

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



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



800 AÑOS
**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

1218 - 2018



**INSTITUTO HISPANOLUSO DE
INVESTIGACIONES AGRARIAS**

TESIS DOCTORAL

Análisis genotípico, fenotípico y funcional de bacterias aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L. para la evaluación de su potencial como biofertilizantes agrícolas en cultivos de garbanzo y trigo.

Memoria presentada por **Xavier Alexis Cruz González** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Xavier Alexis Cruz González'.

Fdo. Xavier Alexis Cruz González

Salamanca, 2018

Dr. Raúl Rivas González, Profesor Titular del área de Microbiología y Dra. Paula García Fraile,

AUTORIZAN:

La presentación y defensa de la Tesis Doctoral titulada “Análisis genotípico, fenotípico y funcional de bacterias aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L. para la evaluación de su potencial como biofertilizantes agrícolas en cultivos de garbanzo y trigo”, elaborada por Don Xavier Alexis Cruz González y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca, para la obtención del grado de Doctor.

Y para que así conste, extendemos la presente autorización en Salamanca, a 15 de junio de 2018.



Fdo.: Dr. D. Raúl Rivas González



Fdo.: Dra. Dña. Paula García Fraile

A mis Padres

A mis hermanos

A mis nuevos amigos

*La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de vida de todo
progreso*

Louis Pasteur

Agradecimientos

Deseo agradecer a Dr. Raúl Rivas, por permitirme realizar esta tesis bajo su dirección, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de participar en una gran cantidad de actividades de índole científica las cuales me han servido para crecer profesionalmente. De igual forma agradezco a mi codirectora Dra. Paula García Fraile por su inmensa ayuda en la elaboración de esta investigación.

Por otra parte, le doy las gracias a los demás profesores del grupo Interacción Planta Microorganismos; a los Catedráticos Eustoquio Martínez Molina, Pedro Mateos González y Encarna Velázquez. Gracias por estar presente cuando me surgía alguna duda o hablar de tantas cosas, son personas admirables.

Ahora bien, MUCHAS GRACIAS a todos los miembros de Laboraterapia. Marta, Alexandra, Alejandro, Lorena Celador, Lorena Carro, Esther, Pepe, Pilar, Zaki, Pepín, Rebeca y espero que no se me quede ninguno. A pesar de estar tan lejos de mi país y lo que con eso conlleva, sin amigos ni familia, nunca me sentí solo. Siempre pude contar con ustedes. Han sido, son y serán mis amigos y familia extendida, a pesar de que tengamos un océano que nos separe de por medio, saben que siempre podrán contar conmigo. Gracias por las aventuras vividas en Reino Unido, Hungría, Eslovaquia y Austria. Han sido unos profesores de la gastronomía española (bebidas incluidas) de 10, sin ustedes no hubiera salido del McDonald. Son tanto los recuerdos y las experiencias que me llevo, pero serán más las que nos queden por vivir, pues, ésto han sido 4 años, pero nos queda toda la vida por delante, así que el próximo capítulo será Laboraterapia en Puerto Rico.

De igual forma le doy las gracias a las diferentes personas de la USAL que me han ayudado en esta etapa de mi vida como: Inma, Tomás, Belén, Luis Román, Enrique Monte, Nieves, David.

No quisiera que pasara desapercibido la Fundación Kinesis de Puerto Rico por la increíble labor de ayudarme en poder culminar mis estudios. Gracias, ya que su misión de proveer los recursos necesarios a nosotros para crecer intelectualmente y así apoyar el desarrollo de Puerto Rico, y más ahora que sí lo necesita, es de total admiración. Les puedo asegurar que conmigo lo han logrado, estoy deseoso de regresar y poder ayudar al progreso de la Isla.

Además, le agradezco todos los profesores que he tenido desde que ingresé a la escuela hasta que culminé la universidad. Su extraordinaria labor educativa me ha convertido en el profesional que soy. Deseo destacar el trabajo realizado por las maestras Carmen Matos, por introducirme en el mundo de las ciencias desde los 10 años con los experimentos de feria científica. A María E. Thiele por explotar mi curiosidad científica, también a los demás profesores que nos ayudaron en ese camino como Miriam González y Luis Alvarado, y sin olvidar a todos los amigos conseguidos en la feria científica durante esos 6 años. Agradezco a los compañeros de CEIBA, que pesar que los abandoné para venir a España y realizar estos estudios, saben que siempre estaré disponible en todo lo que puedan necesitar.

También agradezco a mis padres, por siempre apoyarme en todos los momentos de mi vida. A pesar de sus trabajos, siempre tuvieron tiempo para sentarse conmigo a

estudiar largas horas y llevarme a todos los lugares para poder hacer mis experimentos de feria científica. El poder haber realizado esta tesis doctoral, fue por estar siempre presente en todos los momentos. Además, a mis hermanos, compañeros de juego, son un ejemplo para mí, como espero serlo para ustedes. No puedo olvidar a mis abuelos (aunque algunos no estén) por todo el cariño, mis tíos, primos, en fin, a todos.

Gracias a Dios cierro un importante capítulo de mi vida, y ahora me toca comenzar otro. Saben que como he contado con cada uno de ustedes a lo largo de mi vida, ustedes pueden contar conmigo. Siempre estaré agradecido de cada granito de arena que me han aportado.

ÍNDICE

Introducción

1.	Impacto de la agricultura en la sociedad	1
2.	Problemas actuales en la agricultura	5
2.1.	Efectos de la utilización inadecuada de los fertilizantes químicos	5
2.2.	Límites agrícolas de los suelos	8
2.3.	Problemas de organismos fitopatógenos en los cultivos	10
2.3.1.	Impacto de microorganismos fitopatógenos en los cultivos.....	10
2.3.2.	Control químico y biológico.....	10
3.	Agricultura sostenible y eficiente.....	14
3.1.	Técnicas ecoamigables	14
3.2.	Interacción planta-microorganismo y su beneficio mutualista	16
4.	Microorganismos y mecanismos promotores del crecimiento vegetal	19
4.1.	Fijación de Nitrógeno	19
4.1.1.	Fijación de nitrógeno en vida libre.....	19
4.1.2.	Fijación simbiótica de nitrógeno	21
4.2.	Solubilización de fosfato	26
4.3.	Producción de fitohormonas por microorganismos	28
4.4.	Producción de sideróforos	30
4.5.	PGPR capacidad de rizorremediadores.....	32
5.	Potencial de microorganismos de diversas familias como Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPR)	34
5.1.	Género <i>Bacillus</i>	35
5.2.	Rhizobiales.....	36
5.2.1.	Género <i>Mesorhizobium</i>	42
6.	Cultivos de <i>Cicer arietinum</i> L. (garbanzo) y <i>Triticum aestivum</i> L. (trigo).....	44
6.1.	Importancia de los cultivos de garbanzo y trigo en el mundo y España.....	44
6.2.	Relación simbiótica entre Garbanzo y <i>Mesorhizobium</i>	52

Objetivos

Objetivos.....	55
----------------	----

Materiales y Métodos

1. Aislamiento de endófitos y endosimbiontes.....	61
1.1. Esterilización y pre-germinación de las semillas de garbanzo	61
1.2. Utilización de planta trampa para el aislamiento de microorganismos	61
1.3. Aislamiento de microorganismos procedentes de las plantas trampas	61
1.4. Crecimiento en cantidad	62
1.5. Preservación y recuperación de las muestras.....	62
2. Caracterización fenotípica y genotípica de los aislado	62
2.1. Caracterización morfológica colonial	62
2.2. Tinción Gram.....	63
2.3. Extracción de ADN de los endófitos	63
2.3.1. Lysis Buffer	63
2.3.2. Extract-N-Amp™ Plant Tissue PCR Kits	64
2.4. Perfiles genéticos de RAPD y TP-RAPD	65
2.5. Secuenciación de genes: 16S rARN, <i>recA</i> , <i>atpD</i> , <i>nodC</i> , <i>glnII</i> y <i>rpoB</i>	66
2.6. Purificación de banda en gel de agarosa.....	63
2.7. Secuenciación y análisis filogenético del gen 16SrRNA y los housekeeping	67
2.8. Pruebas complementarias para caracterización y descripción de cepas que constituyen nuevas especies.....	68
3. Análisis de mecanismos PGRP	69
3.1. Suspensión celular para pruebas PGPR	69
3.2. Solubilización de fósforo	69
3.3. Producción de celulosa	69
3.4. Formación de biofilms	70
3.5. Actividad celulolítica.....	70
3.6. Producción de IAA	70
3.7. Producción de sideróforos	72
3.8. ACC desaminasa.....	73
4. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en cámara iluminada.....	74
4.1. Cultivo en cámara iluminada	74
4.2. Cortes y análisis de nódulos.....	75
5. Ensayo de colonización.....	75
5.1. Transformación de las cepas.....	75

5.2.	Inoculación de las cepas transformadas en garbanzo y trigo.....	78
5.2.1.	Ensayo de colonización en garbanzo.....	78
5.2.2.	Ensayo de colonización en trigo.....	78
5.3.	Marcaje mediante inmunofluorescencia	78
5.4.	Visualización de las raíces bajo microscopia fluorescencia	79
6.	Ensayo de invernadero en garbanzo y trigo	79
6.1.	Crecimiento y desarrollo de garbanzo en invernadero	79
6.2.	Crecimiento y desarrollo de trigo en rotación con garbanzo en invernadero	80
7.	Ensayo de campo en garbanzo	80
8.	Fitorremediación de metales	83
8.1.	Selección de microorganismo	83
8.2.	Tolerancia a diversas concentraciones de metales.....	83
8.3.	Selección de plantas y esterilización de las semillas	83
8.4.	Interacción planta-microorganismo y su tolerancia a metales “in vitro”.....	84
8.5.	Evaluación de colonización del sistema radicular frente a la presencia de metales	84
8.5.1.	Marcaje, tinción de los microorganismos y ensayos <i>in vitro</i> de colonización de raíces	84
8.5.2.	Visualización mediante microscopía.....	85
8.6.	Tolerancia y bioacumulación de metales bajo condiciones de invernadero	85
9.	Ensayos del potencial de las cepas de este estudio como antifúngicos.....	86
9.1.	Aislamiento de hongos fitopatógenos de semillas de garbanzo e identificación de cepas productoras de antifúngico entre los aislados de este estudio.....	86
9.2.	Ensayo invernadero para probar el potencial antifúngico en planta de los aislados bacterianos	89
9.2.1.	Inoculación y cultivo de garbanzo en presencia de <i>Fusarium</i> sp.	89
10.	Adaptabilidad de cepas filogenéticamente relacionadas, aisladas con 14 años de diferencias.....	89
10.1.	Estudio genético.....	89
10.2.	Adaptabilidad de las cepas en condiciones tropicales	90
11.	Análisis de datos.....	90

Resultados y Discusión

Capítulo I

Estudio de Biodiversidad bacteriana de endófitos y endosimbiontes presente en nódulos de *Cicer arietinum* L.

1. Recolección de muestras y aislamiento.....	93
2. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de nódulos de garbanzo	94
2.1. Características morfológicas coloniales.....	94
2.2. Características morfológicas microscópicas	101
3. Caracterización genotípica de las cepas aisladas de nódulos de garbanzo	104
3.1. Análisis de diversidad microbiana mediante Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD).....	104
3.2. Evaluación de las secuencias del gen 16S del ARN ribosomal	108
3.3. Secuenciación y análisis de las secuencias de genes <i>housekeeping</i> o constitutivos y genes simbióticos en las cepas del género <i>Mesorhizobium</i>	114
3.3.1. Secuenciación del gen <i>recA</i>	114
3.3.2. Secuenciación del gen <i>glnII</i>	117
3.3.3. Secuenciación del gen <i>rpoB</i>	119
3.3.4. Secuenciación del gen <i>atpD</i>	121
3.3.5. Concatenación <i>recA-glnII</i>	123
3.3.6. Secuenciación del gen <i>nodC</i>	126
4. Caracterización de las posibles nuevas especies	128
4.1. Descripción de <i>Domibacillus</i> FSZ 02 como nueva especie del género <i>Domibacillus</i>	129
4.2. Descripción de <i>Mesorhizobium</i> FSZ 52 como una nueva especie del género <i>Mesorhizobium</i>	130

Capítulo II

Análisis de los endófitos de *Cicer arietinum* L. como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

1. Potencial de los mecanismos PGPR.....	133
1.1. Producción de celulosa y celulasas	138
1.2. Producción de biofilms	141

1.3. Producción de sideróforos	142
1.4. Solubilización de fosfato	143
1.5. Producción de Ácido Indol-3-acético (IAA)	146
1.6. Producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminasa.....	148

Capítulo III

Análisis del Potencial Simbiótico de cepas de *Mesorhizobium* sobre plantas de *Cicer arietinum* L. en condiciones controladas

1. Análisis del crecimiento y desarrollo de cepas de <i>Mesorhizobium</i> sobre plantas de <i>Cicer arietinum</i> L.	153
1.1. Longitudes de las partes aéreas y radicales.	153
1.2. Contenido de Clorofila.....	156
1.3. Pesos de las partes aéreas y radicales	157
2. Evaluación de los nódulos desarrollado en las plantas de <i>Cicer arietinum</i> L.....	161
2.1. Cuantificación de número de nódulos de las diversas cepas de <i>Mesorhizobium</i>	161
2.2. Análisis histológico de los nódulos de las cepas de <i>Mesorhizobium</i>	162
3. Ensayo de campo con cepas seleccionadas	167
3.1. Identificación y resumen de las cepas más competentes	167
3.2. Estudio de producción en campo	167

Capítulo IV

Evaluación de colonización de las mejores cepas de *Mesorhizobium* y co-inoculaciones con *Bacillus* y su efecto en las plantas de garbanzo en rotación con trigo bajo condiciones de invernadero.

1. Evaluación de la colonización del sistema radicular en cámara iluminada	175
1.1. Colonización de las cepas transformadas de <i>Mesorhizobium</i> en garbanzo.	175
1.2. Colonización de las cepas transformadas de <i>Mesorhizobium</i> en trigo	177
1.3. Colonización de <i>Mesorhizobium</i> coinoculadas con <i>Bacillus</i> en garbanzo y trigo	179
2. Ensayo de Invernadero con co-inoculaciones.	182
2.1. Crecimiento y desarrollo de las plantas de garbanzo con las diferentes inoculaciones.	182

2.2. Desarrollo y producción de las plantas de trigo con las diferentes inoculaciones.	185
2.3. Análisis nutricional de producción de granos de garbanzo y trigo que fueron rotados.....	188
2.4. Evaluación de los elementos presentes en el suelo durante la rotación.....	192

Capítulo V

Análisis de estreses bióticos y abióticos sobre cepas seleccionadas

1. Análisis del potencial efecto biocontrolador de endófitos aislados de nódulo de garbanzo contra hongos que afectan al cultivo del garbanzo.	197
1.1. Recolección e identificación de las cepas fúngicas	197
1.2. Identificación de endófitos de garbanzo con capacidad antifúngica.....	198
1.3. Ensayos en Invernadero	200
2. Tolerancia y rizadorremediación en presencia de metales.....	206
2.1. Selección de plantas y tolerancia de la cepa FCAP 26 a diferentes metales	206
2.2. Ensayos <i>in vitro</i> de resistencia a metales.....	207
2.2.1. Desarrollo de las de plantas en presencia de metales	207
2.2.2. Ensayo de colonización en el sistema radicular	210
2.3. Ensayo en invernadero en presencia de metales	212
2.3.1. <i>Erophaca baetica</i> L.	212
2.3.2. <i>Astragalus pelecinus</i> L.	216
3. Resistencia a condiciones tropicales de cepas del género <i>Mesorhizobium</i> aisladas de la localidad pero con 14 años de diferencia.....	218
3.1. Ensayo bajo condiciones ambientales.....	218
3.2. Análisis genómico de cepas seleccionadas	230

Discusión General

Discusión General.....	235
------------------------	-----

Conclusiones

Conclusiones.....	241
-------------------	-----

Bibliografía

Bibliografía.....241

**Summary and
Conclusion**

.....290

Abreviaciones

- ® – marca registrada
- °C – grados Celsius
- µg – microgramos
- µl – microlitros
- µM – micromolar
- ACC – 1-aminociclopropano-1-carboxílico
- ADN o DNA – ácido deoxiribunonucleico
- AIA o IAA – Ácido Indolacético
- *atpD* – gen housekeeping, subunidad de ATP sintasa
- BLAST – “Basic Local Aligment Search Tool”
- BSA – Albúmina se Suero Bovino
- cm – centímetro
- CMC – carboximetilcelulosa
- dpi – días post-inoculación
- EDTA – ácido etilendiaminotetraacético
- et al – colaboradores
- F – foward
- FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
- FCAP – nomenclatura para los endófitos de garbanzo aislados en 2000
- FN – factores de nodulación
- FSZ – nomenclatura para los endófitos de garbanzo aislados en 2014
- g – gramos
- GFP – proteína verde fluorescente
- *glnII* – gen housekeeping, glutamina sintetasa II
- H₂O_{dd} – agua destilada
- ha – hectárea
- HDTMA – “Hexadecyltrimethylammonium bromide”
- HgCl₂ – cloruro de mercurio
- ITS – “Internal transcribed spacer”
- JMM – “Janson’s Modified medium”
- Kb – kilo base
- LB – medio Luria-Berthani
- M – Molar
- mg – miligramos
- ml – mililitro
- mm – milímetro
- N₂ – nitrógeno atmosférico
- *nodC* – gen housekeeping, N-acetilgluconasaminiltransferasa
- p/v – peso sobre volumen
- pb – pares de base
- PBS – Buffer de fosfato salino
- PCR – Reacción en cadena de la Polimerasa
- PGPR – “Plant Growth Promoting Rizobacteria”
- psi – unidad de presión - libra de fuerza por pulgada cuadrada
- PVC – cloruro de ponivinilo

- R – reverse
- RAPD – Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico
- RAST – “Rapid Annotation using Subsystem Technology”
- *recA* – gen housekeeping, recombinasa
- RFP – proteína roja fluorescente
- Rpm – revoluciones por minute
- *rpoB* – gen housekeeping, subunidad β de la RNA polimerasa
- SDS – Dodecilsulfato sódico
- sp o spp – especie
- t – toneladas
- TAE – Tris acético EDTA
- TPRAPD – Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico con 2 primers
- TSA – medio “Tryptic Soy Agar”
- TY – Medio triptona y extracto de levadura
- UV – luz ultravioleta
- VRB – medio Agar bilis y rojo violeta con lactosa
- x g – Fuerza de centrifuga relativa
- YMA – medio “Yeast Mannitol Agar”
- YMB – medio “Yeast Mannitol Broth”

INTRODUCCIÓN

1. Impacto de la agricultura en la sociedad

La sociedad tal como la conocemos hoy en día se debe básicamente a la agricultura, pues hasta que nuestros antepasados dominaron los primeros cultivos y domesticaron a los animales, no se desarrollarán las primeras y grandes civilizaciones. Por consiguiente, el momento en el que el ser humano fue capaz de dejar a un lado la vida nómada, basada en la recolección y la caza, y pasar a una vida donde él mismo podría procurarse los alimentos mediante cultivos y ganadería constituyó el nacimiento de la sociedad actual. Estos primeros indicios los observamos hace unos 10,000 años en la zona de Mesopotamia con la domesticación de trigo y cebada (Khush, 2001). Esto surgió de forma independiente en varios puntos distantes del planeta. Por ejemplo, en América los nativos antes de su contacto con los europeos ya sabían cultivar y cosechar maíz, tomate, patata, entre otros cultivos; de igual forma ocurría en el otro extremo del planeta, pues, en Asia se cultivaba arroz (Carpanetto & Bianchini, 2011).

Conforme fueron pasando los siglos, la agricultura se enfrentó a nuevos retos a fin de poder alimentar a las crecientes poblaciones. A medida que las metrópolis crecían era importante identificar nuevas tierras con potencial agrícola para su explotación, de lo contrario las poblaciones pasarían hambre y se desestabilizaría el sistema social establecido. Un efecto se observó cuando en 1750 tanto en Gran Bretaña como otras zonas Europa el precio de los cereales comenzó a incrementarse a consecuencia del aumento poblacional. Por tanto, o se renovaba el sistema agrícola de la época o las sociedades iban a vivir un verdadero caos. Para resolver dicha crisis entre los años 1750 a 1880 los gobernantes facilitaron una expansión agrícola, en este sentido se aumentó y extendió la cantidad de tierras cultivables y la mano de obra; evitando de esta forma el colapso de sus sociedades, gracias a esta primera revolución agrícola (Zanden, 1991).

Según fueron pasando los años, ya a finales de siglo XIX y principios del siglo XX, las nuevas tecnologías, como la utilización de maquinaria, aumentaron la producción agrícola. Eran pocos los agricultores que podían utilizar este tipo de maquinaria, por tanto, ellos eran los principales beneficiarios de la producción agrícola. Además, también se comenzó a incorporar la compra de semillas de mejor calidad, rotación de cultivos y la utilización de fertilizantes.

Conforme pasaron las primeras décadas del siglo XX, los progresos en la medicina iban avanzando y, por consiguiente, la expectativa de vida aumentó; en otras palabras, la tasa de mortalidad disminuyó. Esto tuvo como consecuencia un incremento importante en la población mundial, y en zonas densamente pobladas, la población se duplicó desde mediados del siglo XX hasta el XXI (Khush, 2001). Así, esta situación implicó un nuevo reto para la agricultura: evitar una inseguridad alimentaria de la creciente población mundial (Araus et al., 2014). Entre los años 1960 y 1970, una hambruna amenazaba a diferentes partes del planeta, (Sayer & Cassman, 2013), por lo que, se comenzaron a realizar inversiones en el área agrícola a fin de mejorar la productividad, infraestructuras mercados e implementación de nuevas políticas de investigaciones agrícolas (Pingali, 2012; Gómez et al., 2013). Estas nuevas políticas sirvieron para resolver este problema, a tal punto que fueron reconocidas como la Revolución Verde (1966 a 1985) (Pingali, 2012).

Introducción

Una de las técnicas que se realizó durante esta Revolución Verde fue la mejora genética de los principales cultivos con el fin de obtener: mejor tolerancia a estrés abiótico, resistencia a estrés biótico, reducción del periodo de cosecha, entre otros. Esto fue realizado mediante hibridación convencional y selección de las mejores variedades (Khush, 2001; Pingali, 2012). De hecho, gracias a esta técnica de hibridación se logró mejorar el rendimiento de muchos cultivos, en especial el trigo, el maíz y el arroz (Skorov, 1973). Otro punto importante de la Revolución Verde fue la mejora en los sistemas de riego, la sincronización siembra-cosecha y un mejor control de malas hierbas y plagas. Pero si por algo se destacó esta Revolución Verde fue por la utilización de fertilizantes químicos. (Pingali, 2012; Skorov, 1973; Conway & Barbier, 1988; Peng et al., 1999).

Así, esta Revolución Verde produjo aumentos significativos de las producciones agrícolas, un ejemplo de ello fueron los cultivos de cereales donde, aunque sólo se aumentó un 30% en superficie de cultivo, con las nuevas técnicas se lograron rendimientos muy altos desde que comenzó la Revolución Verde, la producción de trigo ha aumentado un 208%, el arroz un 109% y el maíz un 157% (Pingali, 2012). Por ejemplo, si China igualara la producción que obtuvo en 1992 con las técnicas que existían antes de la Revolución Verde la mayoría de los bosques y zonas de pastos de China hubieran desaparecido (Khush, 2001). El resumen, la Revolución Verde consiguió alcanzar los siguientes logros: aumentar la cantidad de alimentos y productividad de algunos países, reducir la pobreza, disminuir los precios de los alimentos y evitar la destrucción de muchas zonas boscosas (Pingali, 2012; Khush, 2001; Skorov, 1973).

Sin embargo, también esta Revolución Verde trajo consigo desventajas. Una de ellas fue que a consecuencia de los extensos terrenos para el monocultivo con genotipos similares se incrementó el problema de plagas y enfermedades, y esto, a su vez, se agravó con el uso de los pesticidas. Además, el uso inadecuado de fertilizantes causa daños a la salud humana, contamina aguas subterráneas y ecosistemas acuáticos y pérdidas de la diversidad genética (Conway & Barbier, 1988). A pesar de que esta Revolución logró reducir la desnutrición, la reducción en la deficiencia de micronutrientes ha sido muy lenta (Gómez et al., 2013). Otro problema fue que sólo los agricultores con poder adquisitivo alto se aprovechaban estas nuevas tecnologías, tendencias y productos, por consiguiente, abriendo una brecha muy amplia entre los agricultores ricos y pobres. Mas no sólo se trataba de agricultores, también un problema de países, pues la mayoría de los países de África no tuvo la infraestructura, inversiones, mercado ni incentivos y por tanto mantuvieron los problemas hambruna (Pingali, 2012).

