, et al** (2011) Modelling of sorbic acid diffusion through bacterial cellulose-based antimicrobial films. *Chem Pap* 66.
- Donlan RM** (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9).
- Downie JA** (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots.
- Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131:900–10. doi: 10.1104/pp.102.018150

- Dubey V, Saxena C, Singh L, et al** (2002) Pervaporation of binary water–ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Sep Purif Technol* 27:163–171. doi: 10.1016/S1383-5866(01)00210-6
- Egamberdiyeva D** (2007) The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl Soil Ecol* 36:184–189. doi: 10.1016/j.apsoil.2007.02.005
- Ehlke NJ, Vellekson DJ, Lyman BE** (1996) Selection for Biological Nitrogen Fixation and Nitrogen Utilization in Birdsfoot Trefoil. *Crop Sci* 36:104. doi: 10.2135/cropsci1996.0011183X003600010019x
- Ehrhardt DW, Wais R, Long SR** (1996) Calcium Spiking in Plant Root Hairs Responding to *Rhizobium* Nodulation Signals. *Cell* 85:673–681. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81234-9
- Epstein E, Bloom AJ** (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. In: 2nd edn.
- Erismán JW, Galloway J, Seitzinger S, et al** (2011) Reactive nitrogen in the environment and its effect on climate change. This review comes from a themed issue on Carbon and nitrogen cycles Edited. *Curr Opin Environ Sustain* 3:281-290. doi: 10.1016/j.cosust.2011.08.012
- Escaray FJ, Rosique FJC, Scambato AA, et al** (2010) Evaluation of a technical revegetation action performed on foredunes at Devesa de la Albufera, Valencia, Spain. *L Degrad Dev* 21:n/a-n/a. doi: 10.1002/ldr.970
- Fernandes AN, Thomas LH, Altaner CM, et al** (2011) Nano structure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1195-203. doi: 10.1073/pnas.1108942108
- Firbank LG, Petit S, Smart S, et al** (2008) Assessing the impacts of agricultural intensification on biodiversity: a British perspective.
- Fjellstrom RG, Beuselinck PR, Steiner JJ** (2001) RFLP marker analysis supports tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. *TAG Theor Appl Genet* 102:718–725. doi: 10.1007/s001220051702
- Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivera LP, et al** (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *J Plant Nutr Soil Sci* 176:876–882. doi: 10.1002/jpln.201300116
- Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, et al** (2015) Plants Probiotics as a Tool to Produce Highly Functional Fruits: The Case of *Phyllobacterium* and Vitamin C in Strawberries. *PLoS One* 10:e0122281. doi: 10.1371/journal.pone.0122281
- Frick CM, Germida JJ, Farrell RE** (1999) Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. *Tech Semin Chem spills* 105–124.
- Friesen ML, Porter SS, Stark SC, et al** (2011) Microbially Mediated Plant Functional Traits. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 42:23–46. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-102710-145039
- Fterich A, Mahdhi M, Lafuente A, et al** (2012) Taxonomic and symbiotic diversity of bacteria isolated from nodules of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in arid soils of Tunisia. *Can J Microbiol* 58:738-751. doi: 10.1139/w2012-048
- Fu L, Zhang J, Yang G** (2013) Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydr Polym* 92:1432–1442. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071
- Fujishige NA, Kapadia NN, Hirsch AM** (2006) A feeling for the micro-organism: Structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Bot J Linn Soc* 150:79–88. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00492.x
- Fürnkranz M, Müller H, Berg G** (2009) Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *J Plant Dis Prot* 116:149-155. doi: 10.1007/BF03356303

- Gadelhak GG, El-Tarabily KA, Al-Kaabi FK** (2005) Insect Control Using Chitinolytic Soil Actinomycetes as Bio- control Agents. *Int J Agric Biol* 8530:7-4.
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:280–300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004
- Galibert F, Finan TM, Long SR, et al** (2001) The Composite Genome of the Legume Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293(5530), 668–672.
- Gao C, Yan T, Du J, et al** (2014) Introduction of broad spectrum antibacterial properties to bacterial cellulose nanofibers via immobilising  $\epsilon$ -polylysine nanocoatings. *Food Hydrocoll* 36:204–211. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.09.015
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, et al** (2012) *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS One* 7:e38122. doi: 10.1371/journal.pone.0038122
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG** (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Gaunt MW, Turner SL, Rigottier-Gois L, et al** (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:2037–2048. doi: 10.1099/00207713-51-6-2037
- Gauthier P, Lumaret R, Bedecarrats A** (1997) Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (Fabaceae) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. *TAG Theor Appl Genet* 95:629–636. doi: 10.1007/s001220050605
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, et al** (2005) Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137:1228–35. doi: 10.1104/pp.105.060871
- Geurts R, Bisseling T** (2002) *Rhizobium* nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14 Suppl:S239-49. doi: 10.1105/TPC.002451
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu Rev Genet* 42:413–41. doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091427
- Gillett JB** (1958) *Lotus* in Africa South of the Sahara (Excluding the Cape Verde Islands and Socotra) and Its Distinction from *Dorycnium*. *Kew Bull* 13:361. doi: 10.2307/4118089
- Gordon SA, Weber RP** (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192–5.
- Gossmann JA, Markmann K, Brachmann A, et al** (2012) Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytol* 196:561-573. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04281.x
- Gouda MK, Swellam AE, Omar SH** (2001) Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol Res* 156:201–207. doi: 10.1078/0944-5013-00104
- Graham A, Papalopulu N, Krumlauf R** (1989) The murine and *Drosophila homeobox* gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57:367–378. doi: 10.1016/0092-8674(89)90912-4

- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol* 131:872–7. doi: 10.1104/pp.017004
- Grande Cruz CJ, Jaime C** (2015) Desarrollo de Nanocompuestos de Celulosa Bacteriana para Aplicaciones Biomédicas.
- Grant WF** (1995) A chromosome atlas and interspecific – intergenetic index for *Lotus* and *Tetragonolobus* (Fabaceae). *Can J Bot* 73:1787–1809. doi: 10.1139/b95-191
- Grant WF** (2004) List of *Lotus corniculatus* (Birdsfoot trefoil), *L. uliginosus/L. pedunculatus* (Big trefoil), *L. glaber* (Narrowleaf trefoil) and *L. subbiflorus* cultivars. Part 1. Cultivars with known or tentative country of origin. *LOTUS Newsl* 34:12.
- Grant WF, Small E** (1996) The origin of the *Lotus corniculatus* (Fabaceae) complex: a synthesis of diverse evidence. *Can J Bot* 74:975–989. doi: 10.1139/b96-122
- Gresshoff PM, Rolfe BG** (1978) Viability of *Rhizobium* bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts. *Planta* 142:329–333. doi: 10.1007/BF00385085
- Greuter W, Burdet HM, Long G** (1989) Conservatoire et Jardin botanique de la Ville Genève/Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Genève-Berlin.
- Gulash M, Ames P, Larosiliere RC, Bergman K** (1984) Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl Environ Microbiol* 48:149–52.
- Gusain YS, Kamal R, Mehta CM, et al** (2015) Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. *J Environ Biol* 36:301-307.
- Haag AF, Arnold MFF, Myka KK, et al** (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis.
- Haimer E, Wendland M, Schluffer K, et al** (2010) Loading of Bacterial Cellulose Aerogels with Bioactive Compounds by Antisolvent Precipitation with Supercritical Carbon Dioxide. *Macromol Symp* 294:64–74. doi: 10.1002/masy.201000008
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW** (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 43:895–914. doi: 10.1139/m97-131
- Hallmann, J., Rodríguez-Kábana, R., y Kloepper, J. W.** (1999) Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol Biochem* 31:551-560. doi: 10.1016/S0038-0717(98)00146-1
- Han TX, Han LL, Wu LJ, et al** (2008) *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2610-2618. doi: 10.1099/ij.s.0.2008/000125-0
- Hayat R, Ali S, Amara U, et al** (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Ann Microbiol* 60:579-598. doi: 10.1007/s13213-010-0117-1
- Heidstra R, Geurts R, Franssen H, et al** (1994) Root Hair Deformation Activity of Nodulation Factors and Their Fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol* 105:787–797. doi: 10.1104/PP.105.3.787
- Hind N** (2008) 619. *Lotus maculatus*. *Curtis's Bot Mag* 25:146–157. doi: 10.1111/j.1467-8748.2008.00613.x

- Hirai A, Horii F, Kitamaru R (1987)** Transformation of native cellulose crystals from cellulose Ib to Ia through solid-state chemical reactions. *Macromolecules* 20:1440–1442. doi: 10.1021/ma00172a057
- Hirsch AM, Lum MR, Downie JA (2001)** What makes the rhizobia-legume symbiosis so special. *Plant Physiol* 127:1484–92. doi: 10.1104/PP.010866
- Hirsch AM, Valdés M (2010)** *Micromonospora*: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels. *Soil Biol Biochem* 42:536–542. doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.023
- Hodgson DA (1989)** Bacterial diversity: the range of interesting things that bacteria do. In: *Genetics of bacterial diversity*. pp 3–22
- Huber GW, Sara Iborra A, Corma A (2006)** Synthesis of Transportation Fuels from Biomass: Chemistry, Catalysts, and Engineering. doi: 10.1021/CR068360D
- Humphry DR, Andrews M, Santos SR, et al (2007)** Phylogenetic assignment and mechanism of action of a crop growth promoting *Rhizobium radiobacter* strain used as a biofertiliser on graminaceous crops in Russia. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91:105–113. doi: 10.1007/s10482-006-9100-z
- Ibáñez F, Angelini J, Taurian T, et al (2009)** Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic *Gammaproteobacteria*. *Syst Appl Microbiol* 32:49–55. doi: 10.1016/j.syapm.2008.10.001
- Iglesias O, Rivas R, Garcá-a-Fraile P, et al (2007)** Genetic characterization of fast-growing rhizobia able to nodulate *Prosopis alba* in North Spain. *FEMS Microbiol Lett* 277:210–216. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00968.x
- Ishihara M, Matsunaga M, Hayashi N, Tišler V (2002)** Utilization of d-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme Microb Technol* 31:986–991. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00215-6
- James EK, Crawford RMM (1998)** Effect of oxygen availability on nitrogen fixation by two *Lotus* species under flooded conditions. *J Exp Bot* 49:599–609. doi: 10.1093/jxb/49.320.599
- Jarvis BDW, Pankhurst CE, Patel JJ (1982)** *Rhizobiurn loti* , a New Species of Legume Root Nodule Bacteria. *Appl Biochem Div* 378–380.
- Jarvis BDW, Van Berkum P, Chen WX, et al (1997)** Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47:895–898. doi: 10.1099/00207713-47-3-895
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, et al (1998)** Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23:403–405.
- Jeong S Il, Lee SE, Yang H, et al (2010)** Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals. *Mol Cell Toxicol* 6:370–377. doi: 10.1007/s13273-010-0049-7
- Jiménez-Gómez A, Menéndez E, Flores-Félix JD, et al (2016)** Effective Colonization of Spinach Root Surface by *Rhizobium*. In: *Biological Nitrogen Fixation and Beneficial Plant-Microbe Interaction*. Springer International Publishing, Cham, pp 109–122
- Jonas R, Farah LF (1998)** Production and application of microbial cellulose. *Polym Degrad Stab* 59:101–106. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00197-3
- Jones DA, Turkington R (1986)** Flora biológica de las islas británicas. *Lotus corniculatus* L. *J Ecol* 74:1185–1212.
- Jones Jr JB (2012)** *Plant nutrition and soil fertility manual.*, Second edi. CRC press

- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, et al** (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium–Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5:619–633. doi: 10.1038/nrmicro1705
- Joo G-J, Kim Y-M, Lee I-J, et al** (2004) Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. *Biotechnol Lett* 26:487–491. doi: 10.1023/B:BILE.0000019555.87121.34
- Jung JY, Khan T, Park JK, Chang HN** (2007) Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using a novel bioreactor equipped with a spin filter. *Korean J Chem Eng* 24:265–271. doi: 10.1007/s11814-007-5058-4
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, et al** (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7:331–8. doi: 10.1093/DNARES/7.6.331
- Kaschuk G, Leffelaar PA, Giller KE, et al** (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses.
- Kathiraser Y, Aroua MK, Ramachandran KB, Tan IKP** (2007) Chemical characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHAs) recovered by enzymatic treatment and ultrafiltration. *J Chem Technol Biotechnol* 82:847–855. doi: 10.1002/jctb.1751
- Kerstens K, Lisdiyanti P, Komagata K, Swings J** (2006) The Family *Acetobacteraceae*: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp 163–200
- Keshk SM** (2014) Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. *J Bioprocess Biotech*. doi: 10.4172/2155-9821.1000150
- Kiersi ET, Denison RF** (2008) Sanctions, cooperation, and the stability of plant-rhizosphere mutualisms. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 215–236.
- Kijne JW** (1975) The fine structure of pea root nodules. 1. Vacuolar changes after endocytotic host cell infection by *Rhizobium leguminosarum*. *Physiol Plant Pathol* 5:75–79. doi: 10.1016/0048-4059(75)90072-7
- Kimura DK** (1980) Likelihood methods for the von. *77:765–776*.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al** (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* 58:169–188. doi: 10.1016/j.mimet.2004.04.006
- Klemm D, Kramer F, Moritz S, et al** (2011) Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angew Chemie Int Ed* 50:5438–5466. doi: 10.1002/anie.201001273
- Klemm D, Schumann D, Kramer F, et al** (2006) Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. In: *Polysaccharides II*. Springer Berlin Heidelberg, pp 49–96
- Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S** (2001) Bacterial synthesized cellulose artificial blood vessels for microsurgery. *Prog Polym Sci* 26:1561–1603. doi: 10.1016/S0079-6700(01)00021-1
- Kosmas C, Danalatos N., Gerontidis S** (2000) The effect of land parameters on vegetation performance and degree of erosion under Mediterranean conditions. *CATENA* 40:3–17. doi: 10.1016/S0341-8162(99)00061-2
- Kowalska-Ludwicka K, Cala J, Grobelski B, et al** (2013) Modified bacterial cellulose tubes for regeneration of damaged peripheral nerves. *Arch Med Sci* 9:527–534. doi: 10.5114/aoms.2013.33433
- Krieg NR, Holt JG** (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1:234–254.

- Kuykendall LD** (1989) Influence of Glycine max nodulation on the persistence in soil of a genetically marked *Bradyrhizobium japonicum* strain. *Plant Soil* 116:275–277. doi: 10.1007/BF02214558
- Laranjo M, Young JPW, Oliveira S** (2012) Multilocus sequence analysis reveals multiple symbiovars within *Mesorhizobium* species. *Syst Appl Microbiol* 35:359–367. doi: 10.1016/j.syapm.2012.06.002
- Lassen P** (1986) *Hymenocarpos cornicina*, *Hymenocarpos lotoides*, *Hymenocarpos hamosus*. *Willdenowia* 16:112.
- Le Floch A., Jourdes M., Teissedre P-L.** (2015) Polysaccharides and lignin from oak wood used in cooperage: Composition, interest, assays: A review. *Carbohydr Res* 417:94–102. doi: 10.1016/j.carres.2015.07.003
- Lee K-Y, Buldum G, Mantalaris A, Bismarck A** (2014) More Than Meets the Eye in Bacterial Cellulose: Biosynthesis, Bioprocessing, and Applications in Advanced Fiber Composites. *Macromol Biosci* 14:10–32. doi: 10.1002/mabi.201300298
- Lee SY** (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol Bioeng* 49:1–14. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P
- León Barrios M, Yépez JP, Hidalgo PM, et al** (2014) Diversidad genética de rizobios que nodulan *Cicer canariense* en el Parque Nacional de La Caldera de Taburiente y su evaluación como biofertilizantes.
- León RJC, Burkart SE, Movia CP** (1979) La vegetación de la República Argentina: Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado. *Revista de Tecnología Agropecuaria. Serie Fotogeográfica*, 17.
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, et al** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344:781–784. doi: 10.1038/344781a0
- Li JH, Wang ET, Chen WF, Chen WX** (2008) Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40:238–246. doi: 10.1016/j.soilbio.2007.08.014
- Li L, Sinkko H, Montonen L, et al** (2012) Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China. *FEMS Microbiol Ecol* 79:46–68. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01198.x
- Lodeiro AR, López-García SL, Vázquez TE., Favelukes G** (2000) Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin.
- Lorite MJ, Donate-Correa J, del Arco-Aguilar M, et al** (2010a) *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Syst Appl Microbiol* 33:282–290. doi: 10.1016/j.syapm.2010.03.006
- Lorite MJ, Flores-Félix JD, Peix Á, et al** (2016) *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Syst Appl Microbiol* 39:557–561. doi: 10.1016/j.syapm.2016.09.003
- Lorite MJ, Muñoz S, Olivares J, et al** (2010) Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:4019–26. doi: 10.1128/AEM.02555-09