Al ritmo que está creciendo la población mundial actualmente, la producción de alimentos a nivel mundial debería aumentar 2,4% de forma anual, pues para el 2050 la producción de alimentos debería duplicarse, sin embargo, el porcentaje actual de crecimiento en la producción de alimento es de 1,3% (Araus et al., 2014), en otras palabras, la producción de alimentos no se está adecuando al crecimiento poblacional. La producción de alimentos sostenible o eco-amigables no es un mero deseo, es algo a lo que debemos llegar. Así, la Revolución Verde del siglo XX destacó principalmente por el desarrollo de fertilizantes nitrogenados, algo imprescindible para la mayoría de los cultivos. Sin embargo, el uso indiscriminado este tipo de fertilizantes ocasiona la contaminación de aguas subterráneas y es uno de los causantes del efecto invernadero. Esto es debido a que las emisiones de óxido nitroso son 300 veces más potentes que el dióxido de carbono (Sayer & Cassman, 2013), así pues, producimos algo que beneficia las plantas, por un lado, pero

por otro, se le atribuye el incremento en temperaturas lo que ocasiona cambios climáticos (exceso o carencia de precipitaciones, temperaturas medias muy alta o muy bajas de lo normal, etcétera) en muchas zonas agrícolas por dicho efecto se perderán sus cultivos prácticamente en su totalidad. Referente la producción de fertilizantes nitrogenados, actualmente se producen más de 100 millones de toneladas de amoníaco, lo que claramente contribuye al efecto invernadero (Palme et al., 2014).

Recapitulando, lo que en un pasado funcionó no necesariamente seguirá funcionando, a pesar que el problema sea el mismo, mayor población es sinónimo de mayor necesidad de producción agrícola, pero no puede pasar por una mayor utilización de fertilizantes químicos, pues su excesiva producción y uso indiscriminado afectan al Planeta. Por lo tanto, para resolver la misma situación en esta ocasión hay que buscar nuevas alternativas que no afecten o que su efecto al ambiente sea mínimo. Por consiguiente, es momento de una nueva y verdadera revolución verde.

2. Problemas actuales en la agricultura

2.1. Efectos de la utilización inadecuada de los fertilizantes químicos

Como ocurre con otros compuestos naturales, el nitrógeno se encuentra en un ciclo biogeoquímico, el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Figura 1). Los diferentes compuestos de nitrógeno circulan por el aire, los sistemas acuáticos y el suelo. Sin embargo, la acción humana está “inyectando” cada vez más cantidades nitrógeno al ciclo natural, por tanto, no es de extrañar encontrar artículos de revista donde se hace alusión al ciclo del nitrógeno como Ciclo Fuera de Control (Fields, 2004) La figura 1 muestra la acción humana en el ciclo del nitrógeno. Dicho ciclo natural puede tener impactos muy graves sobre la biodiversidad, calentamiento global, calidad de las agua y salud humana, pues estamos convirtiendo una forma de nitrógeno no reactiva (N_2) a una forma química muy reactiva. Sabemos la importancia de los fertilizantes nitrogenados en evitar hambrunas, sin embargo, su mal uso puede generar muchos problemas, por consiguiente, es imprescindible saber cómo manejamos dicho ciclo (Fields, 2004).

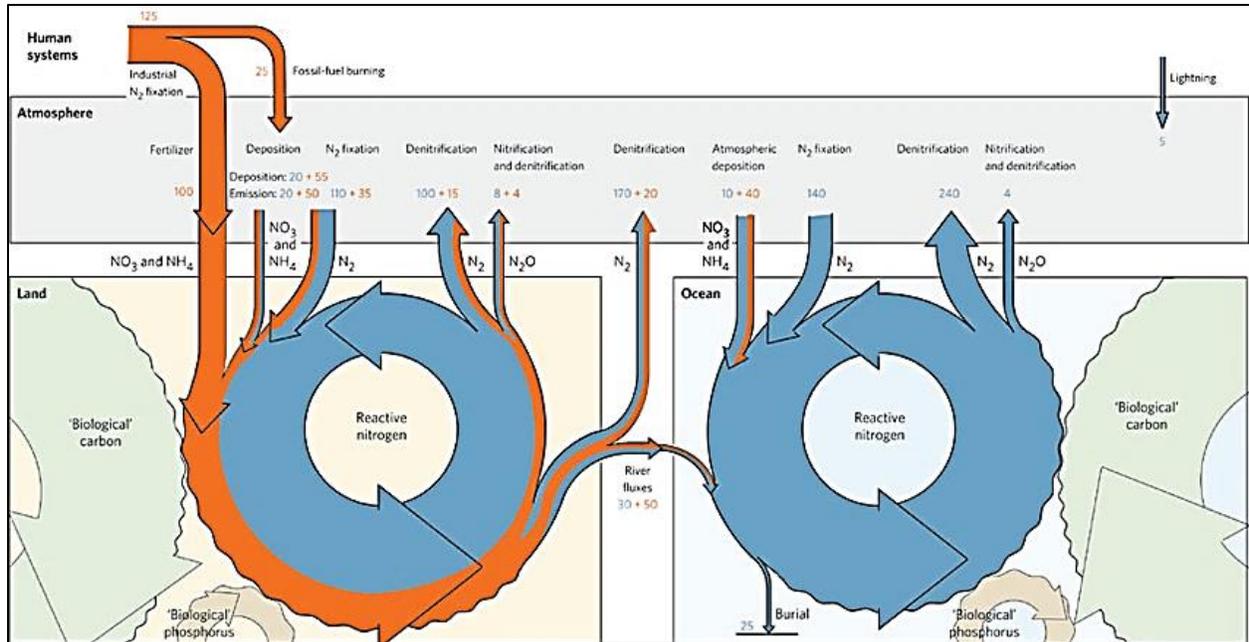


Figura 1. Ciclo de nitrógeno tanto en suelo como en el océano. El color naranja muestra la incorporación de nitrógeno en los ciclos naturales. Figura tomada de Gruber & Galloway, 2008.

El nitrógeno es un elemento esencial en nuestra vida, este elemento lo encontramos en macromoléculas esenciales como el ADN y los aminoácidos. La mayor parte de éste se encuentra en la atmósfera (78%) en forma N₂, mediante un fuerte tripe enlace, una forma muy estable y poco reactiva. Sin embargo, la mayoría de los organismos vivientes utilizan formas más reactivas, como el amonio (NH₄⁺) o el nitrato (NO₃). Así, la mayor parte de nitrógeno atmosférico fijado y disponible para la biosfera proviene de las bacterias. He aquí una posible alternativa amigable con el ambiente para la producción de fertilizantes con orígenes biológico. Sin embargo, la producción y el consumo de fertilizantes químicos continúa aumentando en todo el mundo, y por consiguiente los problemas ambientales que conllevan.

Del 100% del nitrógeno aplicado al suelo, se estima que las plantas utilizan un 50%, el otro 50% se pierde según las siguientes estimaciones: 2-20% por pérdidas de evaporación, 15-25% mediante la reacción con compuestos orgánicos en los suelos arcillosos y 2-10% se pierden y llegan a aguas superficiales y subterráneas (Savci, 2012). Un ejemplo de esto fue lo observado en varias granjas en la localidad de Ontario, Canadá; donde se analizaron diversos pozos de la localidad en un área donde más del 50% del terreno se utiliza para la producción agrícola, donde encontraron que el 14% de estos pozos mostraron valores por encima de los límites en concentraciones de NO₃ (10 mg/L), cabe mencionar que el 30% del agua utilizada en Ontario proviene de recursos subterráneos (Goss et al., 1998). Otra zona preocupante por la contaminación de las aguas subterráneas es Eskisehir en Turquía, donde los análisis de 51 pozos y 9 puntos analizados en el río Porsuk durante 2 años encontraron una media de 40,0mg/L de nitratos, donde el 34,2% de las muestras sus resultados estaban por encima de 45mg/L, todos estos superiores a los límites estándares (Savci, 2012). La presencia de nitratos en aguas subterráneas que se utilizan para consumo humano puede causar efectos a la salud. Los nitratos son absorbidos por el cuerpo

en el tracto intestinal. Las glándulas salivales pueden concentrar el nitrato, donde se puede generar efectos tóxicos en el cuerpo humano. El efecto primario es cuando lo acumulado excede los 50mg en adultos, el sistema digestivo y urinario se inflama. La toxicidad secundaria, puede causar metahemoglobinemia, el nitrato y nitrito reacciona con la hemoglobina, alterando el transporte de oxígeno en la sangre, afectando principalmente a los infantes menores de 1 año (Savci, 2012).

Otro problema muy preocupante a consecuencia de ese exceso y mal uso de los fertilizantes es la eutrofización. Consiste en el enriquecimiento desmesurado de nutrientes, en los ecosistemas acuáticos. Un aumento en las cantidades de nitrógeno y otra serie de compuestos como el fósforo ocasiona un incremento en la cantidad de plantas acuáticas y algas, que consumen una gran cantidad del oxígeno del agua, afectando a las otras especies de seres vivos que allí habitan. Este problema del excesivo crecimiento de malezas acuáticas y del fitoplancton (aumenta la turbidez el agua) está afectando a muchos ecosistemas en mundo al reducir su biodiversidad (Withers et al., 2014; Dudgeon et al., 2006). A pesar de que la implementación de estos fertilizantes nitrogenados se realiza en los suelos, mediante las escorrentías, especialmente en zonas adyacentes al mar, ésta puede contaminar las aguas marinas costeras. La Unión Europea posee una directiva sobre los nitratos (1991) con el fin de reducir los efectos de la eutrofización en las aguas costeras. Sin embargo, son muy pocos los estados miembros que han logrado reducir la contaminación de nitratos procedentes de la agricultura y, por consiguiente, reducir los efectos de la eutrofización (Andersen et al., 2014). En resumen, la eutrofización se ha convertido en un problema global donde los nutrientes provenientes de la agricultura son el principal causante. Así pues, es sumamente necesario que los sectores que utilizan fertilizantes, en especial los que poseen un contenido de nitrógeno y fósforo, busquen soluciones sostenibles y estrategias de reducción para evitar la contaminación de las aguas (Withers et al., 2014). Se considera que la agricultura es la principal causa del problema de eutrofización en muchas de las cuencas del mundo, debido a que muchas veces se sobrestima la necesidad de ciertos nutrientes agrícolas en algunos suelos. Por tanto, los esfuerzos principales para mitigar este problema deben centrarse en las prácticas agrícolas, a fin de obtener resultados de menor contaminación en las aguas de manera más rápida y duradera (Withers et al., 2014).

Aparte de la contaminación de los recursos hídricos, el inadecuado uso de los fertilizantes también afecta los suelos. A pesar de que los efectos en el suelo no son inmediatos, como la contaminación del agua, pues el suelo tiene un alto poder de almacenamiento de sustancias debido a sus componentes, a largo plazo los problemas se hacen ver, como en la disminución de la fertilidad de los suelos, por tanto, disminuyendo la productividad agrícola y afectando el equilibrio natural de los mismos. Por ejemplo, la adición de fertilizantes que tienen como contenido sodio y potasio puede originar una acumulación de estos elementos hasta afectar negativamente al suelo, perturbando el pH o deteriorando su estructura (Cakmak & Saljnikov 2010). Algunos fertilizantes nitrogenados pueden formar ácido disminuyendo el pH, como también los fertilizantes que alcalinizan los suelos, por tanto, su excesivo uso ocasionaría alteración del pH y, por tanto, de la microbiota del suelo, por consiguiente, afectando el rendimiento de los recursos del suelo, pues, las bacterias nitrificantes del suelo original posiblemente ya no estarán, lo que significará la necesidad de adicionar más fertilizante. Más no solo se afecta la comunidad microbiana, también algunos animales de importancia agrícola como los gusanos, lombrices, entre otros capaces de

Introducción

mejorar la fertilidad natural de los suelos, también se afectan. Ejemplos de esto se observaron en la provincia de Rize en Turquía, donde la fertilización con sulfato de amonio para los cultivos de plantas de té, disminuyó el pH del suelo, y un 85% de la zona tiene un pH menor a 4,0 (Savci, 2012). Otra implicación trascendental que tiene el cambio en pH de a consecuencia de los fertilizantes químicos y su consecuente aumento en la acidez de los suelos es la disminución de la solubilidad de elementos trazas, haciendo que algunos de ellos no estén biodisponibles para las plantas lo que afecta a la salud de las plantas y, consecuente, ocasiona una reducción en la producción de los cultivos (Cakmak & Saljnikov 2010).

El aire es otro de los recursos naturales afectados por el mal uso de los fertilizantes químicos. El exceso de aplicación de fertilizantes origina emisiones al aire de diferentes formas de óxidos de nitrógeno (NO, N₂O, NO₂), que contribuyen al efecto invernadero. Por ejemplo, el N₂O aumenta entre un 0,2 a 0,3% anualmente. En suelos calcáreos y alcalinos, la aplicación de fertilizantes con urea origina la evaporación de NH₃ y su posterior deposición en los ecosistemas, dañando la vegetación. El NH₃ puede oxidarse y convertirse, al reaccionar con otros compuestos, en ácido nítrico y ácido sulfúrico, pudiendo crear lluvia ácida (Savci, 2012; Shaviv, 2001). En este caso, queremos exponer los problemas de los fertilizantes químicos y lo que queremos concluir es que, debido a todos estos problemas (ambientales, económicos, para la salud), se hace necesario buscar alternativas que permitan reducir el uso de los fertilizantes químicos al tiempo que se mantiene la producción agrícola o el rendimiento de los cultivos.

Para evitar o reducir los problemas de los fertilizantes químicos es importante conocer el terreno al cual se le aplicará el fertilizante y saber el fertilizante químico que mejor se adapta a ese suelo. De esta forma reducimos la contaminación y se es más costo efectivo en la producción agrícola. Está claro la importancia imprescindible de la agricultura como: industria viable, productiva y rentable ya que prácticamente es la base de nuestra supervivencia como sociedad, sin embargo, aparte de reconocer su fortaleza hay que identificar las debilidades de estos procesos agrícolas con el fin de encontrar soluciones sostenibles que al final del todo no terminen afectando su propia rentabilidad y sobre todo el ambiente.

2.2. Límites agrícolas de los suelos

El planeta Tierra está cubierto por un 71% de agua y el restante 29% es tierra, sin embargo, no toda esa tierra es apta para la agricultura. Según análisis del Banco Mundial, con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, de la totalidad de suelo en el Planeta, sólo el 37,7% se puede considerar tierra agrícola y cerca del 10,9% se consideran cultivables. Si analizamos la figura 2, observamos que en los últimos 30 años la cantidad de tierra cultivable que el ser humano ha utilizado se ha mantenido prácticamente estable, en otras palabras, no aumentado considerablemente. Como es de pensar la cantidad de tierras disponible para esta práctica es finita, y prácticamente estamos llegando a los límites. Como conocemos, la población mundial se ha incrementado de manera exponencial, pero los recursos del suelo no. Como consecuencia tenemos que producir más con lo mismo, pero, como ya hemos expuesto el uso indiscriminado de fertilizantes químicos está afectando el ambiente. En este sentido, según los datos del Banco Mundial, si hacemos una extrapolación y analizamos el porcentaje de hectáreas cultivables por persona, con este incremento mundial de la población cada

vez hay menos tierra cultivable por persona, figura 3. Por ejemplo, en 1961 existían 0,371 ha de suelo cultivable por personay en 2015 esa cantidad es de 0,194ha. Según las estadísticas, la población mundial continuará creciendo, pero la cantidad de suelo no, por tanto, esa cantidad de suelo por persona continuará disminuyendo, según datos análisis del Banco Mundial junto a datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

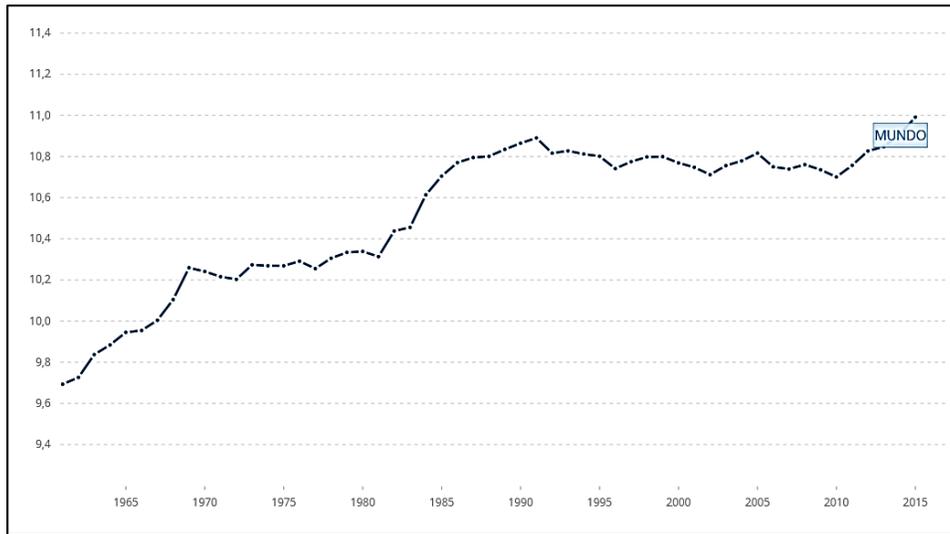


Figura 2. Porcentaje de tierra cultivables durante los años 1965 hasta 2015. Imagen obtenida del Banco Mundial. <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.ARBL.ZS>

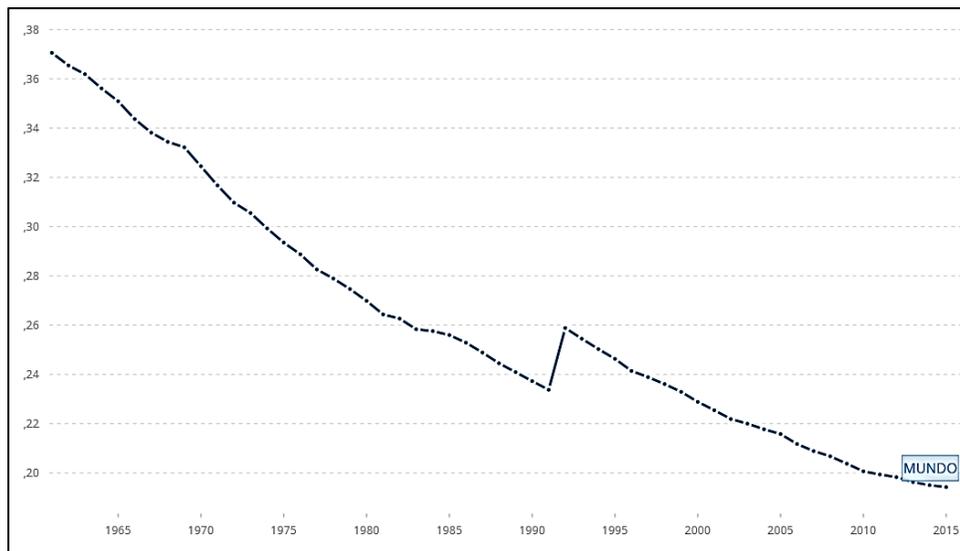


Figura 3. Cantidad de hectáreas por persona de tierra cultivables durante los años 1965 hasta 2015. Imagen obtenida del Banco Mundial. <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.ARBL.HA.PC>

Reconociendo que los suelos son un recurso finito, es muy importante mantener la calidad de los mismos. Por tanto, es importante identificar los indicadores clave y niveles crítico del funcionamiento normal de los diferentes tipos de suelo (Arshad & Martin 2002). La calidad de los suelos en todo el mundo se ha visto afectada de forma adversa tanto en sus propiedades físicas como químicas y biológicas. Esto ha tenido efectos en la disminución de la producción agrícola (Arshad & Martin 2002; Steer, 1998). La actividad agrícola intensa es uno de los factores que más han afectado a la modificación de la cubierta terrestre y la calidad de los suelos, especialmente en los últimos 30 años (Lambin et al., 2000).

2.3. Problemas de organismos fitopatógenos en los cultivos

2.3.1. Impacto de microorganismos fitopatógenos en los cultivos

Las enfermedades en las plantas a consecuencia de los microorganismos constituyen un punto clave en la producción de alimentos, pues la producción agrícola se verá a adversamente afectada (Cruz-Quiroz et al., 2011, Tarkowski & Vereecke, 2014). Las pérdidas por agentes fitopatógenos han ocasionado mermas en cultivos entre un 13 a 20% a nivel mundial (Pandya et al., 2011). Las enfermedades en las plantas ocasionadas por bacterias, hongos u otros organismos, han impactado el rendimiento y causado hambrunas masivas a lo largo de la historia (Tarkowski & Vereecke, 2014; Fisher et al., 2012; Jackson et al., 2011). Los principales microorganismos transmitidos por el suelo y que mayor pérdida causan a los cultivos son los hongos. Entre éstos destacan los siguientes géneros de fitopatógenos: *Botrytis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. Estos hongos no sólo causan problemas por la afección de los cultivos, también por las pérdidas ocasionadas durante almacenamiento de los productos agrícolas ya cosechados (Pandya et al., 2011). Para paliar estos problemas, se utilizan diversas técnicas de control químico y biológico de enfermedades y plagas

2.3.2. Control químico y biológico

Las plantas disponen de diversos mecanismos para luchar contra el ataque de plagas y enfermedades. Una de las primeras líneas de defensa de las plantas es la barrera física constituida por la cutícula y epidermis. En caso de que ésta fallara, comienza una segunda línea de defensa, de tipo bioquímico, en la cual interviene la producción de metabolitos secundarios que funcionan como repelentes o sustancias tóxicas para algunos de los organismos causantes de esas plagas o enfermedades, por ejemplo, cafeína, mentol, nicotina y capsaicina (Spence et al., 2012). Sin embargo, muchos organismos han co-evolucionado siendo capaces de burlar estas medidas de defensa de las plantas. De ahí que se empleen algunos productos para atacar a los organismos que afectan estas plantas y por tanto así evitar pérdidas económicas.

Una de las medidas básicas para atajar el problema de microorganismos fitopatógenos es el control químico. El control químico es una medida efectiva, pero a corto plazo y además presenta los mismos problemas que los fertilizantes químicos de los que ya hemos hablado como: la acumulación de los residuos químicos y sus serios problemas a nivel ecológico y de salud humana (Pandya et al., 2011; Berg, 2009). Se ha debatido recientemente su uso por la preocupación que originan los problemas asociados a los residuos de estas sustancias no sólo para el ambiente sino

también para la salud pública. Además, los elevados costes de estos productos originan que para muchos países en vías en desarrollo o agricultores particulares le es difícil costear dichos tratamientos. Finalmente, hay que tener en cuenta que el problema de los organismos que afectan adversamente a los cultivos no es algo que con añadir los agentes químicos una sola vez se solucione, haciéndose necesaria la aplicación de estos productos fitosanitarios de forma periódica para evitar la reaparición del organismo fitopatógeno (Pandya et al., 2011) y el uso constante, abusivo y/o indiscriminado termina ocasionando que estos organismos patógenos generen resistencias, incrementando la necesidad de emplear nuevos productos (Ilyas & Bano, 2012). En resumen, la utilización de agentes de control químico ocasiona problemas de resistencia de las plagas a los productos fitosanitarios disponibles, altos costes económicos de producción para el agricultor, acumulación de sustancias químicas peligrosas en las cadenas alimentarias, contaminación ambiental, pérdida de biodiversidad y riesgos para la salud humana (Bale et al., 2008).

Expuesta toda la problemática del uso de agentes químicos contra organismos fitopatógenos, hay que destacar que existe una alternativa que puede evitar la mayoría de los problemas que ocasiona el control químico. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés) define este tipo como productos bioplaguicidas, los cuales son pesticidas derivados de materiales naturales como animales, plantas, bacterias u hongos (Bale et al., 2008; Ilyas & Bano, 2012). El control biológico reduce la plaga en lugar de erradicar el 100%, manteniendo la densidad poblacional de la plaga muy baja y controlada, de modo que el agroecosistema se puede mantener en ese equilibrio durante largos periodos de tiempo (Bale et al., 2008). El primer registro histórico de control biológico data de 300 d. C., cuando se utilizaron hormigas para controlar plagas en los huertos de cítricos (Bale et al., 2008).

En este sentido el control biológico no presenta los riesgos mayores que muestran los agentes químicos, además estos microorganismos tienen que ser eficaces y potentes con el fin de reducir los daños y evitar las pérdidas económicas (Cruz-Quiroz et al., 2011). Entre los mecanismos de biocontrol destaca en primer lugar la antibiosis, basada en la capacidad de algunos microorganismos de producir una amplia gama de antibióticos. Por ejemplo, algunas especies de los géneros de *Burkholderia* y *Pseudomonas* son capaces de producir pirrolnitrina, la cual tiene capacidad de inhibir algunos microorganismos fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Verticillium dahliae* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Ilyas & Bano, 2012; Raaijmakers et al., 2002; Ligon et al., 2000). Otro mecanismo es la competencia, pues si un microorganismo es capaz de utilizar de manera más eficiente un elemento, se favorecerá su crecimiento pudiendo ser más competitivo, colonizando mejor y evitando la colonización de patógenos. Por ejemplo, en un suelo con deficiencia de hierro biodisponible, microorganismos productores de sideróforos serán capaces de aprovechar otras fuentes de hierro, siendo más competitivos en ese ambiente (Ilyas & Bano, 2012). Un tercer mecanismo es la resistencia sistémica inducida, ésta es mediada por las plantas, las cuales son estimuladas por algunas rizobacterias que colonizan el sistema radicular de las plantas y pueden generar respuestas defensivas en las plantas que las protegen frente a un posible ataque por patógenos. Este sistema es de amplio espectro, funciona contra bacterias, hongos e incluso algunos virus. Su activación depende de las rutas reguladas por el etileno y ácido jasmónico (Molina & Rodríguez, 2008). Por último, un cuarto mecanismo sería el parasitismo, donde un

Introducción

organismo se beneficia de otro, siendo este segundo perjudicado (Ilyas & Bano, 2012) y, en el caso de las plantas, se emplean organismos patógenos del organismo fitopatógeno a inhibir.

La relación coste-beneficio con la utilización del control biológico versus los químicos es una proporción 1:250 (Bale et al., 2008) y, de hecho, ya en 2005 se informó de que la venta de bioplaguicidas microbianos representaba el 1% de las ventas totales de los productos químicos agrícolas (Fravel, 2005; Ilyas & Bano, 2012). En este sentido, el año anterior (2004) se evaluó el mercado global para los productos relacionados con el biocontrol, determinando que el valor del mismo eran unos 588 millones de dólares, donde: el 43,5% de las ventas se realizaban en América del Norte (incluyendo a México), Europa tiene el 20,7%, Asia un 12,2%, Oceanía un 12,2%, América Latina (excluyendo a México) un 8,3% y África con 3,9%. (Bolckmans, 2008; Berg, 2009). (Berg, 2009; Thakore, 2006). La tabla 1 muestra una comparativa evaluando diversos aspectos referentes al control químico versus el control biológico.

Tabla 1. Diversos aspectos comparativos entre el control químico y el control biológico. Tabla obtenida y modificada de Bale et al., 2008.

Aspecto	Control Químico	Control Biológico
Número de ingredientes probados	> 3,5 millones	3000
Tasa de éxito	1:200000	1:20
Costo de desarrollo	180 millones de dólares	2 millones de dólares
Tiempo de desarrollo	10 años	10 años
Beneficio por unidad de dinero invertido	2.5 a 5	30
Riesgo de resistencia	Grande	Pequeña
Especificidad	Baja	Alta
Efectos secundarios perjudiciales	Muchos	Pocos

Un ejemplo de esto es la utilización del hongo *Trichoderma* spp como control biológico contra otros hongos y bacterias, el cual se conoce desde hace unos 70 años. Entre los antagonistas utilizados contra hongos fitopatógenos, el 90% de las cepas utilizadas pertenecen a cepas de *Trichoderma*. Este género se caracteriza por su capacidad reproductiva, supervivencia a condiciones desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes, eficiencia la promoción del crecimiento de las plantas y especialmente por su agresividad contra otros hongos fitopatógenos (Pandya et al., 2011; Misra y Prasad, 2003). El potencial de estudiar bien y conocer a fondo los mecanismos promotores del crecimiento vegetal y el potencial que estos puedan tener como agentes de biocontrol sirve para identificar y desarrollar estrategias para la producción de nuevos productos a fin de mejorar los rendimientos agrícolas. Otro ejemplo sería *Bacillus thuringiensis*,

el cual ya se comercializa como bioplaguicida para el control de insectos. La EPA tiene registrados más de 83 microorganismos como ingredientes activos para el control de plagas y enfermedades (Ilyas & Bano, 2012). Uno de los principales problemas a la hora de desarrollar biocontroles o biopesticidas son los obstáculos para registrar nuevas especies, ya que son procesos que consumen mucho tiempo y son muy costosos (Berg, 2009), siendo importante identificar que los mismos no son potenciales patógenos de humanos, ni que afecten al medio ambiente. Por tanto, en el desarrollo de productos para eliminar a potenciales patógenos humanos se evalúa el crecimiento a 37°C y se realizan ensayos de toxicidad y patogenicidad utilizando en primera instancia ensayos con *Caenorhabditis elegans* (Zachow et al., 2009; Berg, 2009). Algunos microorganismos utilizados y ya comercializados para el biocontrol se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Microorganismos utilizados comercialmente en biocontrol agrícola. Tabla obtenida y modificada de Berg, 2009.

Microorganismo	Nombre del Producto	Uso	Compañía
<i>Ampelomyces quisqualis</i> M-10	AC10 Biofungicide	Moho en manzanas, cucurbitáceas, uvas, ornamentales, fresas y tomates	Ecogen
<i>Bacillus subtilis</i> cepa GB03	Kodiak	Actúan contra <i>Rhizoctonia</i> y <i>Fusarium</i> spp	Gustafson, Bayer CropScience
<i>Bacillus pumilus</i> GB34	YieldShield	Patógenos fúngicos transmitidos por el suelo	Gustafson, Bayer CropScience
<i>Bacillus subtilis</i> GB03, otros <i>B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> y <i>B. megaterium</i>	Companion	Contra <i>Rhizoctonia</i> , <i>Pythium</i> , <i>Fusarium</i> y <i>Phytophthora</i>	Growth Products
<i>Coniothyrium minitans</i>	Contans WG, Intercept WG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>S. minor</i>	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Bioact WG	Nemátodos	Prophyta Biologischer Pflanzenschutz
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Rotex	<i>Heterobasidium annosum</i>	E~nema Biologischer Pflanzenschutz
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cedomon	En cebada y avena contra la: Raya de la hoja, mancha neta, <i>Fusarium</i> sp., “Spot blotch”, mancha foliar, etc.	BioAgri AB
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	BlightBan A506	<i>Erwinia amylovora</i> y bacterias productoras de “russet” en almendra, manzana, melocotón y pera	NuFarm
<i>Pseudomonas</i> spp	Proradix	<i>Rhizoctonia solani</i>	Sourcon Padena

Microorganismo	Nombre del Producto	Uso	Compañía
<i>Streptomyces griseoviridis</i> K61	Mycostop	<i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Kemira Agro Oy
<i>Thichoderma harzianum</i> T22	RootShield, PlantShield T22, Planter box	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium</i> spp.	Bioworks

Finalmente, las comunidades microbianas presentes en los suelos mejoran la calidad de los mismos, ya sea por su capacidad descomponedora de materia orgánica, haciendo biodisponibles algunos elementos, por su capacidad de fijación de nitrógeno, por la producción de fitohormonas, etc (Tarkowski & Verecke, 2014; Khan et al., 2009). Por consiguiente, los microambientes presentes en la rizosfera asociados a las plantas muestran un buen potencial para la identificación de las cepas con potencial para el biocontrol, pues, se han probado que del total de aislamientos microbianos en hábitat asociados con plantas entre 1% al 35% pueden mostrar capacidad antagonista contra algunos patógenos (Berg et al., 2002, 2005; Ilyas & Bano, 2012).

3. Agricultura sostenible y eficiente

3.1. Técnicas eco-amigables

Una vez expuestos los problemas que enfrenta la agricultura actual, también existe una serie de técnicas que se han utilizado durante muchos años las cuales han ayudado a la conservación del ambiente, generando una agricultura más sostenible. Entre ellas destaca la rotación de cultivos, los cultivos intercalados (asociación de cultivos) y el barbecho. En general, estas técnicas ayudan a agotar menos los nutrientes del suelo o simplemente a dejar que éstos se recuperen, además de reducir la incidencia de plagas. De esta forma se evita o se reduce la utilización de agentes químicos, como los fertilizantes químicos o agentes de control químico.

En primer lugar, analizaremos la implicación de la rotación de cultivos y sus beneficios para la agricultura sostenible. La rotación de cultivos se define como una práctica agrícola donde se cultivan diferentes especies de plantas de forma secuencial en una misma tierra. Esto ocurre en un periodo de ciclo donde primero tenemos el primer cultivo y, una vez cosechado, se remueve todo el suelo y en esa misma tierra se cultiva otra planta; una vez que ésta produce se vuelve a remover el suelo y se cultiva la primera planta que teníamos o un tercer cultivo. Hay que destacar que la sostenibilidad a largo tiempo sólo será garantizada si la elección de los cultivos implicados es la correcta, donde éstos no quieran los mismos nutrientes en cantidades grandes (Dury et al., 2012). La rotación de cultivos es importante para la agricultura integrada y además está en contradicción con el sistema de monocultivo, por tanto, se trata de una solución sostenible para mantener la productividad de los suelos al tiempo que se minimizan los impactos ambientales de la actividad agrícola (Leteinturier et al., 2006; Dury et al., 2012). Otro beneficio importante es que logra romper con los ciclos de las malas hierbas y las enfermedades que afectan a estos cultivos agrícolas, asimismo logra reducir los insumos externos (Dury et al., 2012).

Un estudio realizado por González-Chávez y colaboradores (2010) analizó las propiedades biológicas de los suelos no labrados y seguidos de rotación sorgo-soja-trigo en Texas (Estados Unidos). Dicho estudio muestra un incremento de la riqueza y biodiversidad de las comunidades microbianas, además de un aumento de la retención de carbono en el suelo y nitrógeno total de los mismos. Probándose la importancia de este proceso junto con la labranza, además de la importancia de las comunidades microbianas en la retención del carbono y el enriquecimiento del nitrógeno (González-Chávez et al., 2010). Otro estudio similar realizado por Yin y colaboradores (2010) realizado en Kansas (Estados Unidos), utilizó la pirosecuenciación para estudiar el efecto de la rotación de cultivos (trigo-soja) determinando que algunos grupos microbianos son más frecuentes cuando se realiza la rotación versus un único cultivo, por tanto, determinando, cambios en los taxones bacterianos. En este sentido, las prácticas agrícolas como la rotación de cultivos pueden prevenir problemas como los patógenos con un rango de huéspedes limitado (Yin et al., 2010).

Recapitulando, la rotación de cultivos es un método antiguo que se utiliza para conservar la productividad de los suelos y controlar plagas (bacterias, hongos, nemátodos, entre otros). Este sistema de alternar diferentes cultivos de forma secuencial tiene que seguir un esquema prediseñado, y sobre todo teniendo en cuenta la funcionalidad de los cultivos seleccionados. De este modo, en comparación con los monocultivos, no se agotan los nutrientes del suelo y mejora la calidad de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, pues las diferentes plantas poseen diferentes requisitos nutricionales. Una de las rotaciones más comunes es la utilización de leguminosas ya que ayudan a incorporar nitrógeno al suelo mediante la relación simbiótica con algunas bacterias como las pertenecientes al género *Rhizobium*.

Otra práctica agrícola que reduce los efectos adversos del monocultivo es el cultivo intercalado o intercultivo. Ésta es una práctica muy antigua y extendida utilizada en muchas áreas del mundo siendo de bajo insumo. En países desarrollados se está generando un interés por volver a este tipo de práctica de intercultivo con el objetivo de crear conciencia y evitar la degradación del medio ambiente. Los sistemas de intercultivo que emplean el uso de cereales con leguminosas tienden a presentar mayores ventajas, aumentando el rendimiento total, mejorando la eficiencia y la conservación del uso de tierras, estabilizando el rendimiento, mejorando la utilización de agua y nutrientes, además facilita el control de plagas y malezas (Anil et al., 1998; Banik et al., 2006; Dhima et al., 2007; Javanmard et al., 2009; Lithourgidis et al., 2011; Vasilakoglou et al., 2008).

El intercultivo de gramíneas y legumbres es común en los ecosistemas naturales, pero no se tiende a utilizar en países desarrollados, excepto en algunos cultivos destinados a la alimentación animal. El cultivo intercalado utiliza de forma más eficiente los recursos ambientales, por consiguiente, presentan mayores rendimientos que los monocultivos. Esto es debido a que las especies intercaladas no compiten por el mismo nicho de nutrientes presentes en el suelo, de esta manera se aprovechan los recursos de manera complementaria. Por ejemplo, si analizamos un cultivo intercalado cereales-leguminosas, los cereales adquirirán ese el nitrógeno inorgánico presente en el suelo que las leguminosas adquirirán mediante la fijación simbiótica (Lithourgidis et al., 2011).

El barbecho es otra técnica donde se deja la tierra sin cultivar durante un tiempo prolongado o durante varios ciclos. Esto favorece la recuperación de los suelos, ayuda a almacenar la materia orgánica y recuperar la humedad. Tanto la rotación de cultivos como los cultivos intercalados y el barbecho son técnicas agrícolas las cuales ayudan a mejorar las condiciones de los suelos y no los desgastan, como ocurre en el monocultivo intenso. Además, estas prácticas propician la reducción en el uso de fertilizantes o agentes de control químicos.

3.2. Interacción planta-microorganismo y su beneficio mutualista

Como ya hemos explicado, los efectos adversos que tienen los productos químicos en la agricultura, y ya hemos comenzado a exponer algunas de las prácticas agrícolas más sostenibles, ahora nos centraremos en la interacción que puede tener las plantas con los microorganismos, específicamente de su beneficio mutualista. La interacción en el que puedan tener los microorganismos del suelo con el sistema radicular influirá ineludiblemente con los diversos procesos de la planta como lo son fotosíntesis, respiración, absorción de agua, ciclos de nutrientes, entre otros (Spence et al., 2012). Por consiguiente, las interacciones que pueda tener la planta con los demás organismos vivos van a influir en el crecimiento, productividad y defensa de las plantas y la presencia de un determinado tipo de cultivo, va a influir directamente en la composición de las poblaciones microbianas de la rizosfera (García-Fraile et al., 2015). Además, las comunidades microbianas del suelo que pueden interactuar con el cultivo, dependen de diversos factores de dicho suelo, como su composición fisicoquímica, y su contenido en agua y nutrientes (Spence et al., 2012).

Las comunidades microbianas beneficiosas que habitan la rizosfera las cuales tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, se conocen como PGPR, por las siglas en inglés de “Plant Growth Promoting Rhizobacteria”. Se ha demostrado que las plantas secretan sustancias químicas capaces de atraer bacterias beneficiosas por quimiotaxis y esta interacción entre las bacterias y la planta propician a que se promueva el crecimiento de las plantas y activa las defensas de las plantas contra patógenos aumentando su inmunidad (Spence et al., 2012; Rudrappa et al., 2008a,b). Por consiguiente, resulta imprescindible que se comprendan las interacciones para mejorar los rendimientos agrícolas al optimizar la salud de las plantas, reducción o eliminación de fertilizantes, pesticidas, lo que repercute en una reducción de costos (Spence et al., 2012).

Este tipo de observación comenzó desde el siglo I a. C., cuando los agricultores notaron que en los campos de cultivos donde se había cultivado leguminosas tendían a ser más fértiles (esto era debido a la fijación simbiótica de nitrógeno). Los primeros estudios referente a la asociación entre leguminosas y bacterias datan de 1838 cuando Boussingaut anunció que las leguminosas podían utilizar el nitrógeno atmosférico. Para 1888 Hellriegel y Wilfarth demostraron que esa capacidad de fijación se desarrollaba en el interior de los nódulos. También en 1888 Beijerinck logró aislar la primera bacteria procedente de un nódulo de leguminosa la cual nombró *Bacillus radicícola*, que posteriormente fue reclasificada como *Rhizobium leguminosarum* (Frioni, 1990; Van Berkum et al., 1998; Wang et al., 2001). Por más de 100 años se ha utilizado *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* de forma comercial (Spence et al., 2012). Hoy día conocemos más detalladamente sobre este tipo de interacciones, sin embargo, es importante continuar identificando

los organismos o consorcios bacterianos que mejor se adapten a cada uno de los cultivos, con el fin de mejorar el rendimiento óptimo de estos últimos. Actualmente ya se comercializan este tipo de microorganismos, mejor conocidos como biofertilizantes, con el fin de mejorar algunos cultivos.

Tabla 3. Listado de algunos biofertilizantes comerciales. Tabla obtenida y modificada de García-Fraile et al., 2017.

Compañía	Biofertilizante	Composición
Novozymes	Nitragin Gold [®]	Rhizobia
	Cell-Tech [®]	
	TagTeam [®]	Rhizobia y <i>Penicillium bilaii</i>
Loveland Products, Inc	Accomplish [®]	PGPR, enzimas, ácidos orgánicos, quelantes
BASF Canada Inc	Nodulator [®]	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	Nodulator [®] N/T	<i>Bacillus subtilis</i> MBI 600 y <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	Nodulator [®] PRO	<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	Nodulator [®] XL	<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovar <i>viciae</i> 1435
Brett-Young Seeds	Bioboost [®]	<i>Delftia acidovorans</i>
		<i>Delftia acidovorans</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.
EVL Inc.	EVL coating [®]	Consortios PGPR
LabioFam	Nitrofix [®]	<i>Azospirillum</i> sp.
Instituto de Fosfato Biológico	Bioativo [®]	Consortio PGPR
Symborg	VitaSoil [®]	Consortio PGPR
JSC “Industrial Innovations”	Azotobacterin [®]	<i>Azospirillum brasilense</i> B-4485
Tokachi Federation of Agric. Coop. (TFAC)	Mamezo [®]	Rhizobia en turba
	R-Processing Seeds [®]	Semilla de leguminosa cubierta de rhizobia
	Hyper Coating Seeds [®]	Semillas de leguminosas de hierba cubiertas con rhizobia

Compañía	Biofertilizante	Composición
Biomax	Life [®]	Consorcio PGPR
	BioMix [®]	Consorcio PGPR
	Biozink [®]	Consorcio PGPR
	Biodine	Consorcio PGPR
Biosum Technologies	Rhizosum N	<i>Azotobacter vinelandii</i>
	Rhizosum P	<i>Bacillus megaterium</i>
	Rhizosum K	<i>Frateriuria aurantia</i>
	Rhizosum Micros	<i>Azospirillum</i>
	Rhizosum Aqua	Consorcio PGPR

Algunos de estos productos son aplicados en la semilla. Posteriormente, cuando las semillas son plantadas esas bacterias inoculadas deben ser capaces de competir con los microorganismos nativos del suelo y lograr colonizar el sistema radicular, a fin de promover el crecimiento de las plantas. Entre los géneros más utilizados como biofertilizantes están *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Rhizobium* (Spence et al., 2012; Bloemberg y Lugtenberg 2001). Cabe señalar que, aunque nos centremos en bacterias, también existen hongos (micorrizas) los cuales promueven el crecimiento de las plantas. La mayoría de los PGPR identificados se unen directamente a la raíz, facilitando la comunicación bacteria-planta, algunos de ellos son endófitos (entran dentro de las plantas), de hecho, algunas de estas bacterias se han encontrado viviendo en los espacios intercelulares (espacios entre las células).

La forma de acción de estos microorganismos para mejorar el rendimiento de los cultivos funciona básicamente de 3 formas: actúan como biofertilizantes (incrementando y haciendo biodisponibles algunos de los elementos y nutrientes presentes en el suelo para mejor adquisición para las plantas), fitoestimuladores (producción de fitohormonas por parte de las bacterias que fomentan el crecimiento vegetal) y/o control biológico (control de enfermedades mediante la producción de antibióticos o metabolitos secundarios) (Spence et al., 2012; Vessey 2003). Además, algunos sirven como rizadorremediadores (capaces de remover contaminantes orgánicos) (Ilyas & Bano, 2012).

En el caso de actuar como biofertilizantes, las comunidades microbianas median en los procesos biogeoquímicos básicos de los ecosistemas, entre los que cabe mencionar: mineralización del carbono para CO₂, ciclo de nitrógeno y muchos de los procesos en la producción y consumo de elementos trazas. El intercambio genético microbiano juega un papel importante en los procesos

involucrados en ecosistemas, mejorando la “transferencia” de nutrientes (Ilyas & Bano, 2012). Las comunidades microbianas regulan la productividad de las plantas, su principal efecto se observa en ecosistemas pobres en nutrientes donde ellos son los protagonistas ya que suplen principalmente los nutrientes que actúan como elementos imprescindibles para el crecimiento de las plantas como el nitrógeno y fósforo. Pues, en este tipo de suelo, hasta el 90% del nitrógeno y el fósforo procede de los microorganismos; tanto de los hongos micorrícicos como bacterias (incluidas las fijadoras de nitrógeno) (Ilyas & Bano, 2012).

Además de actuar como promotores del crecimiento, algunos microorganismos pueden también afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas, por ejemplo, a parte de los microorganismos fitopatógenos, también existen los que transforman algunos nutrientes en formas inaccesibles para las plantas (Heijden et al., 2008; Ilyas & Bano, 2012;). Cabe destacar que las comunidades microbianas de los suelos son dinámicas y las mismas pueden cambiar, donde se pueden ver afectadas por diversos factores como: cantidad de alimento, temperatura, humedad, oxígeno, agua, entre otros factores. Esto puede provocar el aumento de algunas poblaciones, convirtiéndose en dominantes sobre otras (Ilyas & Bano, 2012; Muntean et al., 2004). Recapitulando, los microorganismos presentes en el suelo presentan una gran importancia en la sostenibilidad de los cultivos agrícolas, en procesos que van desde la descomposición de materia orgánica, la participación en los diferentes ciclos de reciclaje de nutrientes y el mantenimiento de la estructura granular del suelo (González-Chávez et al., 2010). Por lo tanto, resulta un lugar clave en la búsqueda de nuevos prospectos microbianos con el fin de mejorar los diversos cultivos agrícolas.

4. Microorganismos y mecanismos promotores del crecimiento vegetal

4.1. Fijación de Nitrógeno

4.1.1. Fijación de nitrógeno en vida libre

Para entender la funcionalidad específica de los microorganismos vamos a identificar cada una de sus actividades con potencial de promover el crecimiento vegetal de forma individual. En primer lugar, analizaremos la fijación de nitrógeno en vida libre.

El nitrógeno es un elemento indispensable para la vida, por consiguiente, tiene que estar biodisponible para todos los seres vivos. Existen algunas bacterias, conocidas como bacterias diazotrofas, que son capaces transformar el nitrógeno molecular o dinitrógeno (N_2) de la atmósfera en formas de nitrógeno asimilables, como óxidos de nitrógeno o amonio, que pueden incorporarse a la biosfera. Las bacterias capaces de realizar estos procesos lo hacen para satisfacer sus propias necesidades de este elemento, sin embargo, el excedente puede ser utilizado por las plantas u otros organismos (Ilyas & Bano, 2012).

Existen muchas bacterias diazotrofas que habitan en los suelos que son capaces de fijar niveles significativos de nitrógeno sin la necesidad interactuar de forma directa con otros seres vivos. Algunos ejemplos de este tipo de bacterias incluyen especies de los siguientes géneros: *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Klebsiella* (Wagner, 2012).

Introducción

La enzima clave en el proceso de fijación de nitrógeno es la nitrogenasa (enzima responsable de la reducción de N₂ a amonio). Cabe destacar que esta enzima es inhibida por la presencia del oxígeno, por lo tanto, estos microorganismos se deben comportar como anaerobios o microaerófilos al momento que estén en el proceso de fijación de nitrógeno. Las contribuciones globales de fijación de nitrógeno de microorganismos en vida libre se consideran menores que las de aquellas bacterias capaces de fijar el nitrógeno mediante simbiosis con plantas (Reed et al., 2011). Estas diferencias las podemos observar en la tabla 4, donde observamos la contribución en la fijación de nitrógeno entre la vida libre versus la simbiótica (interacción biológica estrecha entre una planta y una bacteria). Por ejemplo, un estudio Australia determinó los sistemas intensivos de rotación de trigo contribuyó a una fijación de nitrógeno vida libre con 20 kg por hectárea por año (30-50% de las necesidades totales). Además, el mantenimiento del rastrojo detenido y la labranza reducida lograron proporcionar un alto contenido de carbono, optimizando la fijación en vida libre de estos microorganismos (Wagner, 2012; Vadakattu & Paterson 2006).

Tabla 4. Estimaciones biométricas de las tasas de fijación de N₂ en vida libre y simbiótica en diferentes biomas. Tabla obtenida y modificada de Reed et al., 2011.