- Lorite MJ, Muñoz S, Olivares J, et al** (2010b) Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate lotus spp. in saline soils of Granada, Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:4019-26. doi: 10.1128/AEM.02555-09
- Luengo JM, García B, Sandoval, A., Naharro, G., y Olivera, E. R.** (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in microbiology*, 6(3), 251-260.
- Lugtenberg B, Kamilova F** (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annu Rev Microbiol* 63:541–556. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162918
- Mabberley DJ** (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge university press.
- Madsen LH, Tirichine L, Jurkiewicz A, et al** (2010) The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat Commun* 1:1–12. doi: 10.1038/ncomms1009
- Malek W** (1992) The role of motility in the efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Arch Microbiol* 158:26–28. doi: 10.1007/BF00249061
- Malhotra M, Srivastava S** (2009) Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *Eur J Soil Biol* 45:73-80. doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.05.006
- Mandel M, Marmur J** (1968) [109] Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Methods Enzymol* 12:195–206. doi: 10.1016/0076-6879(67)12133-2
- Mano H, Morisaki H** (2008) Minireview Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Microbes Env* 23:109–117. doi: 10.1264/jsme2.23.109
- Marcos-García M, Menéndez E, Cruz-González X, et al** (2015) The high diversity of *Lotus corniculatus* endosymbionts in soils of northwest Spain. *Symbiosis* 67:11-20. doi: 10.1007/s13199-015-0368-5
- Marcos-García M, Menéndez E, Ramírez-Bahena MH, et al** (2017) *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Marek-Kozaczuk M, Leszcz A, Wielbo J, et al** (2013) *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3.22 harboring nod genes of the *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* cluster. *Syst Appl Microbiol* 36:252-258. doi: 10.1016/j.syapm.2013.01.005
- Marley CL, Cook R, Barrett J, et al** (2006) The effects of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cichorium intybus*) when compared with perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on ovine gastrointestinal parasite development, survival and migration. *Vet Parasitol* 138:280–290. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.01.029
- Martínez-Hidalgo P** (2012) Endophytic actinobacteria isolated from nodules of *Medicago sativa*: Analysis of their biodiversity and agronomic potential as PGPR. Tesis Doctoral.
- Martínez-Hidalgo P, Galindo-Villardón P, Igual JM, et al** (2014) *Micromonospora* from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Sci Rep* 4:6389. doi: 10.1038/srep06389

**Martínez-Hidalgo P, García JM, Pozo MJ** (2015a) Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Micromonospora* strains isolated from root nodules. *Front Microbiol* 6:922. doi: 10.3389/fmicb.2015.00922

**Martínez-Hidalgo P, Martínez-Molina E, Mateos PF, et al** (2015b) Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471T as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. and ATCC 33669T as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1703-1708. doi: 10.1099/ijso.0.000164

**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. doi: 10.1016/j.tim.2009.07.004

**Mateos PF, Baker DL, Petersen M, et al** (2001) Erosion of root epidermal cell walls by *Rhizobium* polysaccharide-degrading enzymes as related to primary host infection in the *Rhizobium* –legume symbiosis. *Can J Microbiol* 47:475–487. doi: 10.1139/w01-039

**Mateos PF, Baker DL, Philip-Hollingsworth S, et al** (1995) Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* attached to the root epidermis of white clover. *Can J Microbiol* 41:202–207. doi: 10.1139/m95-028

**Mateos PF, Jimenez-Zurdo JI, Chen J, et al** (1992) Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl Environ Microbiol* 58:1816–22.

**Mateos PF, Rivas R, Robledo M, et al** (2011) The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. In: *Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 167–194

**Mateos PF, Rivas R, Robledo M, et al** (2011) The Path of Rhizobia: From a Free-living Soil Bacterium to Root Nodulation. En: *Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp 167-194

**Mendoza R, Escudero V, García I** (2005) Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. *Plant Soil* 275:305–315. doi: 10.1007/s11104-005-2501-3

**Menendez E, García-Fraile P, Rivas R** (2015) Biotechnological applications of bacterial cellulases. *AIMS Bioeng* 2:163-182. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.163

**Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, et al** (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5230–5. doi: 10.1073/pnas.0600912103

**Miller SH, Elliot RM, Sullivan JT, Ronson CW** (2007) Host-specific regulation of symbiotic nitrogen fixation in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Microbiology* 153:3184–3195. doi: 10.1099/mic.0.2007/006924-0

**Miñón DP, Sevilla GH, Montes L, Fernández ON** (1990) *Lotus tenuis*: Leguminosa Forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico n° 98 Unidad Integr. Balcarce* 16.

**Mokhtar R, Mohamed VA, Arbi G** (2006) Effect of NaCl on the growth and the ionic balance K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> of two populations of *Lotus creticus* (L.) (Papilionaceae). *South African Journal of Botany*, 73(4), 623-631.

**Moreno JC** (2010) Lista Roja 2008 de la flora vascular española.

- Mousavi SA, Österman J, Wahlberg N, et al** (2014) Phylogeny of the *Rhizobium*–*Allorhizobium*–*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 37:208–215. doi: 10.1016/j.syapm.2013.12.007
- Mousavi SA, Willems A, Nesme X, et al** (2015) Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Syst Appl Microbiol* 38:84–90. doi: 10.1016/j.syapm.2014.12.003
- Mulcahy DL, Cresti M, Sansavini S, et al** (1993) The use of random amplified polymorphic DNAs to fingerprint apple genotypes. *Sci Hortic (Amsterdam)* 54:89–96. doi: 10.1016/0304-4238(93)90057-W
- Mulder C, Boit A, Bonkowski M, et al** (2001) A belowground perspective on Dutch agroecosystems: how soil organisms interact to support ecosystem services. In: *Advances in Ecological Research*. pp 277–357
- Murphy PJ, Wexler W, Grzemeski W, et al** (1995) Rhizopines—Their role in symbiosis and competition. *Soil Biol Biochem* 27:525–529. doi: 10.1016/0038-0717(95)98627-Z
- Nakayama A, Kakugo A, Gong JP, et al** (2004) High Mechanical Strength Double-Network Hydrogel with Bacterial Cellulose. *Adv Funct Mater* 14:1124–1128. doi: 10.1002/adfm.200305197
- Neunhäuserer C, Berreck M, Insam H** (2001) Remediation of Soils Contaminated with Molybdenum using Soil Amendments and Phytoremediation. *Water Air Soil Pollut* 128:85–96. doi: 10.1023/A:1010306220173
- Nguyen VT, Flanagan B, Gidley MJ, Dykes GA** (2008) Characterization of Cellulose Production by a *Gluconacetobacter xylinus* strain from Kombucha. *Curr Microbiol* 57:449–453. doi: 10.1007/s00284-008-9228-3
- O’Gara F, Shanmugam KT** (1976) Regulation of nitrogen fixation by Rhizobia export of fixed N<sub>2</sub> as NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 437:313–321. doi: 10.1016/0304-4165(76)90001-5
- Oke V, Long SR** (1999) Bacteroid formation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Curr Opin Microbiol* 2:641–646. doi: 10.1016/S1369-5274(99)00035-1
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating Nodule Morphogenesis with Rhizobial Infection in Legumes. *Annu Rev Plant Biol* 59:519–546. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092839
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The Rules of Engagement in the Legume–Rhizobial Symbiosis. *Annu Rev Genet* 45:119–144. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132549
- Oliva-Tejera F, Caujapé-Castells J, Naranjo-Suárez J, et al** (2005) Population genetic differentiation in taxa of *Lotus* (Fabaceae: *Loteae*) endemic to the Gran Canarian pine forest. *Heredity (Edinb)* 94:199–206. doi: 10.1038/sj.hdy.6800598
- Paau AS, Bloch CB, Brill WJ** (1980) Developmental fate of *Rhizobium meliloti* bacteroids in alfalfa nodules. *J Bacteriol* 143:1480–90.
- Pajuelo E, Carrasco JA, Romero LC, et al** (2007) Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine (thiol) lyase under metal stress. *Plant Biol* 9:672–681.
- Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, et al** (2010) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils* 46:807–816. doi: 10.1007/s00374-010-0485-5

- Papadopoulos YA, Kelman WM** (1999) Traditional Breeding of Species. In: Trefoil: The Science and Technology of *Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 187–198
- Parmar HY, Chakraborty H** (2016) Study on siderophore producing bacteria and its applications. *Int J Psychother* 7:9496-9502. doi: 10.1080/13569080050020272
- Patten CL, Glick BR** (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol* 42:207–220. doi: 10.1139/m96-032
- Pecetti L, Annicchiarico P, Battini F, Cappelli S** (2009) Adaptation of forage legume species and cultivars under grazing in two extensive livestock systems in Italy. *Eur J Agron* 30:199–204. doi: 10.1016/j.eja.2008.10.001
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E, Bedmar EJ** (2015) Bacterial Associations with Legumes. *CRC Crit Rev Plant Sci* 34:17-42. doi: 10.1080/07352689.2014.897899
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, et al** (2004) *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:847–850. doi: 10.1099/ijs.0.02966-0
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:180–201. doi: 10.1128/MMBR.64.1.180-201.2000
- Polhill RM** (1981) *Loteae* DC (1825). *Advances in legume systematics*.
- Priest F, Ramos-Cormenzana A, Tindall BJ** (2012) *Bacterial diversity and systematics*. Springer Science & Business Media.,
- Proctor M, Yeo P, Lack A** (1996) *The Natural History of Pollination*. Harper Collins Publishers
- Puppo A, Groten K, Bastian F, et al** (2004) Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytol* 165:683–701. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01285.x
- Qian J, Parker MA** (2002) Contrasting *nifD* and Ribosomal Gene Relationships Among *Mesorhizobium* from *Lotus oroboides* in Northern Mexico. *Syst Appl Microbiol* 25:68-73. doi: 10.1078/0723-2020-00095
- Rae AL, Bonfante-Fasolo P, Brewin NJ** (1992) Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *Plant J* 2:385–395. doi: 10.1111/j.1365-313X.1992.00385.x
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H** (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol* 28:142-149. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.12.002
- Rajwade JM, Paknikar KM, Kumbhar J V.** (2015) Applications of bacterial cellulose and its composites in biomedicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2491–2511. doi: 10.1007/s00253-015-6426-3
- Ramírez-Bahena MH, Hernández M, Peix Á, et al** (2012) Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 35:334-341. doi: 10.1016/j.syapm.2012.05.003
- Real D, Warden J, Sandral GA, et al** (2008) Waterlogging tolerance and recovery of 10 *Lotus* species. *Aust J Exp Agric* 48:480. doi: 10.1071/EA07110
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC** (2003) Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresour Technol* 87:137-146. doi: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2