Bioma	Rango en la tasa de fijación en vida libre de N ₂ (kg N/ha/año)	Rango en la tasa de fijación en simbiosis N ₂ (kg N/ha/año)
Tundra húmeda y tundra alpina	0,4 - 3,0	1,0 - 4,9
Bosque y bosques boreal	0,3 - 3,8	0,3 - 6,6
Bosques templados	0,01 - 12	1 - 160
Pastizales templados	0,1 - 21	0,1 - 10
Sabana tropical	3 - 30	3 - 90
Bosque perenne tropical	0,1 - 60	5,5 - 16
Planicie inundable tropical	4,1 - 12	14 - 28,5
Bosque caducifolio tropical	3,3	7,5 - 30
Matorrales mediterránea	1,0	0,1 - 10
Desierto	0,01 - 13	0,7 - 29,5

Uno de los géneros de bacterias más importantes en cuando a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico en vida libre es *Azospirillum*. *Azospirillum* es un género cuyas bacterias poseen forma de espiral capaz de colonizar el área radicular y fijar entre 20 a 40kg/ha de nitrógeno. Las principales especies de *Azospirillum* con capacidad para fijar nitrógeno atmosférico son: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense* y *A. seropedicae*. Estas especies de bacterias suelen aparecer en suelos ácidos. Cabe mencionar que *A. halopreferans* se encuentra en suelos salinos (Sayyed et al., 2012). En la tabla 5 se muestra el aumento en rendimiento de diferentes cereales al ser inoculados con *Azospirillum*.

Otro género de bacterias diazotrofas relevante es *Azotobacter*. *Azotobacter* es un género presente en diversos suelos, por ejemplo, *A. indicum* habita en suelos ácidos. Otras especies son *A. chroococum*, *A. vinelandi*, *A. beijerinckii*, *A. insignis*, *A. macrocytogenes*, y *A. nitrocaptans*.

Este género se puede utilizar para cereales, vegetales, caña de azúcar, entre otros (Sayyed et al., 2012). *A. chroococum* es comúnmente utilizado en suelos neutros o alcalinos. Otra bacteria capaz de encontrarse en diferentes partes de la caña de azúcar y fijar nitrógeno es *Acetobacter diazotrophicus*. La misma es capaz de fijar 15kg N/ha/año. Por tanto, es muy común utilizarla en cultivos de caña. Además, es capaz de tolerar altas concentraciones de sacarosa, tolera pH bajo y es capaz de secretar hormonas de crecimiento vegetal, como el ácido indol acético. Rendimientos en cultivos de caña de azúcar inoculados con *Azotobacter* se puede observar en la tabla 5, donde se aprecia cómo las plantas inoculadas, mostraron un rendimiento mayor. Otro importante género de bacterias fijadoras de nitrógeno es *Herbaspirillum*, también asociada a la caña de azúcar y capaz de producir hormonas que favorecen el crecimiento vegetal (Sayyed et al., 2012).

Tabla 5. Rendimientos de plantas inoculadas con bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre. Tabla obtenida y modificada de Sayyed et al., 2012.

Inoculante	Planta	Rendimiento (t/ha)	
		Control	Inoculado
<i>Azotobacter</i>	Caña de azúcar	149,61	175,58
	Arroz	3,93	4,54
	Trigo	4,94	5,75
<i>Azospirillum</i>	Mijo perla	2,62	2,79
	Sorgo	4,46	5,38
	Maíz	3,98	7,20

4.1.2. Fijación simbiótica de nitrógeno

La mayor parte de nitrógeno fijado por los microorganismos proviene principalmente de aquellos que lo fijan mediante interacciones simbióticas con plantas, donde se estima aproximadamente un aporte de nitrógeno a la biosfera de unos 200 millones de toneladas anualmente (Ferguson et al., 2010; Graham & Vance 2003, Peoples et al., 2009). Por consiguiente, es imprescindible entender este proceso con el fin de mejorar e identificar inoculantes capaces de aumentar los rendimientos agrícolas de forma más eficiente y ecológicamente sostenible. Como relación simbiótica que es, dicha interacción resulta beneficiosa tanto para la bacteria como para la planta, sin embargo, en un proceso altamente regulado donde se desarrolla un diálogo molecular entre ambos. En este sentido antes de que la bacteria ingrese en el tejido vegetal se necesita un reconocimiento de la misma mediante una serie de eventos ordenados (Oldroyd et al., 2011).

A pesar de que el nitrógeno atmosférico (N_2) comprende la mayor parte del aire que nos rodea su disponibilidad en plantas es nula, sin embargo, los microorganismos pueden convertirla en forma más accesibles para la planta, generalmente informa de nitratos y amoníaco (Ferguson et al., 2010; Oldroyd et al., 2011). Pues, la carencia de nitrógeno restringe el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta relación simbiótica involucra principalmente los microorganismos denominados colectivamente como rizobios y las plantas con las cuales realiza dicha simbiosis son las denominadas leguminosas. En este sentido las plantas leguminosas aportan buenas cantidades de nitrógeno suelo, además cabe destacar es sus semillas son ricas en proteínas, pues gracias a esta

Introducción

relación simbiótica el nitrógeno es un factor limitante para ellas. Por lo tanto, las semillas de las leguminosas representan una fuente importante proteica para la nutrición humana (Oldroyd et al., 2011). A rasgos generales los rizobios invaden las raíces de las plantas leguminosas que posteriormente se lleva a cabo un desarrollo de una estructura llamada nódulo. Esta interacción es importante en la práctica ya que rotar cultivos con especies de leguminosas puede ayudar a mejorar la composición de nutrientes en el suelo.

El proceso comienza cuando la planta produce un exudado el cual está compuesto de flavonoides fenólicos a través de las raíces hacia la rizosfera (figura 4). Estos flavonoides atraen a las bacterias hacia la zona de la raíz. Esos componentes son muy específicos para rizobios concretos, de modo que unos pocos rizobios pueden interactuar con una o unas pocas leguminosas, aunque cabe destacar que existen rizobios con un alto rango de hospedador (Ferguson et al., 2010). Posteriormente, los flavonoides activan la expresión de ciertos genes en los rizobios (genes *nod*), lo que conlleva a la producción y secreción de lipo-quitos oligosacáridos, también conocidos como factores de nodulación (NF, por sus siglas en inglés). Los NF poseen una cadena principal de oligosacáridos de unidades de N-acetil-D-glucosamina con un grupo acilo graso unido a un azúcar graso no reductor, los diferentes sustituyentes unidos al oligosacárido son los que le otorgan la especificidad (Ferguson et al., 2010). Si existe compatibilidad con el correspondiente NF, es suficiente para desencadenar el desarrollo de los nódulos en la planta.

La principal vía de entrada de los rizobios en la planta son los pelos radiculares, se cree porque las paredes celulares de los pelos son más delgadas y menos reticuladas, permitiendo la reorganización de los microtubulos adyacentes, y por tanto, una penetración de los rizobios (Oldroyd et al., 2013) (figura 4). Este proceso ocasiona la deformación del pelo en 6-8 horas conocida como “hair curling” y se promueve las divisiones celulares corticales (Ferguson et al., 2010). Las bacterias atrapadas en la curvatura del pelo radical entran mediante la degradación de poligalacturonasas, pectininasas, celulasas, hemicelulasas bacterianas (Muñoz et al., 1998; Oldroyd et al., 2011; Robledo et al., 2008; Robledo et al., 2011). Cabe destacar que las bacterias no tienen que entrar exclusivamente por el pelo, también lo pueden hacer por una grieta en el tejido epidérmico de la raíz. Los rizobios que entran en el tejido vegetal tienen concentraciones altas de NF y enzimas que degradan la pared celular. El crecimiento de la colonia ingresando en la raíz genera una presión que “empuja” hacia adelante, generando una especie de canal de infección lleno de bacteria (figura 4) (Ferguson et al., 2010). Un canal de infección es una estructura tubular por donde discurren y se dividen en su interior (Rae et al., 1992).

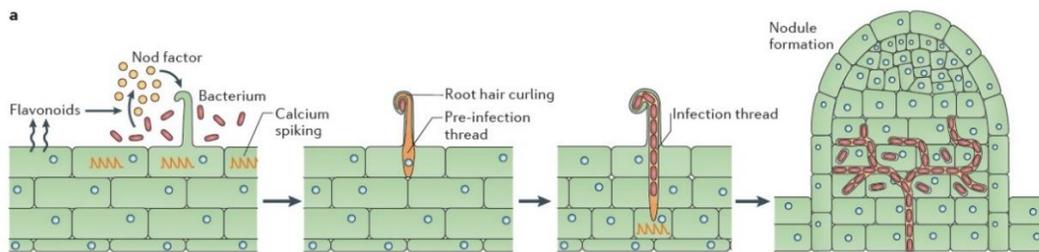


Figura 4. Eventos en la interacción simbiótica rizobio-leguminosa. Imagen obtenida y adaptada de Oldroyd et al., 2013

Los rizobios que van avanzando a lo largo del canal de infección expresan los factores de nodulación NodC que conducen a la activación de la mitosis en las células corticales de las raíces. Posteriormente, esto resulta en el desarrollo de un “primordium” del nódulo. Su desarrollo está controlado por gradientes de hormonas como el etileno (Ferguson et al., 2010; Lohar et al., 2009), como consecuencia los nódulos se desarrollan cerca de las células radiales del xilema y lejos del floema. Las bacterias son liberadas cerca de la punta de crecimiento del canal de infección en el citoplasma de la célula huésped. Éste es un proceso parecido a la endocitosis, ya que la bacteria está rodeada por una membrana proveniente de la membrana celular vegetal. La bacteria con la cubierta recibe el nombre de peribacteroide. Las bacterias con la envoltura continúan dividiéndose dentro de las células vegetales, antes de diferenciarse en bacteroides (Ferguson et al., 2010).

Posteriormente estos bacteriodes son capaces de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) en amoníaco, el cual es asimilado por la planta. En la figura 5 podemos visualizar la reacción química de la fijación de nitrógeno y el costo energético de la misma. La figura 6 muestra la relación directa entre el bacteroide y la planta. En la misma se observa que gracias al proceso de fotosíntesis realizado por las plantas se beneficia al bacteroide al darle azúcares y ácidos orgánicos, la cual mediante procesos enzimáticos son transformados en succinato-malato-fumarato de donde se producen electrones, y es de la cadena de transporte de electrones donde proviene la principal cantidad de ATP, pues esta reacción requiere entre 16 a 24 ATP. También se observa el secuestro del oxígeno por parte de la leghemoglobina. La síntesis de leghemoglobina es capaz de secuestrar el oxígeno para que no llegue al complejo de fijación de nitrógeno ya que el oxígeno inhibe la fijación (Udvardi & Poole, 2013). Por otro lado, del proceso de fijación, el N_2 se convierte en amoníaco donde después de varios pasos metabólicos se producen aminoácidos que son utilizados por la planta.

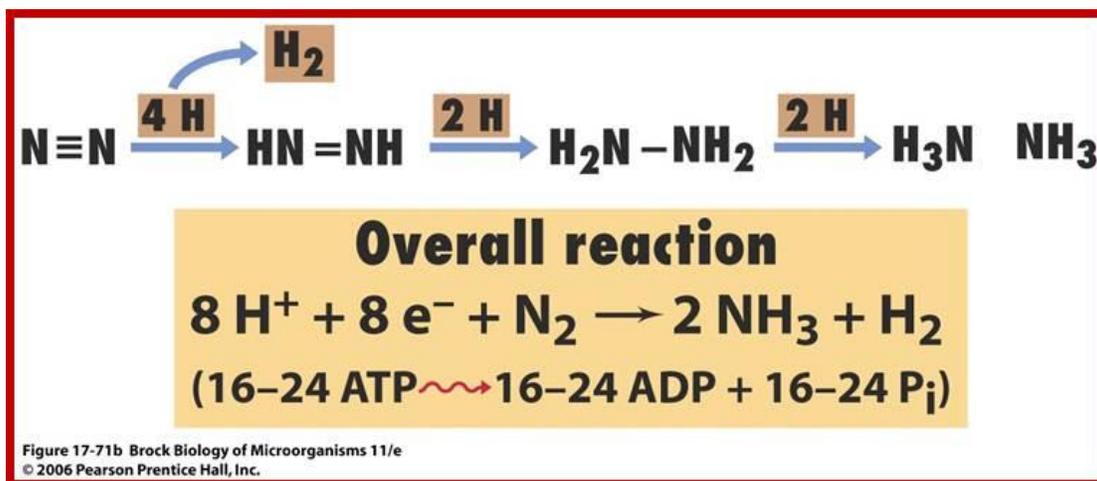


Figura 5. Reacción química de la fijación de nitrógeno. Imagen obtenida de Madigan et al., 2006.

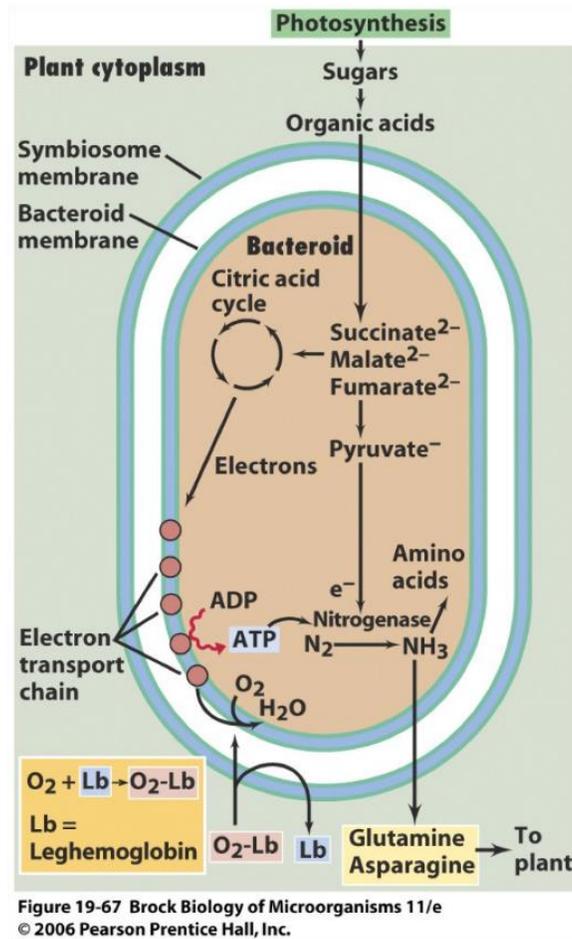


Figura 6. Estructura de un bacteroide y su relación con las plantas. Imagen obtenida de Madigan et al., 2006.

La fijación comienza con activación de los genes *nif* y *fix* que codifican para un complejo de nitrogenasas y una nitrógeno reductasa (Fischer, 1994; Udvardi & Poole, 2013). La planta es capaz de transformarlo a glutamina, la cual es convertida en glutamato (Ferguson et al., 2010). Entre el nódulo y las células vecinas ocurre un intercambio de nutrientes y varios compuestos, incluido el nitrógeno (glutamina), algo importante e imprescindible para mantener la simbiosis.

Como se ha mencionado, la fijación de nitrógeno se lleva a cabo en una estructura denominada nódulo. Hay que destacar que existen dos tipos principales de nódulos en las leguminosas: determinado e indeterminado. El tipo de nódulo estará determinado por el tipo de leguminosa. Independientemente del tipo de nódulo, el proceso de infección es bastante similar y las diferencias se comienzan a observar tras del desarrollo del “primordium” nodular, con las primeras divisiones celulares, el mantenimiento de la región meristemática y la forma de los nódulos maduros. En el caso de los nódulos indeterminados, las primeras divisiones celulares se desarrollan anticlinalmente en la corteza interna, posteriormente son seguidas de divisiones periclinales en la endodermis y periciclo; esto conduce a la formación de nódulo primordial. En el caso de los nódulos determinados, la zona meristemática es más persistente, lo que produce que los nódulos tengan una forma cilíndrica. En estos nódulos determinados se producen células nuevas de

manera continua en la zona meristemática, las cuales se infectan de manera paulatina con los rizobios. Este tipo de nódulo contiene una población heterogénea de bacteroides debido a la actividad continua de división celular en el nódulo. Esto hace que sea fácil identificar las diversas zonas presentes en los nódulos indeterminados como: zona meristemática (producción de nuevas células), zona de invasión (área donde llegan los rizobios), zona de fijación (lugar donde se fija el N_2) y zona de senescencia (área donde ocurre la degradación de las células vegetales y bacterianas) (Udvardi & Poole, 2013). Esto genera un gradiente de estados de desarrollo según el nódulo continúa alargándose, como se observan la figura 7. Cabe destacar que los dos tipos de nódulos muestran diferencias en el sistema vascular: en el caso de los nódulos indeterminados tienden a tener menos ramificaciones que los nódulos determinados (Ferguson et al., 2010). La tabla 6 muestra diferencias adicionales entre los nódulos indeterminados y determinados (Ferguson et al., 2010).

Tabla 6: Diferencias entre nódulos indeterminados y determinados. Tabla obtenida y modificada de Ferguson et al., 2010.

Característica	Nódulos Indeterminados	Nódulos Determinados
Sitio de divisiones celulares iniciales (ambas junto al xilema)	Corteza de la raíz interna	Corteza externa o del medio,
Tipo de meristemo	Persistente	No persistente
Forma de nódulo	Cilíndrico/ha ramificado	Esférico
Canal infección	Amplio	Estrecho
Células infectadas	Altamente vacuoladas	Vacuulación mínima
Forma mayor del Bacteroide	Amplia, ramificada, baja viabilidad; uno por simbiosoma	Tamaño de varilla normal, alta viabilidad; múltiples por simbiosoma
Región geográfica originaria de la planta	Regiones templadas	Regiones Subtropical y tropical

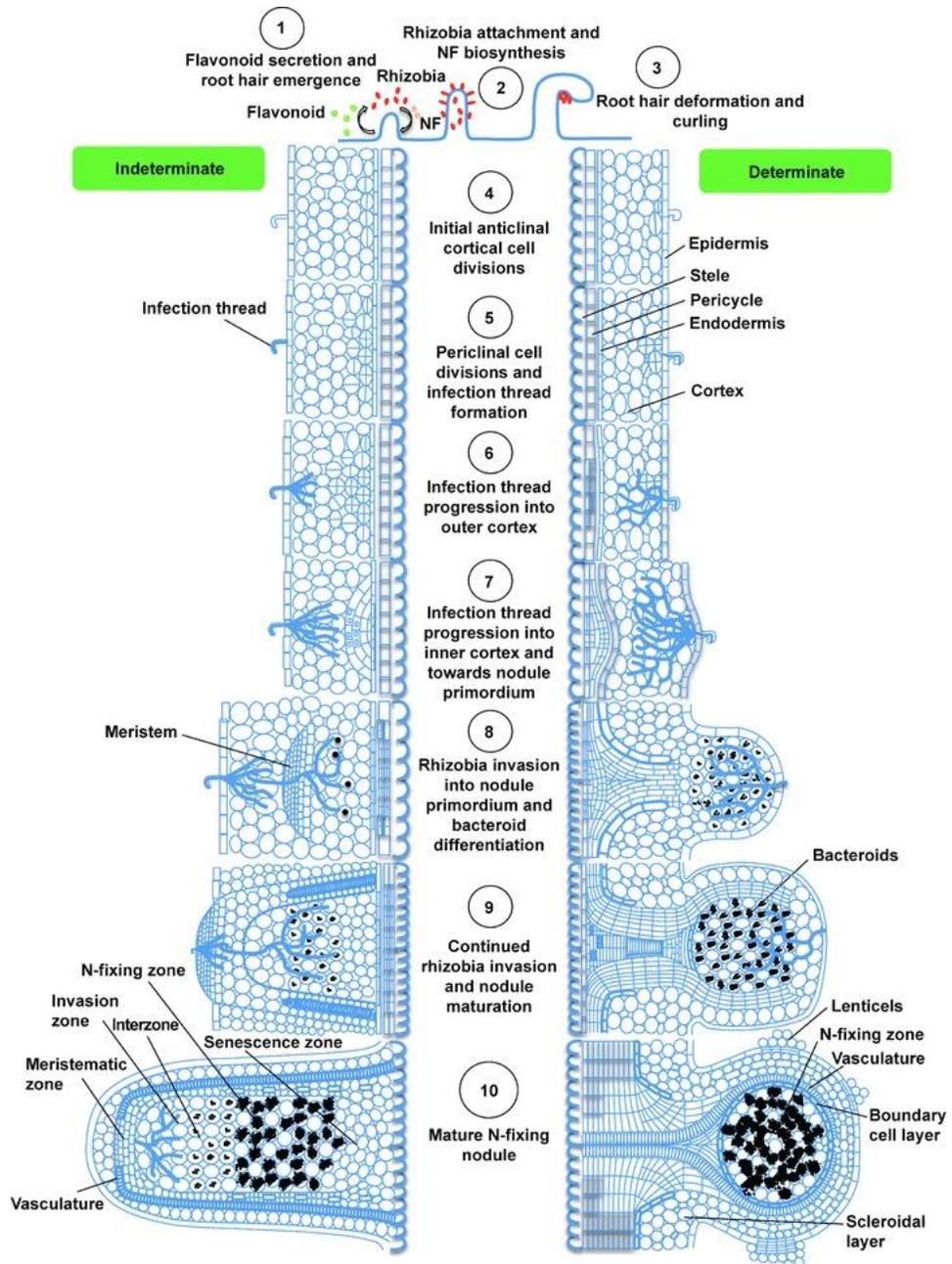


Figura 7. Diferentes etapas del desarrollo nodular desde la infección hasta el desarrollo del nódulo, tanto de los determinados como los indeterminados. Imagen obtenida de Ferguson et al., 2010.

4.2. Solubilización de fosfato

Otro de los elementos limitantes en el cultivo agrícola, después del nitrógeno, es el fósforo (P), debido a su participación en diversos procesos metabólicos de las plantas, entre los que se incluyen: división y desarrollo celular, transporte de energía, transducción de señales, síntesis de

macromoléculas, fotosíntesis y respiración celular; por tanto, funciones imprescindibles para la vida vegetal (Khan et al., 2014). La deficiencia de P ocasiona retraso de crecimiento de las plantas, hojas oscuras, inhibición de la floración y el retraso en el desarrollo del sistema radicular (Khan et al., 2014). Los fosfatos aplicados en los suelos agrícolas son inmovilizados rápidamente, esto ocasiona que se vuelvan inaccesible para la planta (Hardoim et al., 2012). La figura 8 muestra de forma simple el movimiento del P y su biodisponibilidad.

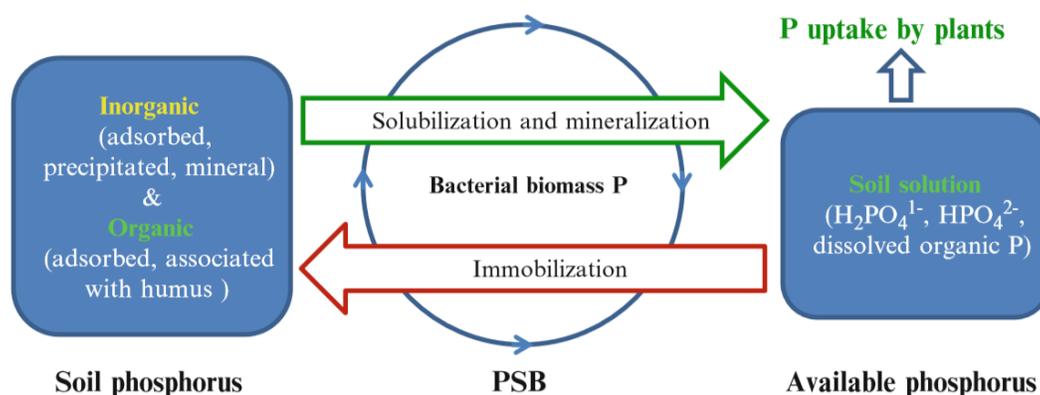


Figura 8. Movimiento de las diversas fuentes de fósforo en el suelo. Imagen obtenida de Islam & Hossain, 2012.

La fuente principal de fósforo proviene de minerales primarios y secundarios y/o compuestos orgánicos. De manera general, los compuestos de fósforo en el suelo se pueden clasificar en las siguientes tres categorías: 1) compuestos inorgánicos (siendo las más comunes: $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, CaHPO_4 , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 2) compuestos orgánicos del humus del suelo y 3) compuestos orgánicos e inorgánicos asociados con la materia viva.