- Reeve W, Sullivan J, Ronson C, et al** (2014) Genome sequence of the *Lotus corniculatus* microsymbiont *Mesorhizobium loti* strain R88B.
- Rejili M, Jaballah SALWA, Ferchichi A** (2008) Understanding physiological mechanism of *Lotus creticus* plasticity under abiotic stress and in arid climate: a review. LOTUS Newsl 38,:20–36.
- Remigi P, Zhu J, Young JPW, Masson-Boivin C** (2016) Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. Trends Microbiol 24:63-75. doi: 10.1016/j.tim.2015.10.007
- Ren W, Beard RW** (2005) Consensus seeking in multiagent systems under dynamically changing interaction topologies. IEEE Trans Automat Contr 50:655–661. doi: 10.1109/TAC.2005.846556
- Rengasamy P** (2006) World salinization with emphasis on Australia. J Exp Bot 57:1017–23. doi: 10.1093/jxb/erj108
- Rengasamy P, Chittleborough D, Helyar K** (2003) Root-zone constraints and plant-based solutions for dryland salinity. Plant Soil 257:249–260. doi: 10.1023/A:1027326424022
- Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E** (2009) Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Microbiol Insights 2:51.
- Rivas R, Laranjo M, Mateos PF, et al** (2007a) Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (*ciceri*) capable of nodulating *Cicer arietinum*. Lett Appl Microbiol 44:412-418. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02086.x
- Rivas R, Peix A, Mateos PF, et al** (2007b) Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 23–33
- Rivas R, Velázquez E, Palomo J-L, et al** (2002) Rapid Identification of *Clavibacter michiganensis* Subspecies *sepedonicus* Using Two Primers Random Amplified Polymorphic DNA (TP-RAPD) Fingerprints. Eur J Plant Pathol 108:179–184. doi: 10.1023/A:1015044911913
- Rivas R, Velázquez E, Valverde A, et al** (2001) A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. Electrophoresis 22:1086–1089. doi: 10.1002/1522-2683(200106)22:6<1086::AID-ELPS1086>3.0.CO;2-6
- Rivas R, Willems A, Subba-Rao NS, et al** (2003) Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that Nodulates and Fixes Nitrogen in Symbiosis with *Neptunia natans*, an Aquatic Legume from India. Syst Appl Microbiol 26:47–53. doi: 10.1078/072320203322337308
- Robertson JG, Lyttleton P** (1984) Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover. Journal of cell science, 69(1), 147-157.
- Robinson PH, Grattan SR, Getachew G, et al** (2004) Biomass accumulation and potential nutritive value of some forages irrigated with saline-sodic drainage water. Anim Feed Sci Technol 111:175–189. doi: 10.1016/S0377-8401(03)00213-X
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, et al** (2011) Development of Functional Symbiotic White Clover Root Hairs and Nodules Requires Tightly Regulated Production of Rhizobial Cellulase CelC2. Mol Plant-Microbe Interact 24:798–807. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0249
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velazquez E, et al** (2008) *Rhizobium cellulase* CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc Natl Acad Sci 105:7064–7069. doi: 10.1073/pnas.0802547105

- Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, et al** (2012) Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* 11:125. doi: 10.1186/1475-2859-11-125
- Robledo EA, Kmiecik K, Oplinger ES, et al** (1998) Trifolixotoxin Production Increases Nodulation Competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under Agricultural Conditions. *Appl Environ Microbiol* 64:2630–3.
- Rodríguez-Riaño T, Olivencia AO, Devesa JA** (1999) *Biología floral en Fabaceae*. Editorial CSIC-CSIC Press
- Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez Romero E** (2011) Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst Appl Microbiol* 34:96–104. doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.015
- Rosenblueth M, Martínez-Romero E** (2006) Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:827–837. doi: 10.1094/MPMI-19-0827
- Ross P, Mayer R, Benziman M** (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55:35–58.
- Russell M** (2001) Alfalfa. *Am Sci* 89:252. doi: 10.1511/2001.3.252
- Ryu RJ, Patten CL** (2008) Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *J Bacteriol* 190:7200–8. doi: 10.1128/JB.00804-08
- Saeki K** (2011) Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cell Mol Life Sci* 68:1327–1339. doi: 10.1007/s00018-011-0650-5
- Saidi S, Ramirez-Bahena M-H, Santillana N, et al** (2014) *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:242–247. doi: 10.1099/ijs.0.052191-0
- Saini R, Kumar V, Dudeja SS, Pathak D V** (2015) Beneficial Effects of Inoculation of Endophytic Bacterial Isolates from Roots and Nodules in Chickpea. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 4:207–221.
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–25.
- Saleh-Lakha S, Glick BR** (2006) Plant growth-promoting bacteria. *Mod soil Microbiol* 503–520.
- Sanchez DIH, Pieckenstain FEL, Escaray F, et al** (2011) Comparative ionomics and metabolomics in extremophile and glycophytic *Lotus* species under salt stress challenge the metabolic pre-adaptation hypothesis. *Plant Cell Environ* 34:605–617. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02266.x
- Sangkharak K, Prasertsan P** (2012) Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol* 58:173–182. doi: 10.2323/jgam.58.173
- Saranya V, Poornimakkani, Krishnakumari MS, et al** (2012) Quantification of Intracellular Polyhydroxyalkanoates by Virtue of Personalized Flow Cytometry Protocol. *Curr Microbiol* 65:589–594. doi: 10.1007/s00284-012-0198-0
- Sasser M** (1990) Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.

- Schönian G, Meusel O, Tietz HJ, et al** (2009) Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction. *Mycoses* 36:171–179. doi: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00746.x
- Schwyn B, Neilands JB** (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* 160:47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Senior PJ, Beech GA, Ritchie GAF, Dawes EA** (1972) The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 128(5), 1193–1201.
- Shamala TR, Chandrashekar A, Vijayendra SVN, Kshama L** (2003) Identification of polyhydroxyalkanoate ( PHA ) -producing *Bacillus* spp . using the polymerase chain reaction ( PCR ). 369–374.
- Shaw SL, Dumais J, Long SR** (2000) Cell surface expansion in polarly growing root hairs of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 124:959–70. doi: 10.1104/PP.124.3.959
- Shezad O, Khan S, Khan T, Park JK** (2009) Production of bacterial cellulose in static conditions by a simple fed-batch cultivation strategy. *Korean J Chem Eng* 26:1689–1692. doi: 10.1007/s11814-009-0232-5
- Shoda M, Sugano Y** (2005) Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng* 10:1–8. doi: 10.1007/BF02931175
- Sieberer BJ, Chabaud M, Timmers AC, et al** (2009) A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors. *Plant Physiol* 151:1197–1206.
- Singh RS, Singh RJ, Chung GH, Nelson RL** (2007) Landmark research in legumes. *Genome* 50:525–537. doi: 10.1139/G07-037
- Sleugh B, Moore KJ, George JR, Brummer EC** (2000) Binary Legume–Grass Mixtures Improve Forage Yield, Quality, and Seasonal Distribution. *Agron J* 92:24. doi: 10.2134/agronj2000.92124x
- Smit G, Kijne JW, Lugtenberg BJ** (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. *J Bacteriol* 169:4294–301. doi: 10.1128/JB.169.9.4294-4301.1987
- Smith BM, Diaz A, Daniels R, et al** (2009) Regional and Ecotype Traits in *Lotus corniculatus* L., with Reference to Restoration Ecology. *Restor Ecol* 17:12–23. doi: 10.1111/j.1526-100X.2007.00327.x
- Sokoloff DD** (1998) Morphological and taxonomical study of the genus *Anthyllis* and principles of revision of Loteae tribe (Papilionaceae). Tesis Doctoral.
- Solans M, Ruiz OA, Wall LG** (2015) Effect of actinobacteria on *Lotus tenuis* – *Mesorhizobium loti* symbiosis: preliminary study. *Symbiosis* 65:33–37. doi: 10.1007/s13199-015-0315-5
- Somerville C** (2006) Cellulose Synthesis in Higher Plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:53–78. doi: 10.1146/annurev.cellbio.22.022206.160206
- Sotelo M, Irisarri P, Lorite MJ, et al** (2011) Diversity of rhizobia nodulating *Lotus corniculatus* grown in northern and southern regions of Uruguay. *Appl Soil Ecol* 49:197–207. doi: 10.1016/j.apsoil.2011.05.005

- Spaink HP** (2002) Plant–microbe interactions: A receptor in symbiotic dialogue. *Nature* 417:910–911. doi: 10.1038/417910a
- Spiekermann P, Rehm BHA, Kalscheuer R, et al** (1999) A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Arch Microbiol* 171:73–80. doi: 10.1007/s002030050681
- Sprent JI** (2001) Nodulation in legumes. *Royal Botanic Gardens*. pp. 1-13
- Stackebrandt E, Goebel BM** (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 44:846-849. doi: 10.1099/00207713-44-4-846
- Steinbüchel A** (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromol Biosci* 1:1–24. doi: 10.1002/1616-5195(200101)1:1<1::AID-MABI1>3.0.CO;2-B
- Steiner JJ** (1999) Birdsfoot Trefoil Origins and Germplasm Diversity. In: *Trefoil: The Science and Technology of Lotus*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, pp 81–96
- Stevenson FJ, Cole MA** (1999) Micronutrients and toxic metals. *Cycles of Soils* 369–418.
- Stoica-Guzun A, Stroescu M, Jipa I, et al** (2012) The Effect of UV-Irradiation on Poly(vinyl alcohol) Composites with Bacterial Cellulose. *Macromol Symp* 315:198–204. doi: 10.1002/masy.201250524
- Stoutjesdijk PA, Sale PW, Larkin PJ, et al** (2001) Possible involvement of condensed tannins in aluminium tolerance of *Lotus pedunculatus*. *Funct Plant Biol* 28:1063. doi: 10.1071/PP01012
- Stubbe J, Tian J** (2003) Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Nat Prod Rep* 20:445. doi: 10.1039/b209687k
- Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, et al** (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci* 92:8985-8989. doi: 10.1073/pnas.92.19.8985
- Sullivan JT, Trzebiatowski JR, Cruickshank RW, et al** (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* 184:3086-95. doi: 10.1128/JB.184.11.3086-3095.2002
- Surma-Ślusarska B, Presler S, Danielewicz D** (2008) Characteristics of Bacterial Cellulose Obtained from *Acetobacter Xylinum*. *Culture for Application in Papermaking*. *Fibres Text East Eur* 108--111.
- Sutton WD, Paterson AD** (1980) Effects of the plant host on the detergent sensitivity and viability of *Rhizobium* bacteroids. *Planta* 148:287–292. doi: 10.1007/BF00380040
- Taiz L, Taiz E, Zeiger E, et al** (2006) *Fisiología vegetal/Plant physiology*. (No. 581.1). Universitat Jaume I.
- Takahashi K, Murakami T, Kamata A, et al** (1994) Pharmacokinetic Analysis of the Absorption Enhancing Action of Decanoic Acid and Its Derivatives in Rats. *Pharm Res* 11:388-392. doi: 10.1023/A:1018908903475
- Talavera S, Castroviejo S** (1991) *Flora ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares (Vol. 1)*. Editorial CSIC-CSIC Press.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al** (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731–9. doi: 10.1093/molbev/msr121
- Teakle NL, Tyerman SD** (2010) Mechanisms of Cl<sup>-</sup> transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ* 33:566–589. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02060.x
- Thakore Y** (2006) The biopesticide market for global agricultural use.. *Ind Biotechnol* 2:194–208.
- Thompson J, Gibson TJ, Plewniak F, et al** (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876–4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876
- Tikhonovich IA, Provorov NA** (2009) From plant-microbe interactions to symbiogenetics: a universal paradigm for the interspecies genetic integration. *Ann Appl Biol* 154:341–350. doi: 10.1111/j.1744-7348.2008.00306.x
- Trujillo ME, Alonso-Vega P, Rodríguez R, et al** (2010) The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *ISME J* 4:1265–1281. doi: 10.1038/ismej.2010.55
- Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Fernandez-Molinero C, et al** (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. doi: 10.1099/ijs.0.65192-0
- Trujillo ME, Kroppenstedt RM, Schumann P, et al** (2006) *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2381–2385. doi: 10.1099/ijs.0.64449-0
- Uzun F, Dönmez HB, Ocak N** (2015) Genetic potential of wild birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) seeds collected from different geographical locations regarding to nutrient composition and nutritive value. *Agrofor Syst* 89:963–972. doi: 10.1007/s10457-015-9828-4
- Valdés M, Pérez N-O, Estrada-de-los Santos P, et al** (2005) Non-*Frankia* Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen †. 71:460–466. doi: 10.1128/AEM.71.1.460
- Valverde A, Fterich A, Mahdhi M, et al** (2010) *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:2182–2186. doi: 10.1099/ijs.0.014241-0
- van Berkum P, Eardly BD** (2002) The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl Environ Microbiol* 68:1132–6. doi: 10.1128/AEM.68.3.1132-1136.2002
- van Diepeningen AD, de Vos OJ, Korthals GW, van Bruggen AHC** (2006) Effects of organic versus conventional management on chemical and biological parameters in agricultural soils. *Appl Soil Ecol* 31:120–135. doi: 10.1016/j.apsoil.2005.03.003
- van Rhijn P, Vanderleyden J** (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* 59:124–42.
- van Spronsen PC, Bakhuizen R, van Brussel AA, Kijne JW** (1994) Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two-step process. *Eur J Cell Biol* 64:88–94.
- Vance CP** (1983) *Rhizobium* Infection and Nodulation: A Beneficial Plant Disease. *Annu Rev Microbiol* 37:399–424. doi: 10.1146/annurev.mi.37.100183.002151