Las concentraciones de este elemento en el suelo, comparado con otros nutrientes, podrían ser muy baja variando entre 0,001 a 1mg por litro (Khan et al., 2014; Brady y Weil 2002). Aunque las reservas de fósforo pudieran ser abundantes, no siempre están disponibles de forma química para que sean accesibles a las plantas. En este sentido, las plantas no son capaces de utilizarlo, como lo son el fosfato mono y dibásico. Además, el fósforo orgánico resulta de importancia a nivel agrícola, se estima que las formas orgánicas de fósforo comprenden entre un 30 a 50% de este elemento total en el suelo. Los depósitos de fósforo pueden ser mineralizados por diferentes microorganismos, algunos de los cuales se clasifican dentro de los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Erwinia*; convirtiendo la reforma biodisponible para las plantas (Ilyas & Bano, 2012).

Según la forma en la que se encuentre el fósforo en el suelo, los diferentes microorganismos pueden utilizar diversos mecanismos para la solubilización del fosfato. En primer lugar, están los que son capaces de liberar ácidos orgánicos de bajo peso molecular que movilizan el fósforo mediante interacciones iónicas con los cationes de las sales de fosfato. En otras palabras, se

quelatan los cationes unidos al fósforo a través de sus grupos hidroxilo y carboxilo, convirtiéndolos en forma más solubles (Islam & Hossain, 2012). Entre los microorganismos que utilizan esta forma de solubilización están: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* spp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *E. agglomerans*, *Klebsiella* sp., *Microbacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens*, *P. trivialis*, *P. poae*, *Serratia* sp., *Pantoea* sp., *Ralstonia* sp. y *Sinorhizobium meliloti* (Islam & Hossain, 2012). El ácido glucónico es el más comúnmente producido durante el proceso de solubilización de fosfato. Sin embargo, cabe destacar que también se producen otra serie de ácidos como el: 2-cetoglucónico, oxálico, málico, láctico, succínico, fórmico, propiónico y 2-hidroxiglutarico (Islam & Hossain, 2012).

En segundo lugar, tenemos los mediados por acciones enzimáticas. Algunos microorganismos son capaces de liberar fosfatasas las cuales liberan grupos fosfatos unidos a materia orgánica. Muchas de las bacterias son capaces de solubilizar el complejo formado por calcio y fósforo (Ca-P), no obstante, hay otros microorganismos capaces de romper otra serie de complejos como serían: Fe-P, Mn-P y Al-P (Ilyas & Bano, 2012; Islam & Hossain, 2012). El identificar y estudiar nuevas cepas capaces de solubilizar fosfato de diferentes tipos de suelos podría generar una diversa gama de productos con el fin de proporcionar una agricultura más sostenible.

4.3. Producción de fitohormonas por microorganismos

Una de las características por la que se destacan los microorganismos con potencial de crecimiento en las plantas es que algunos de ellos son capaces de producir fitoestimuladores o fitohormonas. Las fitohormonas son moléculas de señalización las cuales actúan como mensajeros químicos, jugando un papel importante en el crecimiento y desarrollo en las plantas. A concentraciones muy bajas, estos compuestos orgánicos pueden tener efectos bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en las plantas (Rani & Goel, 2012). Existen diversos tipos de fitohormonas producidas por bacterias con potencial PGPR como auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Taurian et al., 2012; Vessey 2003; Verma et al., 2010).

Una de las más comunes es el ácido indol-3-acético (IAA por sus siglas en inglés ‘Indol Acetic Acid’), una de las auxinas (Hardoim et al., 2012). Este tipo de fitohormona es de las más estudiadas por su potencial de promover el crecimiento vegetal (Taurian et al., 2012). La síntesis de esta hormona se muestra en la figura 9, donde se observan una variedad de rutas metabólicas para su síntesis, todas ellas partiendo de base con el L-triptófano. El IAA está implicado en la división celular, por lo que tiene un efecto directo en el crecimiento y desarrollo del sistema radicular (Spence et al., 2012). También ésta está relacionada con la elongación celular, mantenimiento de la dominancia apical, formación de tejidos vasculares, prevención de la senescencia, mejora la producción de raíces laterales, aumento del volumen de las raíces y biomasa (Hardoim et al., 2012).

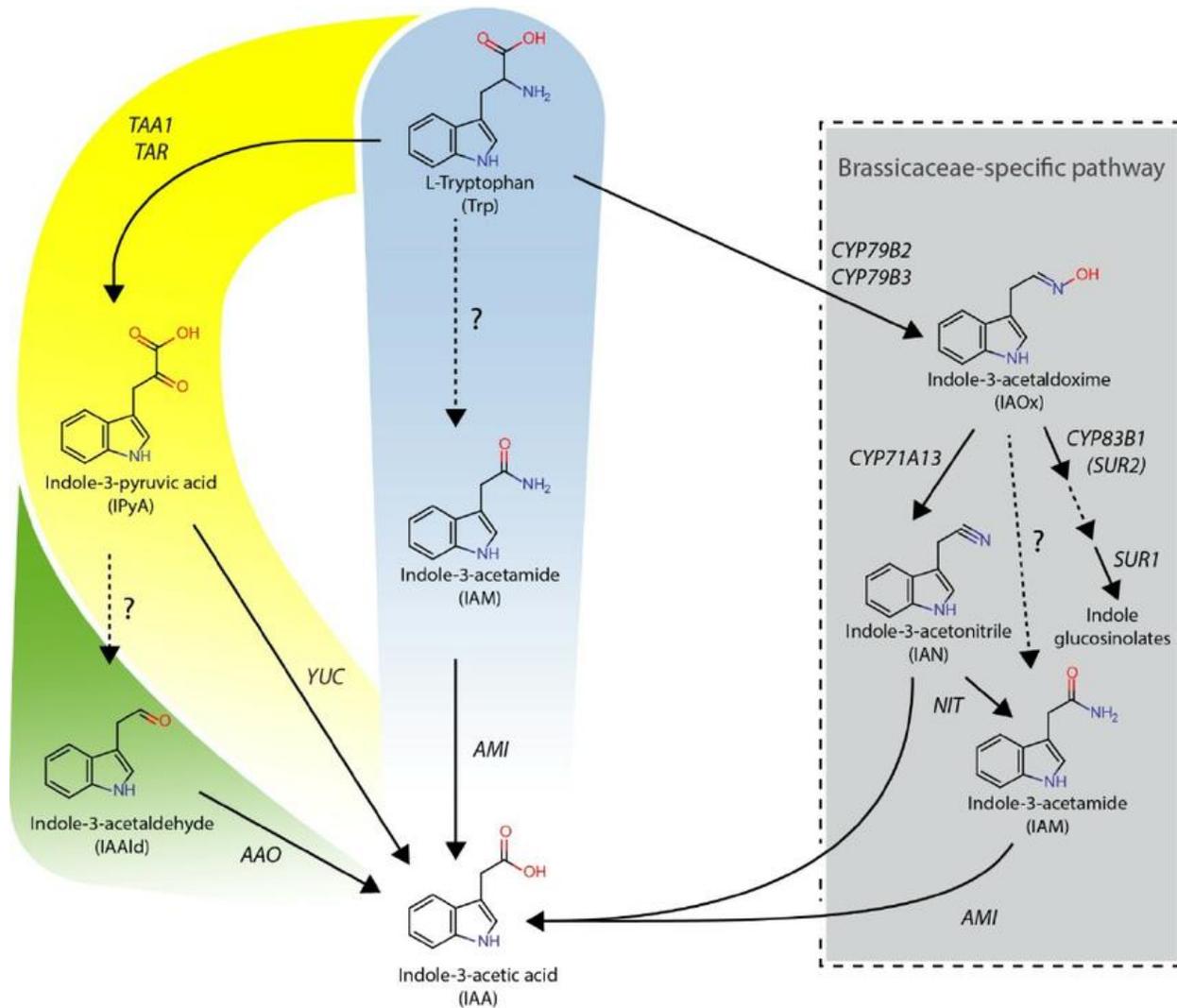


Figura 9. Proceso de síntesis del el ácido indol-3-acético (IAA). Imagen obtenida de Sánchez-Parra et al., 2014.

Esto presenta una ventaja importante ya que un mayor sistema radicular en las plantas alcanza una mayor área superficial (Spence et al., 2012). Por consiguiente, mayores oportunidades en el suelo para la adquisición de agua y nutrientes, lo que se traduciría en un mayor incremento y desarrollo de las plantas, lo que podría repercutir en mayores rendimientos agrícolas. Se ha demostrado que diversas cepas de los siguientes géneros son capaces de producir y secretar IAA: *Azospirillum*, *Vibrio*, *Streptomyces*, *Psuedomonas* (Spence et al., 2012), *Erwinia*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y otras rizobacterias (Hardoim et al., 2012).

Otras fitohormonas importantes son las citoquininas. Éstas también promueven la división y el crecimiento celular y la expansión de los tejidos. Las citoquininas tienen un efecto positivo en el inicio de la organogénesis del nódulo. Se ha documentado en diferentes leguminosas donde la aplicación exógena de citoquininas induce la división de las células corticales, acumulación de amiloplastos y expresión de marcadores de nodulación temprana (Boivin et al., 2016). Las citoquininas y potencialmente las auxinas regulan las etapas del nodulación así como el

metabolismo de la fijación de nitrógeno, como se ha sugerido por análisis transcriptómicos (Boivin et al., 2016; Roux et al., 2014). Cabe destacar que no siempre la secreción de citoquininas por las bacterias resulta beneficiosa para las plantas, por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens* secreta citoquininas que ocasionan tumores de crecimiento no regulado en las plantas (Spence et al., 2012).

Otras hormonas capaces de ser producidas por microorganismos PGPR son las giberelinas, sin embargo, éstas también han sido poco estudiadas para este fin (Taurian et al., 2012).

Un cuarto tipo de fitohormonas es el etileno, el cual, en cantidades grandes, se considera un inhibidor del crecimiento vegetal ya que reduce la resistencia al estrés de las plantas (Taurian et al., 2012; Van Loon 2007; Pierik et al., 2006). Uno de los precursores para la producción de etileno es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Sin embargo, hay endófitos bacterianos con alta actividad de la enzima ACC desaminasa, la cual, inducida localmente podría ser un buen promotor del crecimiento en plantas ya que mejora la resistencia al estrés al bloquear efectivamente la producción de etileno (Taurian et al., 2012; Cheng et al., 2007; Hardoim et al., 2008).

Un aspecto importante para un buen desarrollo de las plantas es un equilibrio entre las auxinas y las citoquininas, pudiendo determinar si una interacción microbiana puede ser beneficiosa o perjudicial. Cabe añadir que las señales adicionales de los microorganismos juegan un papel importante en los procesos morfológicos de las plantas, como sería la N-acil-L-homoserina-lactonas (AHL) y los componentes volátiles (VOC). Las AHL son una clase de señales de detección de “Quorum sensing” que permiten que las bacterias regulen su expresión genética conforme a su densidad poblacional. Se ha descubierto que las plantas pueden reconocer AHL y alterar su expresión genética en raíces y brotes con el fin de modular las respuestas de defensa y crecimiento. Otro estudio descubrió que algunos componentes volátiles como acetona y 2,3-butanediol producidos por los PGPR pueden utilizarse para la comunicación planta-bacteria, pudiendo desencadenar mecanismos de promoción de crecimiento favorables para las plantas (Ilyas & Bano, 2012; Ortíz-Castro et al., 2009).

4.4. Producción de sideróforos

Otro elemento de los cuales encuentra de una cantidad suficiente en los suelos, sin embargo, las plantas son ineficientes a la hora de absorberlo es el hierro (Spence et al., 2012). El hierro es un nutriente esencial para las plantas y su deficiencia ocasiona alteraciones metabólicas graves, ya que juega papel importante como cofactor de varias enzimas esenciales, involucradas en procesos fisiológicos básicos celulares como lo son la respiración celular, la fotosíntesis (Ilyas & Bano, 2012) y síntesis de ADN (Khan et al., 2014), así como en el proceso de fijación de nitrógeno (Ilyas & Bano, 2012).

La mayoría de los suelos tienen cantidades considerable de hierro, no obstante, en ambientes aerobios se encuentran en la forma Fe^{3+} , la forma oxidada, y por lo tanto las plantas no pueden adquirirlo. En este sentido, sólo las plantas pueden adquirir la forma reducida, Fe^{2+} (Spence et al., 2012; Ilyas & Bano, 2012; Khan et al., 2014).

Sin embargo, algunos de los microorganismos con potencial PGPR pueden ser capaces de secretar moléculas quelantes de hierro en la rizosfera como los sideróforos (del griego “portador de hierro”) (Ilyas & Bano, 2012; Khan et al., 2014). Estos sideróforos secretados pueden unirse a formas insolubles del hierro presentes, principalmente de minerales y llevarlo a las células vegetales (Spence et al., 2012; Khan et al., 2014). Los sideróforos son compuestos de bajo peso molecular (inferiores a 1kDa) los cuales contienen grupos funcionales que se unen al hierro de forma reversible, siendo los grupos funcionales más frecuentes los hidroximatos y los catecoles. Estos sideróforos suelen encontrarse en concentraciones de 10 a 30M en los suelos (Ilyas & Bano, 2012). Existen más de 500 tipos de sideróforos procedentes principalmente de las bacterias. Estos componentes son altamente electronegativos, de esta forma se unen al Fe^{3+} formando casi siempre un complejo hexacoordinado. Los grupos de ligaciones al hierro han sido clasificados de manera provisional en tres tipos de químicos principales: hidroxamato, catecolatos / fenolatos y ácidos hidroxílicos / carboxilatos. Cabe destacar que alguno de estos sideróforos contiene más de un tipo de ferroquelación (Khan et al., 2014).

Por lo general, la mayoría de las cepas productoras de sideróforos bacterianos son del género *Pseudomonas*, siendo la especie más común *Pseudomonas fluorescens*, la cual libera pioelina y pyoverdina (Ilyas & Bano, 2012). Una de las razones por la cual algunos de los microorganismos liberan este tipo de sustancias es para aumentar su potencial competitivo, ya que algunas tienen actividad antibiótica. En este sentido, las rizobacterias capaces reproducir sideróforos pueden mejorar la salud de la planta de diferentes formas la más clara es la nutrición de hierro, pero también pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos, bien por antibiosis, bien por afectar su crecimiento al limitar el hierro disponible para el patógeno (por ejemplo, generalmente los hongos son incapaces de absorber el complejo hierro-sideróforo) (Arora et al., 2001; Ilyas & Bano, 2012; Gupta et al., 2001).

Algunos ejemplos de bacterias capaces de producir sideróforos son: *Streptomyces* spp., *Erwinia herbicola*, *E. amylovora*, *E. carotovora*, *E. chrysanthemi* (actualmente conocida como *Dickeya dadantii*), *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium leguminosarum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Bradyrhizobium japonicum*, entre otras (Ilyas & Bano, 2012); algunas de ellas patógenas de plantas y, por lo tanto, no buenas candidatas para el desarrollo de biofertilizantes, a pesar de su potencial en la producción de sideróforos. La tabla 7 muestra algunos tipos de sideróforos y los organismos que los producen, algunos de ellos patógenos vegetales y otros humanos.

Tabla 7. Ejemplos de sideróforos y de bacterias y hongos que los producen. Tabla obtenida y modificada de Khan et al., 2014.

Tipo de sideróforo	Organismo productor
Ferrichrome	<i>Ustilago sphaerogena</i>
Desferrioxamine B (deferoxamine)	<i>Streptomyces pilosus</i> , <i>S. coelicolor</i>
Desferrioxamine E	<i>Streptomyces coelicolor</i>
Fusarine C	<i>Fusarium roseum</i>
Ornibactin	<i>Burkholderia cepacia</i>
Enterobactin	<i>Escherichia coli</i>

Tipo de sideróforo	Organismo productor
Bacillibactin	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. anthracis</i>
Vibriobactin	<i>Vibrio cholerae</i>
Azotobactin	<i>Azotobacter vinelandii</i>
Pyoverdine	<i>Pseudomonas aeruginosas</i>
Yersiniabactin	<i>Yersinia pestis</i>

Los sideróforos juegan un papel importante en la fijación biológica del nitrógeno como ya se comentó en el párrafo introductorio de esta sección. La mayoría de las PGPR incluyendo los rizobios son capaces producir sideróforos (Khan et al., 2014; Rajkumar et al. 2010). Se ha encontrado que las leguminosas noduladas muestran una mayor demanda de hierro, si éstas son comparadas con las no noduladas (Derylo y Skorupska 1993). Conforme a trabajos realizados por Gill et al. (1991) se determinó que cepas mutantes de *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* que no producían sideróforos eran capaces de nodular plantas, sin embargo, la eficiencia de fijación de nitrógeno era mucho menor en comparación con la cepa silvestre (sin mutar), determinando la importancia del hierro en la fijación simbiótica de nitrógeno (Khan et al., 2014). El potencial de algunos microorganismos como PGPR se debe evaluar como un conjunto de factores, ya que éstos pueden ayudar a aumentar las ventajas y ser catalogados como mejores candidatos para el desarrollo de biofertilizantes; en este sentido, un estudio realizado por Burd y colaboradores (1998) donde la bacteria *Kluyvera ascorbata* fue una buena productora de sideróforos, además que ayudó a la protección de plantas de colza contra metales pesados, especialmente el níquel (Khan et al., 2014). Sin embargo, esta bacteria es un potencial patógeno en humanos, identificándose casos de bacteremia causada por las mismas (López-Larramona et al., 2013; Khan et al., 2014)

4.5. PGPR capacidad de rizadorremediadores

Además de los beneficios relacionados con el aumento de la producción de los cultivos agrícolas, las interacciones planta-microorganismo son positivas para la eliminación de contaminantes en los suelos. En este sentido, el identificar y/o conocer microorganismos con potencial PGPR y a su vez tengan la capacidad de degradar contaminantes del suelo o puedan producir las condiciones idóneas en la rizosfera para potenciar el desarrollo de alguna planta capaz de remover ese contaminante del suelo, resultaría en un excelente área de estudio con el fin de reducir algún daño que el ser humano haya ocasionado en dichos suelos.

Debido al acción humana, en los últimos siglos los avances industriales y tecnológicos han provocado fuentes de contaminación de los suelos y las aguas, constituyendo una amenaza para los ecosistemas y la salud humana, la cual reduce el potencial de los suelos para su empleo como soportes de la producción agrícola (Thijs & Vangronsveld, 2015; Prabhu et al., 2017). Los métodos tradicionales de remediación de estos contaminantes son costosos; por ejemplo, la limpieza de todos los suelos contaminados sólo Estados Unidos costaría 1,7 billones de dólares. Hay que destacar además que estas técnicas tradicionales no siempre son suficientes y/o eficientes. Por ejemplo, la incineración de suelo contaminado (como por hidrocarburos) puede provocar contaminación del aire y otras técnicas como la excavación del suelo podrían generar emisiones

tóxicas a la atmósfera, además de los problemas de erosión que esto ocasionaría (Kuiper et al., 2004).

La contaminación por metales pesados tiene efectos adversos sobre las comunidades microbianas en los suelos. Esto se puede evaluar de diferentes maneras; 1) la reducción de la biomasa microbianas total, 2) disminución en el número de poblaciones específicas, 3) cambios en la estructura de la comunidad microbianas. Los microorganismos se han utilizado gracias a su sensibilidad y capacidad para la biorremediación. A pesar de que se han realizado muchos estudios sobre la utilización de microorganismos en la limpieza de suelos contaminados, existe muy poca información publicada sobre la composición de comunidades microbianas en la rizosfera de las plantas en suelos contaminados con metales pesados (Ilyas & Bano et al., 2012).

Por lo tanto, a la utilización de plantas para extraer contaminantes del suelo se le conoce como fitorremediación. Sin embargo, cuando la fitorremediación es asistida por microorganismos se denominará rizorremediación. En este sentido, la implicación de ambos (planta y microorganismo) ofrece mayores ventajas: los exudados radiculares le sirven como fuente de alimento a las bacterias, mientras que las plantas se benefician de la capacidad degradativa de los contaminantes (Radwan et al., 1995). Esta cantidad considerable de exudados de nutrientes por parte de la planta aumenta la actividad metabólica de los microorganismos, pues, los mismos contienen azúcares ácidos orgánicos y aminoácidos como componentes principales.

En este sentido la rizorremediación puede resolver este problema de la contaminación de los suelos de una forma económica y sostenible, gracias al acción de los microorganismos biodegradativos en la rizosfera y la capacidad de la planta para la fitorremediación. Cabe destacar que en la rizorremediación no solamente las bacterias son las que llevan a cabo esta acción, en este sentido los hongos (micorrizas) también asociados a plantas pueden ayudar a solventar el problema de la contaminación en los suelos. En esta compleja asociación se logran absorber minerales, se producen vitaminas, hormonas vegetales, solubilización de ciertos elementos esenciales para la planta, degradación de compuestos orgánicos, secuestro de metales pesados, entre otras (Thijs & Vangronsveld, 2015).

Los primeros estudios sobre la degradación de compuestos en el área de la rizosfera se enfocan en la degradación de herbicidas y pesticidas. Esto sugiere que las plantas pueden crecer y desarrollarse sin problema de evitar la degradación de estos compuestos orgánicos peligrosos por parte de las bacterias. Las nuevas investigaciones intentan identificar esas comunidades microbianas, además de las plantas más utilizada y que ha obtenido mejores resultados. En este sentido, se ha determinado que para la rizoremediación, las plantas más adecuadas son diferentes variedades de gramíneas y leguminosas. Se cree que esto se debe a que estas plantas poseen un sistema radicular altamente ramificados, y por lo tanto albergar una gran cantidad de microorganismos (Kuiper et al., 2004).

A continuación, se muestran algunos ejemplos donde se ha investigado la degradación de algunos compuestos contaminantes mediante la rizorremediación. En el caso de bifenilos policlorados, se ha utilizado la remolacha azucarera junto con *Pseudomonas fluorescens* (Brazil et al., 1995). El aceite fue degradado utilizando plantas salvajes (sin definir) y *Senecus glaucus* utilizando *Arthrobacter* y *Penicillium* (Radwan et al. 1995). El ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético ha

sido degradado utilizando cebada junto con *Burkholderia cepacia* (Jacobsen 1997), y trigo con *Pseudomonas putida* (Kingsley et al. 1994). El 1,4-dioxano con álamo y actinomicetos (Schnoor et al. 1998). El tricloroetileno con trigo *Pseudomonas fluorescens* (Yee et al. 1998). El cadmio se utilizó con la planta *Astragalus sinicus* y la bacteria *Mesorhizobium huakuii* (Sriprang et al. 2002), Siendo este último ejemplo una muestra de la utilización de una planta leguminosa con un rizobio. Cabe destacar en el concepto de rizadorremediación que la mayoría de las investigaciones se centran en contaminantes orgánicos y son pocas las que lo hacen frente a suelos contaminados con metales pesados.

Entre los metales que con mayor frecuencia se encuentran en suelos contaminados provenientes de la industria metalúrgica y la minería son: cadmio, plomo, cobalto, cobre, mercurio, níquel, selenio y zinc. Cabe mencionar que los metales son importantes para las reacciones bioquímicas, tanto para crecimiento y desarrollo de microorganismos como de plantas y animales. Sin embargo, alta concentración de éstos puede generar efectos citotóxicos, todo dependerá del tipo de metal (Kavamura & Esposito, 2010). Por lo tanto, algunos investigadores se encargan de estudiar la resistencia bacteriana a metales pesados a fin de comprender mejor sus mecanismos de tolerancia y en especial la detoxificación de los mismos, como la producción de agentes quelantes que se unen al metal reduciendo su fitotoxicidad (Kavamura & Esposito, 2010).

Nuevas investigaciones se están centrando en el estudio de los genomas con el fin de adquirir nuevo conocimiento sobre potencia de algunas plantas y microorganismos a fin de determinar cuáles hacen la mejor interacción sobre que contaminantes y sobre qué tipo de suelo con el fin de utilizarlos para la remediación de los mismos (Thijs & Vangronsveld, 2015). En este sentido, diferentes factores como: la temperatura, el pH, la materia orgánica del suelo, entre otros; pueden verse afectado el crecimiento y el metabolismo tanto el de los microorganismos como también las plantas (Prabhu et al., 2017). En resumen, la biorremediación la cual busca la restauración de lugares contaminados utilizando organismos, pero más específicamente la fitorremediación junto con la bioaumentación (incrementar las poblaciones microbianas) lo que da como resultado la rizadorremediación puede resolver los problemas de contaminación en los suelos como una técnica viable (Kuiper et al., 2004; Kavamura & Esposito, 2010).

5. Potencial de microorganismos de diversas familias como Promotores del Crecimiento Vegetal (PGPR)

A pesar de que las plantas son capaces de generar su propio alimento mediante la fotosíntesis, existen al menos 13 elementos nutricionales que deben ser suministrados mediante el suelo (Sayyed et al., 2012). De estos, los tres principales son el nitrógeno, el fósforo y el potasio y la demanda continua de estos elementos en los cultivos agrícolas genera la necesidad de que se adicionen fertilizantes químicos y, por tanto, las consecuencias al medio ambiente y salud humana que ya han sido descritas. No obstante, como ya hemos explicado, existen microorganismos capaces de viabilizar algunos de estos nutrientes, además de fomentar de forma sana el crecimiento de las plantas. En este sentido, los biofertilizantes son microorganismos de células latentes o vivas, las cuales tienen la capacidad de movilizar y aumentar la disponibilidad de nutrientes hacia las plantas (Sayyed et al., 2012). Estos inóculos tienen microorganismos en cantidades suficientes

para lograr este objetivo, pudiendo tener un buen potencial con fines comerciales. En esta sección detallaremos las características más importantes de algunos de los principales microorganismos empleados como biofertilizantes de los cultivos.

5.1. Género *Bacillus*

El género *Bacillus* es uno de los grupos de los organismos PGPR más estudiados aparte de los rizobias y las *Pseudomonas*. Este género es el más común de los Gram positivos encontrados en el suelo, encontrándose su distribución a nivel mundial. Esta bacteria es capaz de colonizar de forma competitiva en las raíces de las plantas, pudiendo ser utilizado como biofertilizante e incluso como bioplaguicida (Kumar et al., 2011; Ilyas & Bano, 2012). Al ser un género tan diverso existen muchas y diferentes capacidades PGPR (Ilyas & Bano, 2012; Kokalis-Burelle et al., 2002).

Las bacterias del género *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en los campos agrícolas y contribuyen de forma directa e indirecta a su productividad. Este género posee rasgos fisiológicos como la formación de endosporas, secreción de antibióticos, moléculas de señalización y otras enzimas extracelulares hacen que éstas sean capaces de resistir a condiciones adversas (Kumar et al., 2011), al ser capaces de formar endosporas, a condiciones adversas, lo que también origina su fácil comercialización como liófilos (Ilyas & Bano, 2012).

Se conocen que diversas especies de *Bacillus* y del género *Paenibacillus*, otro género estrechamente relacionado con el anterior, son capaces de fomentar el crecimiento de las plantas. Esta capacidad se debe a mecanismos promotores de crecimiento en plantas como producción de fitohormonas, solubilización y movilización de fosfatos, producción de sideróforos, producción de antibióticos, inhibición de la síntesis de etileno en las plantas e inducción de la resistencia sistémica a patógenos de las plantas (Kumar et al., 2011). Además, desde hace décadas se han identificado cepas de *Bacillus* capaces de fijar nitrógeno en vida libre en condiciones microaerófilas (Li et al., 1992; Wahab 1975).

Un trabajo de Reva y colaboradores (2002) encontró que diferentes cepas y especies del género *Bacillus* se han encontrado en el interior de los tejidos de plantas sanas de algodón, formando parte natural de la comunidad microbiana de ésta.

Cepas de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* son capaces producir IAA. Además, cepas de *B. pumilus* y *B. licheniformis* son productores de giberelinas (Idris et al., 2004; Kumar et al., 2011). Otro factor importante al momento de determinar buenos candidatos como biofertilizantes es la capacidad de solubilización de fosfatos. Uno de los ejemplos es *Bacillus megaterium*, de hecho, esta especie (la variedad phosphaticum) se ha utilizado como biofertilizante comercial bajo el nombre de Phosphobacterin en la antigua Unión Soviética e incluso se introdujo en Europa e India. Cabe añadir que esta especie se ha utilizado en combinación con *Rhizobium* en leguminosas obteniendo buenos resultados (Khan et al. 2007; Kumar et al., 2011). Otro *Bacillus* utilizado es *Bacillus polymyxa* en cual se utiliza junto a *Pseudomonas striata* las cuales son buenas solubilizadoras de fosfato (Kumar et al., 2011). También se ha utilizado *B. firmus* en lentejas y la planta *Vigna mungo* (lenteja negra) (Tomar et al., 1993). Otro trabajo utilizó una especie de *Bacillus* con una micorriza (*Glomus mosseae*) y una especie de *Rhizobium* en plantas de guisante

Introducción

(*Pisum sativum*) observándose un crecimiento significativo en las plantas inoculadas (Bethlenfalvay 1994).

Como ya se ha mencionado, uno de los problemas principales para el rendimiento de los cultivos son los organismos fitopatógenos. La mayoría de las investigaciones se han centrado en tres principales grupos: *Thichoderma*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Conforme a las especies ya registradas por la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos las cepas GB03 y MBI 600 de *Bacillus subtilis* han sido utilizada contra patógenos de plantas. La cepa GB03 ya se comercializa por las empresas Companion (Growth Products) y Kodiak (Gustafson Inc.), ambas en Estados Unidos. Esta cepa se puede utilizar contra diversos hongos fitopatógenos como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Rhizoctonia*, y *Fusarium*. Por otro lado, la cepa MBI 600 es parte del producto conocido como Subtilex (Becker Underwood), utilizado en productos de plantas ornamentales y vegetales, además de vides, fresas y pepinos contra *Botrytis* y royas. Otras cepas de *Bacillus subtilis* capaces de producir sustancias antibióticas son: QST713, AU195, UMAF6614, UMAF6616, UMAF6639 y UMAF856. Por su parte, la cepa *B. amyloliquefaciens* A1Z es capaz de inhibir diversos hongos patógenos como *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, and *Fusarium oxysporum* (Kumar et al., 2011).

5.2. Rhizobiales

Las bacterias más conocidas y algunos ejemplos de este orden incluyen los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*) y *Azorhizobium* (Young, 2003). Algunas de las especies aisladas del interior de nódulos se muestran en las tablas 8, 9, 10 y 11, respectivamente Cabe mencionar que hay muchas especies más clasificadas en estos géneros, que han sido aisladas de directamente del suelo u otros ambientes que no han sido incluidas en dichas tablas.

Tabla 8. Diferentes especies del género *Rizobium* y su planta hospedera. Tabla obtenida y actualizada de Menéndez-Gutiérrez (2014)

<i>Rhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>R. alamii</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Berge et al., 2009
<i>R. alkalisoli</i>	<i>Caragana intermedia</i>	Lu et al., 2009
<i>R. cellulosilyticum</i>	<i>Populus alba</i>	García-Fraile et al., 2007
<i>R. daejeonense</i>	<i>Medicago</i> sp	Quan et al., 2005
<i>R. endophyticum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	López-López et al., 2010
<i>R. fabae</i>	<i>Vicia faba</i>	Tian et al., 2008
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al., 1993
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i>	Lindström, 1989
<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
<i>R. hainanense</i>	<i>Desmodium</i> sp, <i>Styloshantes guyanansis</i> , <i>Centrosema</i>	Chen et al., 1997

<i>Rhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
	<i>pubescens</i> , <i>Tephrosia candida</i> , <i>Acacia sinuata</i> , <i>Arachas</i> <i>hypogaea</i> , <i>Zornia diphylla</i> , <i>Uraria crinita</i> , <i>Macroptillium</i> <i>lathyroides</i>	
<i>R. herbae</i>	<i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Oxytropis cashemiriana</i>	Wang et al., 2011
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbácea</i>	Wang et al., 1998
<i>R. indigoferae</i>	<i>Indigofera</i> spp., <i>Kummerowia</i> <i>stipulacea</i>	Wei et al., 2002
<i>R. pusense</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Panday et al., 2011
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Trifolium</i> <i>repens</i>	Ramírez-Bahena et al., 2008 (Frank, 1879, 1889)
<i>R. loessense</i>	<i>Astragalus</i> sp, <i>Lespedeza</i> sp	Wei et al., 2003
<i>R. lusitanum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Valverde et al., 2006
<i>R. mesosinicum</i>	<i>Albizia</i> sp, <i>Kummerowia</i> sp, <i>Dalbergia</i> sp	Lin et al., 2009
<i>R. lupini</i>	<i>Lupinus</i> sp	Eckhardt et al., 1931
<i>R. miluonense</i>	<i>Lezpedeza chinensis</i>	Gu et al., 2008
<i>R. halophytocola</i>	<i>Vigna unguiculata</i> , <i>Pisum</i> <i>sativum</i>	Bibi et al., 2012
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	Van Berkum et al., 1998
<i>R. multihospitium</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Lotus</i> sp, <i>Alhagi toum</i> , <i>Astragalus</i> sp, <i>Halimodendrom halodendron</i> , <i>Oxytropis</i> sp, <i>Sophora</i> <i>alopecuroides</i> , <i>Caragana</i> <i>jubata</i> , <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Vicia</i> <i>hirsuta</i>	Han et al., 2008
<i>R. oryzae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Glycine</i> <i>max</i>	Peng et al., 2008
<i>R. petrolearium</i>	<i>Medicago sativa</i>	Zhang et al., 2012
<i>R. phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> y <i>Trifolium</i>	Dangeard et al., 1926 y Ramírez-Bahena et al., 2008
<i>R. leucaeneae</i>	<i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro et al., 2012
<i>R. pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	Ramirez-Bahena et al., 2008
<i>R. tibeticum</i>	<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	Hou et al., 2009
<i>R. yanglingense</i>	<i>Amphicarpaea trisperma</i> , <i>Coronilla varia</i> , <i>Gueldenstaedtia multiflora</i>	Tan et al., 2001

Introducción

<i>Rhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>R. sulae</i>	<i>Hedysarum coronarium</i>	Squartini et al., 2002
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i>	Martínez-Romero et al., 1991
<i>R. tubonense</i>	<i>Oxytropis glabra</i>	Zhang et al., 2011
<i>R. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	DeLajudie et al., 1998; Young et al., 2001
<i>R. vignae</i>	<i>Vigna radiata</i>	Chen et al., 2011
<i>R. taibaishanense</i>	<i>Kummerowia striata</i>	Yao et al., 2012
<i>R. vallis</i>	<i>Mimosa pudica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Indigofera spicata</i>	Wang et al., 2011
<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. soli</i>	<i>Amphicarpaea sp</i>	Yoon et al., 2010
<i>R. sphaerophysae</i>	<i>Sphaerophysa salsula</i>	Xu et al., 2011
<i>R. qilianshanense</i>	<i>Oxytropis ochrocephala</i>	Xu et al., 2013
<i>R. helanshanense</i>	<i>Sphaerophysa salsula</i>	Quin et al., 2012
<i>R. grahamii</i>	<i>Dalea leporina</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Clitoria ternatea</i>	López-López et al., 2012
<i>R. cauense</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Liu et al., 2012
<i>R. calliandrae</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales et al., 2013
<i>R. mayense</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales et al., 2013
<i>R. jaguaris</i>	<i>Calliandra grandiflora</i>	Rincón-Rosales et al., 2013
<i>R. azibense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mnasri et al., 2014
<i>R. endolithicum</i>	<i>Glycine max</i>	Parag et al., 2013
<i>R. pongamiae</i>	<i>Pongamia pinnata</i>	Kesari et al., 2013
<i>R. freirei</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol et al., 2013
<i>R. laguerreae</i>	<i>Vicia sp.</i>	Saidi et al., 2014
<i>R. ecuadoreense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribeiro et al., 2015
<i>R. lentis</i>	<i>Lens culinaris</i>	Rashid et al., 2015
<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. capsici</i>	<i>Capsicum annuum</i>	Lin et al., 2015
<i>R. favelukesii</i>	<i>Medicago sativa</i>	Tejerizo et al., 2016
<i>R. anhuiense</i>	<i>Vicia faba</i> y <i>Pisum sativum</i>	Zhang et al., 2015
<i>R. sophorae</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao et al., 2015
<i>R. sophoriradicis</i>	<i>Sophora flavescens</i>	Jiao et al., 2015
<i>R. zaeae</i>	<i>Zea mays</i>	Celador-Lera et al., 2017
<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>Rhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>R. laguerreae</i>	<i>Vicia faba</i>	Saïdi et al., 2014
<i>R. esperanzae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Cordeiro et al., 2017
<i>R. pakistanensis</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Khalid et al., 2015
<i>R. altiplani</i>	<i>Mimosa pudica</i>	Baraúna et al., 2016
<i>R. metallidurans</i>	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Grisson et al., 2015
<i>R. puerariae</i>	<i>Pueraria candollei</i>	Boonsnongcheep et al., 2016
<i>R. hidalgonense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Yan et al., 2017
<i>R. azibense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Mnasri et al., 2014
<i>R. paranaense</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Dall'Agnol et al., 2014
<i>R. oryzicola</i>	Raíces de arroz	Zhang et al., 2015
<i>R. rhizoryzae</i>	Raíces de arroz	Zhang et al., 2014
<i>R. hedsari</i>	<i>Hedysarum multijugum</i>	Xu et al., 2017
<i>R. oryziradicis</i>	Raíces de arroz	Zhao et al., 2017
<i>R. gei</i>	<i>Geum aleppicum</i>	Shi et al., 2016
<i>R. straminoryzae</i>	Superficie de la paja del arroz	Lin et al., 2014
<i>R. wenxiniae</i>	<i>Zea mays</i>	Gao et al., 2017
<i>R. rhizosphaerae</i>	Raíces de arroz	Zhao et al., 2017
<i>R. helianthi</i>	Raíces del girasol	Wei et al., 2015
<i>R. populi</i>	<i>Populus euphratica</i>	Rozahon et al., 2014
<i>R. smilacinae</i>	Hojas de <i>Smilacina japonica</i>	Zhang et al., 2014
<i>R. lemnae</i>	<i>Lemna aquinoctialis</i>	Kittiwongwattana et al., 2014

Tabla 9. Diferentes especies del género *Ensifer* (*Sinorhizobium*) y su planta hospedadora. Tabla obtenida y actualizada de Menéndez-Gutiérrez (2014)

<i>Ensifer</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>E. chiapanecum</i>	<i>Acaciella</i>	Rincón-Rosales et al., 2009
<i>E. psoraleae</i>	<i>Psoralea corylifolia</i> , <i>Sesbania cannabina</i>	Wang et al., 2013
<i>E. sesbaniae</i>	<i>Sesbania cannabina</i> , <i>Medicago lupulina</i>	Wang et al., 2013
<i>E. morelense</i>	<i>Medicago lupulina</i> , <i>Leucaena leucocephala</i>	Wang et al., 2002; Wang et al., 2013
<i>E. americanum</i> (<i>E. morelense</i>)	<i>Acacia</i> sp.	Toledo et al., 2003; Wang et al., 2013
<i>E. arboris</i>	<i>Acacia</i> sp., <i>Prosopis chilensis</i>	Nick et al., 1999; Young et al., 2003
<i>E. fredii</i>	<i>Glycine max</i>	Scholla & Elkan, 1984; Jarvis et al., 1992; Young 2003
<i>E. garamanticus</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>Argyrolobium uniflorum</i>	Merabet et al., 2010

Introducción

<i>Ensifer</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>E. indiaense</i>	<i>Sesbania rostrate</i> , <i>Abruz pecalorium</i>	Ogasawara et al., 2003
<i>E. kostiensis</i>	<i>Acacia</i> sp., <i>Prosopis chilensis</i>	Nick et al., 1999; Young et al., 2003
<i>E. kummerowiae</i>	<i>Kummerowia stipulacea</i>	Wei et al., 2002; Young, 2003
<i>E. medicae</i>	<i>Medicago truncatula</i>	Rome et al., 1996; Young, 2003
<i>E. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	Dangeard, 1926; de Lajudie et al., 1994; Young, 2003
<i>E. mexicanus</i>	<i>Acacia angustissima</i>	Lloret et al., 2007
<i>E. adhaerens</i>	<i>Lotus arabicus</i>	Casida, 1982
<i>E. numidicus</i>	<i>Argyrolorium uniflorum</i> , <i>Lotus criticus</i>	Merabet et al., 2010
<i>E. saheli</i>	<i>Acacia</i> sp., <i>Sesbania</i> sp.	deLajudie et al., 1994; Young, 2003
<i>E. sojae</i>	<i>Glycine max</i>	Li et al., 2011
<i>E. terangaie</i>	<i>Acacia</i> sp., <i>Sesbania</i> sp.	deLajudie et al., 1994; Young, 2003
<i>E. glycinis</i>	<i>Glycine</i> sp.	Yan et al., 2016
<i>E. shofinae</i>	<i>Glycine max</i>	Chen et al., 2017
<i>E. alkalisoli</i>	<i>Sesbania cannabina</i>	Li et al., 2016
<i>E. collicola</i>	Suelo	Jang et al., 2017

Tabla 10. Diferentes especies del género *Bradyrhizobium* y su planta hospedadora. Tabla obtenida y actualizada de Menéndez-Gutiérrez (2014).

<i>Bradyrhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>B. canariense</i>	<i>Genista</i> sp., <i>Chamaecytisus proliferans</i>	Vinuesa et al., 2005
<i>B. denitrificans</i>	<i>Aeschynomene indica</i>	Van Berkum et al., 2011; Hirsch & Müller, 1985
<i>B. daqingense</i>	<i>Glycine max</i>	Wang et al., 2013
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i>	Kuykendall et al., 1992
<i>B. iriomotense</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	Islam et al., 2008
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Jordan, 1982
<i>B. jicamae</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena et al., 2009
<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine max</i>	Xu et al., 1995
<i>B. pachyrhizi</i>	<i>Pachyrhizus erosus</i>	Ramírez-Bahena et al., 2009
<i>B. cytisi</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune et al., 2011
<i>B. huanghuaihaiense</i>	<i>Glycine max</i>	Zhang et al., 2012
<i>B. lablabi</i>	<i>Arachis hypogaea</i> , <i>Lablab purpureus</i>	Chang et al 2011

<i>Bradyrhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>B. arachidis</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Wang et al., 2013 ^b
<i>B. diazoefficiens</i>	<i>Glycine max</i>	Delamuta et al., 2013
<i>B. ganzhouense</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Lu et al., 2014
<i>B. icense</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Duran et al., 2014
<i>B. manausense</i>	<i>Vigna unguiculate</i>	Silva et al., 2014
<i>B. paxllaeri</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>	Duran et al., 2014 ^a
<i>B. retamae</i>	<i>Retama</i> sp.	Guerrouj et al., 2013
<i>B. rifense</i>	<i>Cytisus villosus</i>	Chahboune et al., 2012
<i>B. vignae</i>	<i>Vigna</i> y <i>Arachis</i>	Grönemeyer et al., 2016
<i>B. stylosanthis</i>	<i>Stylosanthes</i> sp	Delamuta et al., 2016
<i>B. neotropiale</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Zilli et al., 2014
<i>B. ingae</i>	<i>Inga laurina</i>	da Silva et al., 2014
<i>B. kavangense</i>	<i>Vigna unguiculate</i> y <i>Vigna subterranea</i>	Grönemeyer et al., 2015
<i>B. subterraneum</i>	<i>Vigna subterranean</i>	Grönemeyer et al., 2015 ^b
<i>B. tropiciagri</i>	<i>Neonotonia wightii</i>	Delamuta et al., 2015
<i>B. embrapense</i>	<i>Desmodium heterocarpon</i>	Delamuta et al., 2015
<i>B. brasilense</i>	Suelo tropical de Brasil	da Costa et al., 2017
<i>B. viridifuturi</i>	<i>Centrosema pubescens</i>	Helene et al., 2015
<i>B. forestalis</i>	<i>Inga</i> sp	da Costa et al., 2018
<i>B. guangdongense</i>	Maní	Li et al., 2015
<i>B. guangxiense</i>	Maní	Li et al., 2015
<i>B. valentinum</i>	<i>Lupinus mariae</i>	Durán et al., 2014 ^b
<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. centrosemae</i>	<i>Centrosema</i>	Ramírez-Bahena et al., 2016
<i>B. americanum</i>	<i>Centrosema</i>	Ramírez-Bahena et al., 2016
<i>B. mercantei</i>	<i>Deguelia costata</i>	Helene et al., 2017
<i>B. cajani</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Araújo et al., 2017
<i>B. ganzhouense</i>	<i>Acacia melanoxylon</i>	Lu et al., 2014
<i>B. namibiense</i>	<i>Lablab purpureus</i>	Grönemeyer et al., 2017
<i>B. sacchari</i>	Caña de azúcar	de Matos et al., 2017
<i>B. centrolobii</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Michel et al., 2017
<i>B. macuxiense</i>	<i>Centrolobium paraense</i>	Michel et al., 2017

Tabla 11. Diferentes especies del género *Azorhizobium* y su planta hospedadora. Tabla obtenida y actualizada de Menéndez-Gutiérrez (2014).

<i>Azorhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988
<i>A. doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	de Souza Moreira et al., 2006

<i>Azorhizobium</i>	Planta Hospedera	Referencia
<i>A. johannense</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Moreira et al., 2002
<i>A. oxalatifilum</i>	<i>Rumex</i>	Lang et al., 2013

5.2.1. Género *Mesorhizobium*

Jarvis y colaboradores describieron este género en 1997 al transferir las especies *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* y *Rhizobium tianshanense* a un nuevo género denominado *Mesorhizobium*. Las especies de este género pueden establecer una simbiosis para la fijación de nitrógeno con diferentes leguminosas de diversas zonas como las templadas, tropicales, subtropicales y árticas (Laranjo et al., 2014). Algunas cepas del género *Mesorhizobium* poseen un rango pequeño de plantas hospedadoras, como *M. ciceri* o *M. mediterraneum*, capaces de nodular únicamente garbanzo; en contraste, *M. plurifarum* o *M. tianshanense* e son capaces de nodular diferentes géneros de leguminosas.

Algunas de las especies de *Mesorhizobium* tienen una gran importancia agrícola, empleándose como biofertilizantes de importantes cultivos, como el garbanzo, importante en la dieta humana, y la biserrula (*Biserrula pelecinus*) una planta utilizada como forraje de alta calidad que puede ser cultivada en distintos tipos de suelos y bajo diferentes condiciones de pH. La utilización de *Mesorhizobium* en biserrula en Australia, donde las poblaciones nativas de cepas del suelo no podían nodular esta planta, supuso un importante incremento en los rendimientos de este cultivo (Howieson & Ballard, 2004; Laranjo et al., 2014). Además, Nandasena et al. (2007) mostraron que los nódulos de esta planta eran ocupados por la cepa inoculada e identificaron nuevos aislados capaces de nodularlas, aunque estas nuevas cepas eran menos eficientes, demostrando la transferencia horizontal de genes desde las cepas inoculadas a cepas nativas del suelo (Laranjo et al., 2014).

Hasta febrero de 2018 se han descrito 47 especies de *Mesorhizobium* mostradas en la tabla 12. La mayoría de las especies de *Mesorhizobium* son capaces de nodular y fijar nitrógeno atmosférico de manera simbiótica con varias leguminosas. Algunas de estas especies tienen alguna peculiaridad como *M. thiogangeticum* la cual es una bacteria quimiolitotrofica oxidante de azufre, para la que no se ha identificado ninguna planta huésped. Otra especie característica es *M. metalidurans* un simbiote capaz de tolerar metales pesados como el zinc y el cadmio (Vidal et al., 2009).

Tabla 12. Diferentes especies del género *Mesorhizobium* y su planta hospedera. Tabla obtenida y actualizada de Laranjo et al., 2014.