- Vandamme EJ, De Baets S, Vanbaelen A, et al** (1998) Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab* 59:93–99. doi: 10.1016/S0141-3910(97)00185-7
- Velazquez E, Igual JM, Willems A, et al** (2001) *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *Int J Syst Evol Microbiol* 51:1011–1021. doi: 10.1099/00207713-51-3-1011
- Velázquez E, Martínez-Hidalgo P, Carro García, L. A, et al** (2013) Nodular endophytes: an untapped diversity. En: *Beneficial Plant-Microbial Interactions*. pp 214-236
- Verma VC, Singh SK, 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. doi: 10.1002/jobm.201000155
- Vervoorst FB** (1967) La vegetación de la República Argentina. VII. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado, Prov. de Buenos Aires. INTA
- Videira E, Castro P, Sá-Pereira F, et al** (2007) Use of *Lotus/Rhizobium* symbiosis in regeneration of polluted soils. *Lotus Neslett* 37:87–88.
- Vincent JM** (1970) The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. *A Man Pract Study Root-Nodule Bact* 1–13.
- Wang H, Bian L, Zhou P, et al** (2013) Core–sheath structured bacterial cellulose/polypyrrole nanocomposites with excellent conductivity as supercapacitors. *J Mater Chem A* 1:578–584. doi: 10.1039/C2TA00040G
- Wang S, Hao B, Li J, et al** (2014) Whole-genome sequencing of *Mesorhizobium huakuii* 7653R provides molecular insights into host specificity and symbiosis island dynamics. *BMC Genomics* 15:440. doi: 10.1186/1471-2164-15-440
- Wardle DA** (1995) Impacts of Disturbance on Detritus Food Webs in Agro-Ecosystems of Contrasting Tillage and Weed Management Practices. *Adv Ecol Res* 26:105–185. doi: 10.1016/S0065-2504(08)60065-3
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al** (1987) Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463-464. doi: 10.1099/00207713-37-4-463
- Wei B, Yang G, Hong F** (2011) Preparation and evaluation of a kind of bacterial cellulose dry films with antibacterial properties. *Carbohydr Polym* 84:533–538. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.12.017
- Wei GH, Wang ET, Chen WX, et al** (2002) Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lepedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2219–2230. doi: 10.1099/00207713-52-6-2219
- Weller DM** (2007) *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology* 97:250-256. doi: 10.1094/PHYTO-97-2-0250
- Wen L, Kallenbach RL, Williams JE, et al** (2002) Performance of steers grazing rhizomatous and nonrhizomatous birdsfoot trefoil in pure stands and in tall fescue mixtures. *J Anim Sci* 80:1970. doi: 10.2527/2002.8071970x
- Wielbo J, Marek-Kozaczuk M, Kubik-Komar A, Skorupska A** (2007) Increased metabolic potential of *Rhizobium* spp. is associated with bacterial competitiveness. *Can J Microbiol* 53:957–967. doi: 10.1139/W07-053

- Wild A** (2003) Soils, land and food: managing the land during the twenty-first century.
- Williams GH** (1998) L'intérêt des lotiers: un possible renouveau (revue bibliographique). *Fourrages* 116:329–324.
- Wojciechowski MF** (2003) Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. *Adv Legum Syst* 10:5–35.
- Yamada Y, Yukphan P, Lan Vu HT, et al** (2012) Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J Gen Appl Microbiol* 58:397–404. doi: 10.2323/jgam.58.397
- Yanet Ixtaina V, Merced Mujica M** (2010) Seedling vigor response of *Lotus tenuis* populations to contrasting variations of water, light and nutrient availability. *Agrociencia (Montecillo)* 44:31–41.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G** (2011) The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *Eur J Soil Biol* 47:138–145. doi: 10.1016/j.ejsobi.2010.11.001
- Zakhia F** (2004) Diversité des bactéries hotes de légumineuses mediterraneennes en Tunisie et au Liban. PhD thesis, Université de Montpellier, France
- Zemenchik RA, Albrecht KA, Shaver RD** (2002) Improved Nutritive Value of Kura Clover– and Birdsfoot Trefoil–Grass Mixtures Compared with Grass Monocultures. *Agron J* 94:1131. doi: 10.2134/agronj2002.1131