<i>Mesorhizobium</i>	Cepa	Planta Hospedera	Referencia
<i>M. abyssinicae</i>	AC98c ^T	<i>Acacia abyssinica</i> /A. <i>tortilis</i>	Degefu et al. (2013)
<i>M. albiziae</i>	CCBAU 61158 ^T	<i>Albizia kalkora</i>	Wang et al. (2007)
<i>M. alhagi</i>	CCNWXJ12-2 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al. (2010)
<i>M. amorphae</i>	ACCC 19665 ^T	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al. (1999)
<i>M. australicum</i>	WSM2073 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>M. camelthorni</i>	CCNWXJ 40-4 ^T	<i>Alhagi sparsifolia</i>	Chen et al. (2011)

<i>Mesorhizobium</i>	Cepa	Planta Hospedera	Referencia
<i>M. caraganae</i>	CCBAU 11299 ^T	<i>Caragana microphylla</i>	Guan et al. (2008)
<i>M. chacoense</i>	LMG 19008 ^T	<i>Prosopis alba</i>	Velázquez et al. (2001)
<i>M. ciceri</i>	UPM-Ca ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al. (1994)
<i>M. gobiense</i>	CCBAU 83330 ^T	<i>Oxytropis glabra</i>	Han et al. (2008)
<i>M. hawassense</i>	AC99b ^T	<i>Sesbania sesban</i>	Degefu et al. (2013)
<i>M. huakuui</i>	CCBAU 260 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al. (1991)
<i>M. loti</i>	NZP 2213 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Jarvis et al. (1982)
<i>M. mediterraneum</i>	UPM-Ca3 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al. (1995)
<i>M. metallidurans</i>	STM 2683 ^T	<i>Anthyllis vulneraria</i>	Vidal et al. (2009)
<i>M. muleiense</i>	CCBAU 83963 ^T	<i>Cicer arietinum</i>	Zhang et al. (2012)
<i>M. opportunistum</i>	WSM2075 ^T	<i>Biserrula pelecinus</i>	Nandasena et al. (2009)
<i>M. plurifarum</i>	ORS 1032 ^T	<i>Acacia senegal</i>	de Lajudie et al. (1998)
<i>M. qingshengii</i>	CCBAU 33460 ^T	<i>Astragalus sinicus</i>	Zheng et al. (2013)
<i>M. robiniae</i>	CCNWYC 115 ^T	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Zhou et al. (2010)
<i>M. sangaii</i>	SCAU7 ^T	<i>Astragalus luteolus</i>	Zhou et al. (2013)
<i>M. septentrionale</i>	SDW014 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al. (2004)
<i>M. shangrilense</i>	CCBAU 65327 ^T	<i>Caragana bicolor</i>	Lu et al. (2009)
<i>M. shonense</i>	AC39a ^T	<i>Acacia abyssinica</i>	Degefu et al. (2013)
<i>M. silamurunense</i>	CCBAU 01550 ^T	<i>Astragalus membranaceus</i>	Zhao et al. (2012)
<i>M. tamadayense</i>	Ala-3 ^T	<i>Anagyris latifolia</i>	Ramirez-Bahena et al. (2012)
<i>M. tarimense</i>	CCBAU 83306 ^T	<i>Lotus frondosus</i>	Han et al. (2008)
<i>M. temperatum</i>	SDW018 ^T	<i>Astragalus adsurgens</i>	Gao et al. (2004)
<i>M. thiogangeticum</i>	SJT ^T	(<i>Clitoria ternatea</i>)	Ghosh and Roy (2006)
<i>M. tianshanense</i>	A-1BS ^T	<i>Glycyrrhiza pallidiflora</i>	Chen et al. (1995)
<i>M. waimense</i>	ICMP 19557 ^T	<i>Sophora longicarinata</i>	De Meyer et al., 2015
<i>M. cantuariense</i>	ICMP 19515 ^T	<i>Sophora microphylla</i>	De Meyer et al., 2015
<i>M. erdmanii</i>	USDA 3471 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al., 2015
<i>M. jarvisii</i>	ATCC 33669 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Martínez-Hidalgo et al., 2015
<i>M. calcicola</i>	ICMP 19560 ^T	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., 2016
<i>M. waitakense</i>	ICMP 19523 ^T	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., 2016
<i>M. sophorae</i>	ICMP 19535 ^T	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., 2016
<i>M. newzealandense</i>	ICMP 19545 ^T	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., 2016
<i>M. kowhaii</i>	ICMP 19512 ^T	<i>Sophora</i>	De Meyer et al., 2016
<i>M. acaciae</i>	RITF741 ^T	<i>Acacia melanoxylon</i>	Zhu et al., 2015
<i>M. soli</i>	NHI-8 ^T	<i>Robinia pseudoacacia</i>	Nguyen & Kim, 2015
<i>M. olivaresii</i>	CPS13 ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Lorite et al., 2016

<i>Mesorhizobium</i>	Cepa	Planta Hospedera	Referencia
<i>M. sediminum</i>	YIM M12096 ^T	Sedimentos profundos marinos	Yuan et al., 2016
<i>M. helmanticense</i>	CSLC115N ^T	<i>Lotus corniculatus</i>	Marcos-García et al., 2017
<i>M. oceanicum</i>	B7 ^T	Sedimentos profundos marinos	Fu et al., 2017
<i>M. hungaricum</i>	UASWS1009	No descrito	Crovadore et al., 2016
<i>M. zhangyense</i>	23-3-2 ^T	<i>Thermopsis lanceolate</i>	Xu et al., 2017
<i>M. japonicum</i>	MAFF 303099 ^T	<i>Lotus</i>	Martínez-Hidalgo et al., 2016

6. Cultivos de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) y *Triticum aestivum* L. (trigo)

6.1. Importancia de los cultivos de garbanzo y trigo en el mundo y España

Las leguminosas entre las que destacan soja, guisante, trébol, lenteja, garbanzo, alfalfa y judías, son una de las fuentes principales de alimentación a nivel mundial. Conforme a la dieta humana las leguminosas son el segundo cultivo agrícola de mayor importancia, luego de los cereales (Laranjo et al., 2008). Este grupo de plantas representan el tercer grupo más grande de las angiospermas y el segundo cultivo de alimento y forraje que se cultiva en el mundo. Del total de las tierras cultivables, las leguminosas comprenden un 12-15% de éstas, produciendo el 25% a nivel mundial de cultivos primarios. Anualmente se producen unos 270 millones de toneladas en granos de leguminosas. Otros cultivos como la soja y la *Pongamia pinnata* han despertado el interés ya que el alto contenido de aceite en las semillas es fuente para la producción de biocombustibles (Ferguson et al., 2010; Scott et al. 2008).

Los cultivos de leguminosas en España son de gran importancia y de interés especial para su población. Según datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de los años 2014/2015, del total de leguminosas cultivadas en España, la Comunidad de Castilla y León es la segunda comunidad que más superficie cultiva y la segunda que más produce, luego de Castilla la Mancha. La producción de leguminosas en ese periodo de tiempo fue 26% de la producción del país, figura 10. España dedica aproximadamente más de 275.000 hectáreas para este tipo de cultivo, generando más de 220.000 toneladas. Ahora bien, si analizamos la estadística luego de 2 años, la Comunidad de Castilla y León mantiene una segunda posición, sin embargo, en ese periodo ha sido la Comunidad que más ha crecido en este tipo de cultivos. En superficie cultivable aumentó de 23% a 30% y en producción de un 26% a 34%. Otro dato destacable en la producción de leguminosas en toda España es que el área superficial se ha reducido, de 275.039 ha a 231.207 ha, sin embargo, la producción ha aumentado de 220.182 toneladas hasta 273.379 toneladas, por consiguiente, se ha logrado aumentar su rendimiento en este periodo de tiempo.

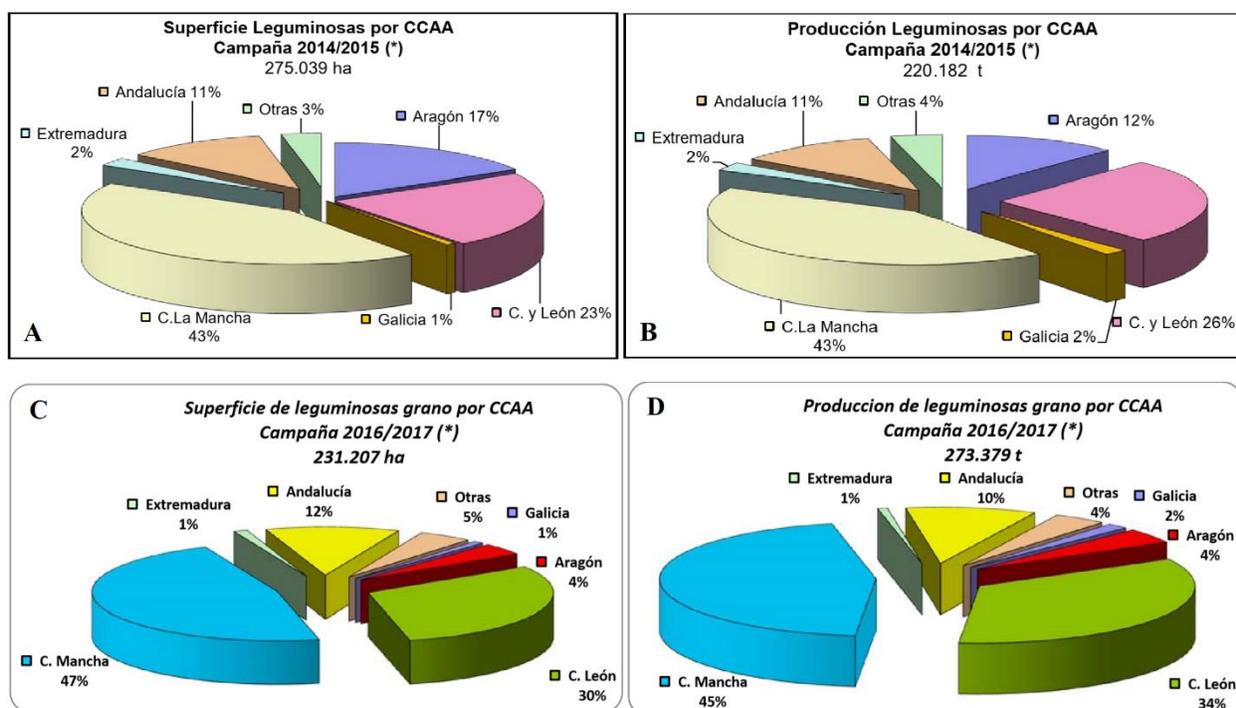


Figura 10. Producción de leguminosas en España. A y B en el periodo de 2014/2015; C y D el periodo de 2016/2017; A y C área superficial de cultivo dedicada a las leguminosas por Comunidad Autónoma; B y D producción de leguminosas por Comunidad Autónoma de España. Gráficos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es uno de los cultivos de leguminosas más importantes del mundo, siendo la tercera leguminosa más cultivada (Laranjo et al., 2008). Ésta es sembrada en: Las Américas, cuenca del Mediterráneo, este de África, Medio Oriente, Asia y Oceanía. El garbanzo es esencial en la dieta nutricional humana en algunos países como India, Medio Oriente y en la cuenca Mediterránea. De hecho, es el suplemento proteico de dietas basadas en cereales de algunos países en desarrollo (Laranjo et al., 2008). La producción de garbanzo es de 12 millones de toneladas, siendo India el mayor productor con el 70% de la producción mundial. Dicha producción a nivel mundial de garbanzo se estima que continuará aumentando (Sharma et al., 2013; Laranjo et al., 2014; Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España).

Una característica primordial para este cultivo es que el grano del garbanzo es una fuente importante de proteínas, aceites, vitaminas y micronutrientes. Sin embargo, a pesar de su importancia agrícola, es una de las leguminosas menos estudiadas, (Khan et al., 2010). Por lo tanto, la simbiosis garbanzo-rizobio no se ha estudiado en profundidad, ya que el garbanzo no es considerado un sistema modelo (Pereira, 2010).

Cicer arietinum L. es una planta de raíces profundas, de tallo veloso y fuerte. Este tallo posee muchas ramificaciones llegando a tener hasta unos 0,6m de altura. Sus hojas son pubescentes, compuestas y paripinnadas con 6 a 8 folíolos aserrados. Sus flores son axilares solitarias. El fruto

Introducción

de esta planta son legumbres redondeados con valvas coriáceas de una o dos semillas en su interior. Estas semillas pueden mostrar algo de rugosidad con dos cotiledones que terminan en forma de pico. Las características de esta planta se pueden ver en figura 11.

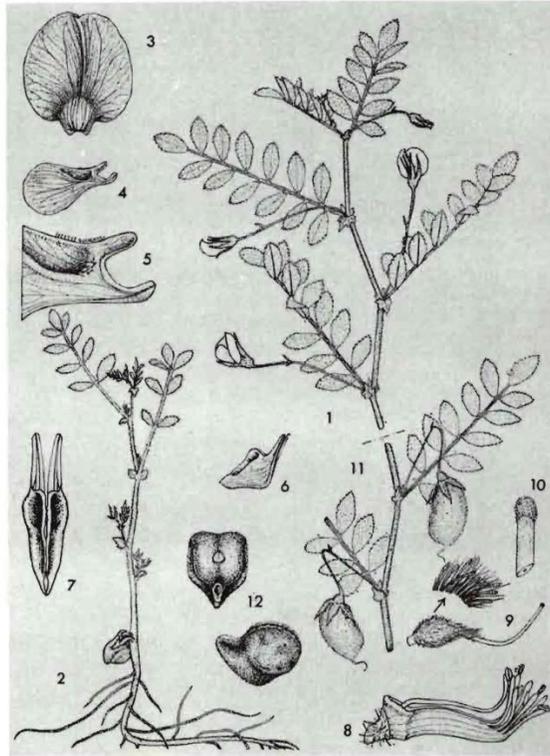


Figura 11. Características morfológicas de la planta *Cicer arietinum* L. 1-tallo; 2-plántula; 3-estandarte; 4-ala; 5-detalle del ala; 6-quilla, vista lateral; 7-quilla, vista dorsal; 8-anteras; 9-ovario; 10-estilo y estigma; 11-rama fructífera; 12-semilla. Imagen obtenida de Govantes & Montañez, 1982.

Una vez destacada la importancia mundial del garbanzo, ahora nos centraremos de su producción en España y Europa. En el caso de Europa, el garbanzo es la cuarta leguminosa más cultivada por área superficial y producción tras la veza, judías secas y lentejas, conforme los datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España durante los periodos desde 2010 a 2014. A nivel europeo, entre 2010 y 2014 la media de superficie anual cultivada fueron 44.147 ha para una producción de 44.856 toneladas y entre los años 2014 al 2016 es la tercera leguminosa más cultivada por área superficial y en producción del país.

La mayoría del garbanzo importado a la Unión Europea y España proviene de México, Estados Unidos y Argentina. Si evaluamos las importaciones de granos de leguminosas en España se puede apreciar que la media de granos de garbanzo importados entre el periodo de 2010 a 2015 se encuentra en segundo lugar, luego de las lentejas (importadas principalmente de Canadá y Estados Unidos). Por consiguiente, el identificar buenas interacciones con microorganismos que aumente

el rendimiento de garbanzo (y/o lentejas) se podrá reducir la importación favoreciendo la economía local. La figura 12 muestra los principales granos de leguminosas importados a España.

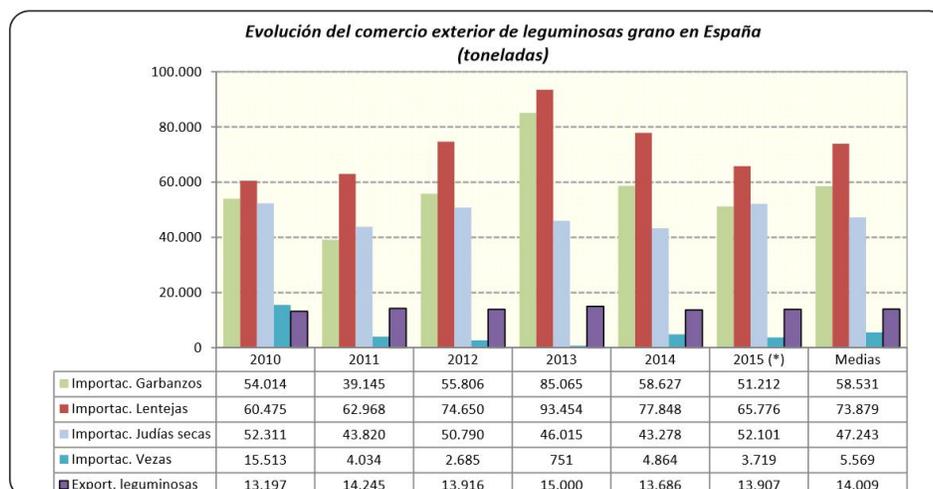


Figura 12. Cantidad de granos de plantas de leguminosas importados y exportados en España. Figura obtenida del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

Los datos de producción de garbanzo en España según los últimos datos Provinciales presentados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España, los cuales corresponden al año 2015, se muestran en la tabla 13. La Comunidad con mayor producción superficie de cultivo y producción de grano de garbanzo es Andalucía y, en segundo lugar, se encuentra Castilla y León. Cabe destacar que, dentro de Castilla y León, Salamanca es la provincia con mayor cultivo y producción de garbanzo, tabla 14. Salamanca produce el 34,7% del total de garbanzo producido en la Comunidad. A nivel de España, la provincia salmantina produce el 7,52% (2057 ha), siendo la cuarta provincia en producción del país. Las provincias que más producen garbanzo son Sevilla, Cádiz y Málaga con 7078 ha, 2850 ha y 2253 ha, respectivamente.

Tabla 13. Cantidad y porcentajes de cultivo y producción de garbanzo por Comunidad Autónoma española. Datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (2015).

Comunidad Autónoma	Superficie (ha)	Porcentaje Superficial en España	Producción (toneladas)	Porcentaje Superficial en España
Galicia	17	0,05%	16	0,06%
País Vasco	32	0,09%	31	0,11%
Navarra	45	0,12%	43	0,16%
La Rioja	21	0,06%	32	0,12%
Aragón	208	0,55%	169	0,62%
Cataluña	223	0,59%	161	0,59%

Introducción

Comunidad Autónoma	Superficie (ha)	Porcentaje Superficial en España	Producción (toneladas)	Porcentaje Superficial en España
Baleares	392	1,04%	272	1,00%
Castilla y León	9537	25,18%	5922	21,65%
Madrid	424	1,12%	289	1,06%
Castilla La Manca	5457	14,41%	2586	9,46%
Cominidad Valenciana	15	0,04%	10	0,04%
Región de Murcia	9	0,02%	4	0,02%
Extremadura	2768	7,31%	2129	7,79%
Andalucía	18698	49,38%	15670	57,30%
Canarias	23	0,06%	14	0,05%
España	37869	100%	27348	100%

Tabla 14. Cantidad y porcentajes de cultivo y producción de garbanzo en las provincias de Castilla y León. Datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (2015).

Provincia	Superficie (ha)	Porcentaje Superficial en España	Producción (toneladas)	Porcentaje Superficial en España
Ávila	210	2,20%	107	1,81%
Burgos	304	3,19%	214	3,61%
León	712	7,47%	632	10,67%
Palencia	317	3,32%	270	4,56%
Salamanca	3546	37,18%	2057	34,74%
Segovia	246	2,58%	182	3,07%
Soria	140	1,47%	64	1,08%
Valladolid	2508	26,30%	1772	29,92%
Zamora	1554	16,29%	624	10,54%
Castilla y León	9537	100%	5922	100%

Cabe destacar que la producción de garbanzo en España durante los pasados 25 años ha variado. En primer lugar, en los últimos 10 años la superficie de cultivo ha disminuido aproximadamente 20.000 hectáreas, al compararla con el periodo 1995-2005. De igual manera, la producción de garbanzo en toneladas en los últimos 10 años ha disminuido al compararse con la producción 1994-2004, figura 13A y 13B. Por otro lado, el rendimiento, superficie en producción, en casi la última década ha sido la mejor de los últimos 20 años, figura 13C. Por último, el valor en los últimos años ha disminuido, figura 13D, tendencia observada en el mismo periodo en que disminuyó la cantidad superficial de cultivo y disminución en la producción.

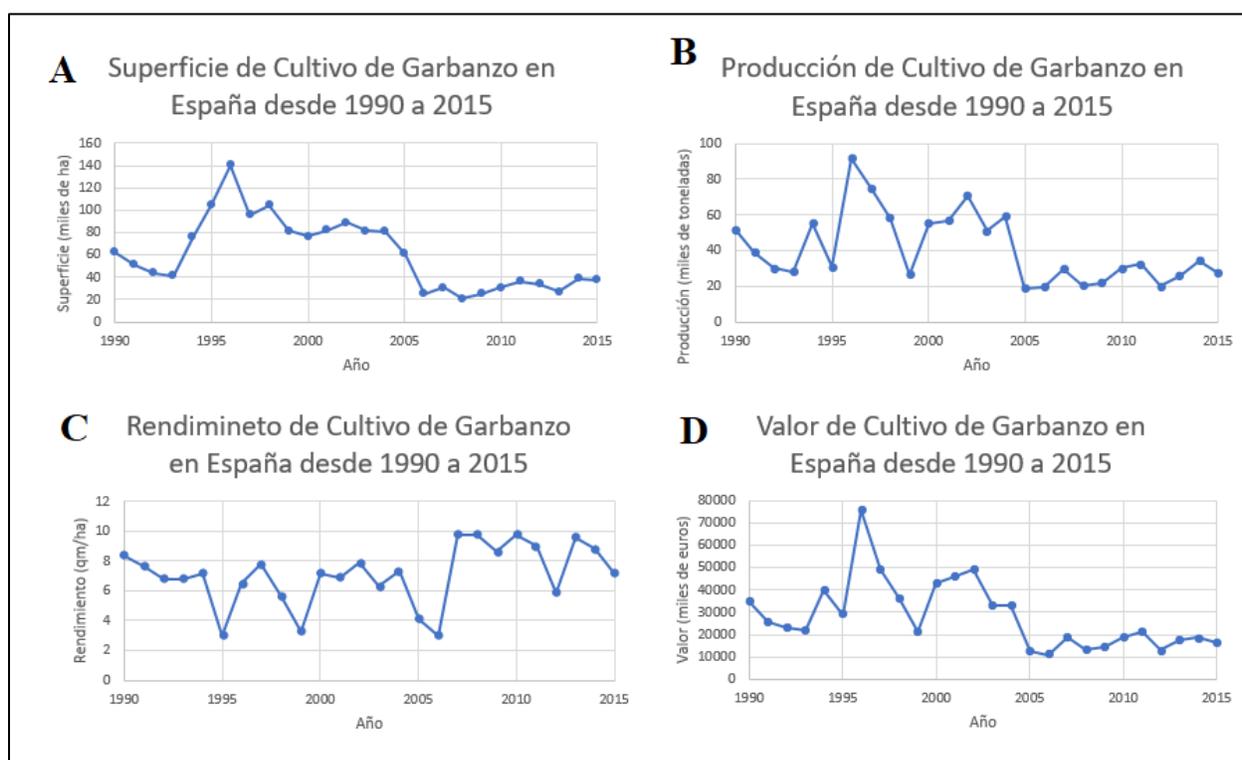


Figura 13. Superficie de cultivo y la producción de garbanzo en España desde 1990 hasta 2015. Gráfico desarrollado de datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

Por otro lado, como se ha mencionado, los cereales son el principal cultivo agrícola y es un cultivo que, en muchas ocasiones, se se tiende a rotar con cultivos de leguminosas, lo cual mejora los rendimientos de los cereales. Esto es debido a que las leguminosas tienden a aumentar la cantidad de nitrógeno presente en el suelo, por la relación simbiótica rizobio-leguminosa. Este nitrógeno que es aprovechado por cultivos que sean sembrados posteriormente en el mismo terreno donde se encontraban las leguminosas. De hecho, se ha reportado porcentajes de aumento de rendimientos de 50 – 80% en cereales que fueron precedidos por leguminosas (Herridge et al., 1995), al ser comparados con cultivos de cereales precedidos por otros cereales. Estimaciones determinan que esa rotación leguminosa – cereal equivale al aporte de entre un 5 a 100kg/ha del

fertilizante químico nitrogenado. Además, se ha atribuido la capacidad de control de enfermedades y plagas a esta rotación de cereales con leguminosas (Herridge et al., 1995).

En España se produjeron casi 19 millones de toneladas de cereales en el año 2016 (últimos datos provistos por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España). El cultivo de cereales en suelo español y su producción se muestra en la figura 14, donde se destaca la Comunidad de Castilla y León como aquella con una mayor superficie dedicada a la de cereales en España, así como aquella en la que la cantidad de producción de este cultivo es mayor. Por otro lado, la importación de los cereales en España está mostrando una tendencia al alza, en el periodo 2013/2014 se produjo 9.930.000t, mientras que en el periodo 2015/2016 fue 15.070.000t, un aumento en importaciones de 34,12% en 2 años.

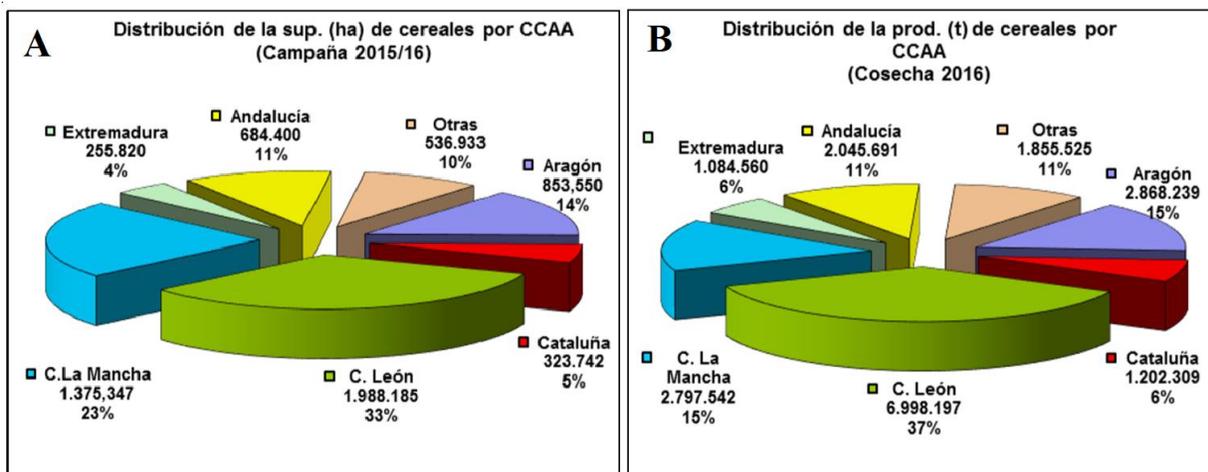


Figura 14. Distribución de: A, el cultivo; B, la producción de cereales en España por Comunidad Autónoma durante el periodo 2015/2016. Gráficos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

En este sentido, es importante identificar cultivos cerealistas de importancia a nivel mundial, y en España que sean capaces que ser aprovechados para ser rotados con leguminosas, en este caso, con garbanzo, a fin de aumentar los rendimientos del cereal.

Entre los cereales, el trigo (*Triticum* sp.) es uno de los más importantes, después del maíz y el arroz. El trigo es cultivado bajo diversas condiciones climáticas y ha sido el alimento principal de las civilizaciones de Europa, Asia y el Norte de África por más de 8.000 años. En el 2017 su producción alcanzó más de 600 millones de toneladas en el mundo, según datos de la FAO. Además de servir como alimento, el trigo se puede utilizar para la alimentación animal, producción de almidón y etanol. Las características de las plantas de trigo se describen a continuación. Las raíces pueden sobrepasar el metro de profundidad, donde la mayoría del sistema radicular se encuentra en los primeros 25cm. Posee un tallo con 6 nudos donde la altura y solidez de éste determinan la resistencia al encalado. Sus hojas están en posiciones alternas y son de tipo cintiformes, lanceolada y terminada en punta, sus hojas miden entre 0,5 a 1 cm de ancho y una longitud de 15 a 25 cm. Posee una inflorescencia tipo espiga compuesta de un tallo central de

entrenudos cortos (raquis) en cada nudo hay una espiguilla protegida por brácteas. Puede tener unas 9 flores de las que se pueden perder y quedar entre 2 a 4. El tipo de fruto es un canópside seco pericarpo soldado al tegumento, el endospermo contiene las sustancias de reserva y son la masa principal del grano según datos de MAPAMA. Las características de una planta de trigo se muestran en la figura 15.

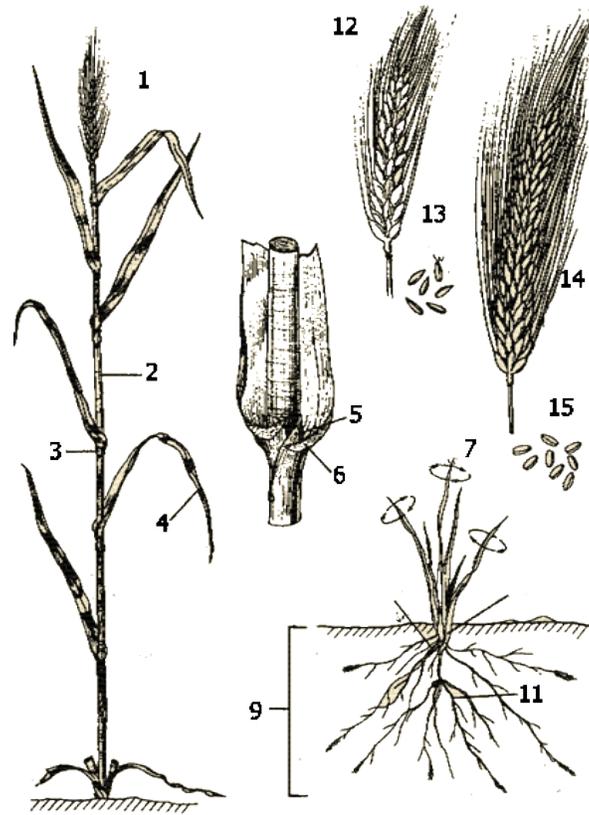


Figura 15. Características morfológicas de la planta de trigo (*Triticum* sp. L.). 1 – planta de trigo, 2 – tallo, 3 – nudo, 4 – hoja, 5 – lígula, 6 – aurícula, 7 – Plántula, 9 – raíces secundarias, 11 – raíces primarias, 12 – espiga de trigo macarrón, 13 – granos de trigo macarrón, 14 – espiga de trigo común y 15 – granos de trigo común. Imagen obtenida de la Morfología de la Planta, Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo de México.

En relación a la producción agrícola de trigo en España a lo largo del tiempo, en los últimos 25 años no se han producido variaciones considerables en la cantidad de superficie dedicada a este cultivo, como muestra la figura 16A. En cambio, la producción de este grano de este cereal sí que muestra una tendencia al alza, aunque la pendiente de esa tendencia es muy baja, como muestra la figura 16B. De forma similar a la producción se observa un aumento del rendimiento (figura 16C). Finalmente, el valor del cultivo de trigo en España sí que está mostrando un aumento considerable desde el año 2007, como puede observarse en la figura 16D. Así, puesto que el valor de este cultivo está en alza, sería muy interesante aumentar los rendimientos por hectárea de trigo, lo que lo convertiría en un producto muy rentable.

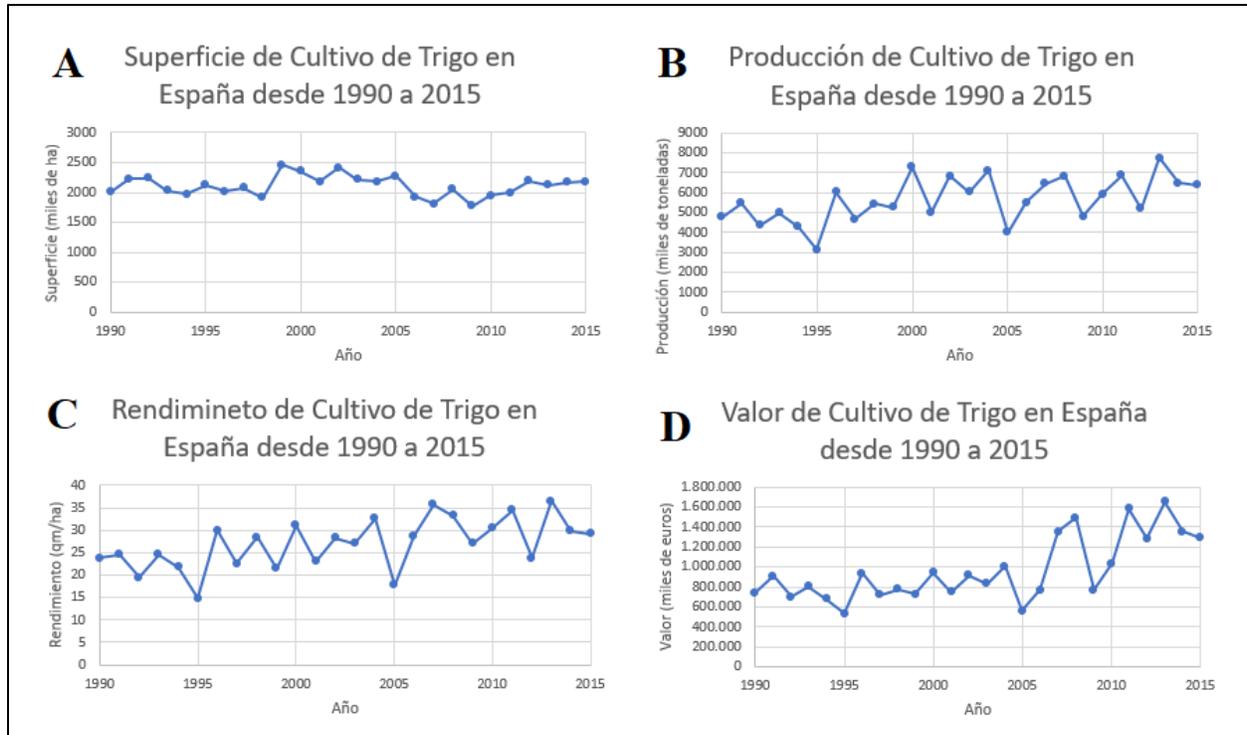


Figura 16. Superficie de cultivo y producción de trigo en España desde 1990 hasta 2015. Gráfico desarrollado de datos obtenidos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

6.2. Relación simbiótica entre el garbanzo y *Mesorhizobium*

Las primeras descripciones de especies que nodulan garbanzo fueron descritas por Nour et al. en 1994 y 1995. En primer lugar, se identificó a *Rhizobium ciceri* y al siguiente año *Rhizobium mediterraneum*. Sin embargo, estas especies fueron reclasificadas por Jarvis y colaboradores (1997) bajo un nuevo género denominado *Mesorhizobium*, junto a otras especies conocidas para entonces como *R. huakuii*, *R. loti* y *R. tianshanense*. Las plantas de garbanzo se consideran hospedadores restringidos para la nodulación; sin embargo, diferentes estudios muestran que varias especies de *Mesorhizobium* son capaces de nodular efectivamente garbanzo (Laranjo et al., 2008; Rivas et al., 2007). La domesticación del garbanzo ha afectado adversamente la simbiosis al reducir la biodiversidad de la planta (L'taief et al., 2007). A pesar de la importancia y el alto valor nutricional de esta leguminosa, existen pocos estudios que reporten la diversidad endofítica albergada en nódulos de garbanzo (L'taief et al., 2007).

No obstante, existe una carencia en investigaciones relacionadas con la simbiosis con garbanzo-rizobia, debida a que son pocos los noduladores o endosimbiontes beneficiosos y a que no se considera una planta modelo a nivel de estudios biológicos: Por ello, es imprescindible alcanzar incrementar los conocimientos actuales de esta simbiosis.

Ya se ha mostrado que la implementación de ciertas cepas rizobiales han logrado incrementar los cultivares de garbanzo en ensayos de campo, incluso bajo condiciones de cámara iluminada

fueron capaces de promover también el crecimiento y que múltiples cepas aumentaron el contenido de nitrógeno total (Laranjo et al 2014; Ben Romdhane et al., 2007; İçgen et al., 2002; Alexandre et al., 2009). Incluso las co-inoculaciones de cepas noduladoras de garbanzo junto como bacterias solubilizadores de fósforo como *Bacillus subtilis* o *Bacillus megaterium*, además del uso de micorrizas han mostrado ser una buena alternativa para incrementar la producción de este cultivo (Laranjo et al 2014; Rudresh et al., 2005; Elkoca et al., 2007). En la India se han co-inoculado en campo cepas de *Mesorhizobium* con *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales aumentaron el rendimiento en grano de las plantas en un 32% al ser comparado con los controles no inoculados (Verma et al., 2013). Además, se cree que la interacción con los rizobios activa la producción de genes implicados en la producción de compuestos fenólicos y fitoalexinas los cuales evitan el desarrollo de enfermedades, incluso se ha probado en garbanzos infectados por *Fusarium* (Laranjo et al 2014; Arfaoui et al., 2006; Arfaoui et al., 2007).

El garbanzo es nodulado principalmente por cepas de *Mesorhizobium mediterraneum*, *Mesorhizobium ciceri* y *Mesorhizobium muleiense*, siendo aisladas estas especies por primera vez de plantas de garbanzo (Nour et al., 1994; Nour et al., 1995; Zhang et al., 2012).

OBJETIVOS

Objetivos

Conforme la situación agrícola actual y los futuros cambios demográficos que se avecinan, la necesidad de aumentar los rendimientos agrícolas mediante métodos sostenibles, resulta imprescindible e ineludible la identificación de nuevas técnicas en la búsqueda de soluciones. En los últimos años se ha visto un nuevo impulso tendente a comprender las interacciones entre las plantas y los microorganismos, a fin de conocer los mecanismos bacterianos y su potencial para mejorar el crecimiento vegetal y extrapolarlo al mundo agrícola. El entender y poder aplicar los conocimientos adquiridos de dichas interacciones, podría solventar en un futuro la necesidad alimentaria presente y que se incrementará conforme a las estimaciones de los datos poblacionales futuros. Por consiguiente, el objetivo general de esta investigación será; estudiar e identificar la diversidad bacteriana presente en nódulos de garbanzo y evaluar su capacidad para promover el crecimiento, desarrollo y producción en plantas de garbanzo y en plantas de trigo con el fin de identificar potenciales biofertilizantes. Para realizar este objetivo general se han desarrollado los siguientes objetivos concretos:

1. Aislamiento, caracterización e identificación de bacterias aisladas de nódulos de raíces de plantas de garbanzo.
2. Estudio y análisis del potencial promotor del crecimiento vegetal de los aislados mediante pruebas *in vitro*.
3. Evaluación de la capacidad de cepas seleccionadas para colonizar raíces de garbanzo y trigo.
4. Estudio de promoción del crecimiento vegetal *in vivo* en plantas de garbanzo inoculadas con cepas seleccionadas.
5. Evaluación de promoción del crecimiento vegetal y producción *in vivo* de plantas de trigo en rotación con plantas de garbanzo inoculadas con cepas seleccionadas.
6. Análisis del genoma de cepas seleccionadas.
7. Estudio de adaptabilidad y simbiosis con garbanzo de cepas filogenéticamente cercanas pero aisladas con 14 años de diferencia en diversas condiciones tropicales y suelos.
8. Análisis de bacterias endófitas de nódulos de garbanzo como agentes de biocontrol contra especies fúngicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

1. Aislamiento de endófitos y endosimbiontes

1.1. Esterilización y pre-germinación de las semillas de garbanzo

En un vaso de precipitado estéril se añadió una cuarta parte de su capacidad de semillas de garbanzo (*Cicer arietinum* L.). Posteriormente se cubrieron con lejía comercial diluida al 50% (hipoclorito de sodio al 2,5%) y se mantuvieron en movimiento durante 20 minutos. Luego se eliminó la lejía y se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril cuya duración es; el primero cinco minutos, del segundo al quinto de 20 minutos.

Después, bajo condiciones de esterilización en una cabina de flujo laminar vertical y utilizando pinzas estériles, se colocaron en placas Petri de agar-agua 1,5% (Tabla 15), manteniendo una pequeña distancia entre las semillas. Las placas con las semillas se cubrieron con papel de aluminio e incubaron a 28°C durante 72 horas.

Tabla: 15 Medio Agar-Agua

Componente	Cantidad
Agar	1,5 gramos
Agua	1 litro

1.2. Utilización de planta trampa para el aislamiento de microorganismos

Para obtener la colección de microorganismos de este estudio, se rellenaron macetas de un litro con suelo procedente de la localidad de Fuentesauco, Zamora, España (41.230873, -5.488914). Por cada maceta se colocaron dos semillas estériles y pre-germinadas (como se describen en 1.1) a una profundidad de aproximadamente 3cm. Las macetas se colocaron en una cámara iluminada a una temperatura de 22°C, 50-60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. El periodo de riego fue de cada tres días con agua destilada estéril.

1.3. Aislamiento de microorganismos procedentes de las plantas trampas

Se recolectaron las plantas a los 42 días (antes de la floración) y sus raíces se lavaron con agua para eliminar los restos de suelo. Posteriormente, se seleccionaron y aislaron los nódulos de las plantas de *Cicer arietinum* L. Bajo condiciones asépticas se esterilizaron superficialmente los nódulos con HgCl₂ al 2,5% durante 2 minutos, seguido de cinco lavados con agua destilada estéril durante 5 minutos cada uno. Los nódulos se maceraron con una varilla de vidrio y tras el macerado se cultivó el contenido de dichos nódulos en placas con medio YMA (“Yeast mannitol agar”) (tabla 16) e YED-P (tabla 17). Las muestras se incubaron durante 5 – 15 días a 28°C. Las diferentes colonias de microorganismos obtenidas en las placas se aislaron y purificaron por agotamiento en estría.

Tabla 16. Medio YMA

Componente	Cantidad (g/L)
K₂HPO₄ (Panreac[®])	0,2
MgSO₄ · 7H₂O (Panreac[®])	0,2
Manitol (Panreac[®])	7,0
Extracto de levadura (Bacto BD[®])	2,0
Agar (Conda[®])	20,0

Tabla 17. Medio YED-P

Componente	Cantidad (g/L)
Glucosa	7,0
Extracto de levadura (Bacto BD[®])	3,0
CaHPO₄	3,0
Agar (Conda[®])	20,0

1.4. Crecimiento en cantidad

Bajo condiciones asépticas se seleccionan cada una de las cepas ya puras y se expande por toda la superficie de la placa Petri con YMA o YED-P. Las mismas se incuban a 28°C por un periodo de 2 – 15 días, dependiendo de cada cepa, hasta obtener buena parte de la superficie del medio de cultivo cubierta de microorganismos.

1.5. Preservación y recuperación de las muestras

Las cepas se preservaron utilizando como agente crioprotector glicerol al 30%. Esta solución se preparó y sirvió en criotubos esterilizándose a 121°C por 20 minutos a 15psi. Células de cada una de las cepas se introdujeron en los criotubos con glicerol y resuspendieron con un vortex. Las muestras se almacenaron a -80°C.

Para recuperar las cepas se seleccionan los viales y se colocan en hielo. Bajo condiciones asépticas se toma la muestra del glicerol y se cultiva en medio de cultivo YMA o YED-P. Las placas se incuban a 28°C por 24 o 48 horas. Transcurrido ese tiempo se toma una muestra de lo crecido y se cultiva en otra placa Petri con YMA o YED-P ya sea por agotamiento en estría o en cantidad (sección 1.4). Ésta se incubaba a 28°C por un periodo de 4 – 7 días.

2. Caracterización fenotípica y genotípica de los aislado

2.1. Caracterización morfológica colonial

Los diferentes endófitos aislados se cultivaron por agotamiento en estría para evaluar su morfología macroscópica. Sus características se basan en el crecimiento en medio YMA (o

YEDP para las actinobacterias) a 28°C durante 7 días. Las características determinadas fueron: color, forma, margen, elevación u otras particularidades.

2.2. Tinción Gram

Las cepas se crecieron en medio de cultivo YMA o YED-P. Se tomó una muestra de la cepa y se colocó sobre una gota de agua destilada en un portaobjetos. La muestra se fijó pasándola ocasionalmente por una llama hasta la evaporación de líquido. El frotis se cubrió con Cristal Violeta durante 2 minutos y se eliminó y, seguidamente, se adicionó Lugol que tras un minuto fue eliminado. Posteriormente se lavó la muestra con alcohol etílico al 95% durante 30 segundos, seguidos de un lavado con agua destilada. Subsecuentemente, el frotis se cubrió con Safranina durante 1 minuto, luego se lavó con agua destilada hasta eliminar los excesos de tinte. Se dejó secar y se observó bajo microscopía óptica utilizando los objetivos de 60 y 100X, distinguiendo la coloración adquirida así como la forma de las células bacterianas.

2.3. Extracción de ADN de los endófitos

2.3.1. Lysis Buffer

Para las técnicas básicas de biología molecular realizadas con las cepas de este estudio, perfiles de ADN y amplificación y secuenciación de genes, la extracción de ADN de los de la mayor parte de los aislados se realizó utilizando una solución de “Lysis Buffer” (tabla 18). Para ello, bajo condiciones asépticas, de esta solución se añaden 50µl a un microtubo y se añaden células de cada cepa bacteriana a extraer el ADN con un asa de 1µl, mezclando muy bien. Los tubos se colocan en termobloque a 95°C durante 15 minutos. Luego se centrifugan a velocidad máxima (14,680rpm) por 15 minutos. Posteriormente se toman 10µl del sobrenadante y se mezclaron en un microtubo nuevo con 90µl de H₂Odd estéril libre de DNAsas. El ADN se almacena a -20°C hasta su uso.

Tabla 18: “Lysis Buffer”

Componente	Cantidad
NaOH	0,2g
Dodecilsulfato sódico (SDS)	0,25g
Agua destilada estéril de gramo molecular (Sigma®)	100ml

2.3.2. Extract-N-Amp™ Plant Tissue PCR Kits

En el caso de las cepas con características de actinobacterias, se extrajo su ADN utilizando el kit Extract-N-Amp™ Plant Tissue PCR Kits (Sigma®), siguiendo las instrucciones del fabricante. En un microtubo se añadió 100µl de “Extraction Solution” y se le adiciona la cepa utilizando un asa de 1µl. Luego se le aplica un vortex y se incuba a 95°C por 10 minutos en un termobloque. Posteriormente se le añadió 100µl de “Dilution Solution”

y se le dio un breve vortex. La mezcla se centrifugó a 6.000 rpm durante 4 minutos. Finalmente se recuperaron 100µl del sobrenadante y se colocaron en un microtubo nuevo, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.4. Perfiles genéticos de RAPD y TP-RAPD

Utilizando tubos para PCR estériles se añadieron los reactivos mostrados en la tabla 19 y colocados en el termociclador bajo las condiciones mostradas en la tabla 20.

Tabla 19: Reactivos para RAPD y TP-RAPD

Componente	Cantidad
GreenTaq (Thermo Fisher Scientific ®)	12,5µl
Primer*	2,5µl
H₂Odd estéril grado molecular (Sigma®)	8,0µl (5,5µl para TP-RAPD)
ADN	2,0µl

* RAPD se utilizó el primer M13 a 20µM (5'-CAGGGTGGCGGTTCT-3') y para TP-RAPD fueron 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1491R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') ambos a 2µM.

Tabla 20. Parámetros de Termociclador

Método	Perfil		
	RAPD	TP-RAPD	
Pre-desnaturalización	95°C 10 min.	95°C 9 min.	
35 ciclos	Desnaturalización	94°C 1 min.	95°C 1 min.
	Anillamiento	45°C 1 min.	50°C 1 min.
	Extensión	72°C 2 min.	
	Extensión final	72°C 7 min.	
Conservación	4°C ∞		

Las muestras se observaron a través de una electroforesis utilizando gel de agarosa al 1,5% (agarosa, Tris Acetate-EDTA buffer 1X de Sigma® y Bromuro de etidio a 0.5µg/ml). A cada carril se le añadieron 25µl de la reacción de PCR y el primer carril 3µl de marcador (GeneRuler® 100bp/1Kb). El periodo de electroforesis fue de 96 minutos a 60V utilizando un suplidor de voltaje. Los geles se fotografiaron utilizando un fotodocumentador (Gel Doc

EZ System de BioRad). Los patrones de bandas generados se evaluaron utilizando el software Bionumerics (Applied Maths, Nv; EEUU).

2.5. Secuenciación de genes: 16S rARN, *recA*, *atpD*, *nodC*, *glnII* y *rpoB*

A un representante de cada grupo se le realizó la amplificación y secuenciación del gen 16SrARN. En el caso de las bacterias rizobiales se secuenciaron los genes *recA*, *atpD*, *nodC*, *glnII* y *rpoB*. Los reactivos utilizados para la PCR se muestran en la tabla 21, la secuencia de los primers en la tabla 22, los parámetros del termociclador en la tabla 23 y las condiciones de electroforesis en la tabla 24.

Tabla 21: Reactivos para RAPD y TP-RAPD

Componente	Cantidad					
	16S rARN	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>nodC</i>	<i>glnII</i>	<i>rpoB</i>
REDTaq® DNA Polymerase	15µl	10µl	15µl	10µl	15µl	
Primer F (2µM)	2,0µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
Primer R (2µM)	2,0µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl	2,5µl
H₂Odd estéril grado molecular (Sigma®)	9,0µl	5,0µl	5,0µl	5,0µl	5,0µl	5µl
ADN	2,0µl	2,0µl	2,5µl	2,0µl	2,5µl	

Tabla 22: Secuencias de los Primers empleados para amplificar los distintos genes

Gen	Primers		Referencia
	Primer Foward	Primer Reverse	
16S rARN	27F: (5'-GCCTGGGGAGTACGGCCGC A-3')	1522R: (5'-AAGGAGGTGATCCANCC RCA-3')	Rivas et al, 2002
<i>recA</i>	RecA-Rh-1F: (5'-CGKCTSGTAGAGGAYAAAT CCGTGGA-3')	RecA-Rh-4R: (5'-CGRATCTGGTTGATGAA GATCACCAT-3')	Ghosh& Roy, 2006
<i>atpD</i>	AtpD-Rh-1F: (5'-SCTGGGSCGYATCMTGAAC GT-3')	AtpD-Rh-3R: (5'-GCCGACACTTCCGAACC NGCCTG-3')	Mousavi et al., 2014
<i>nodC</i>	nodCF: (5'-AYGTHGTYGAYGACGGTTC -3')	nodCI: (5'-CGYGACAGCCANTCKCT ATTG-3')	Wei et al., 2009
<i>glnII</i>	GlnII12F: (5'-YAAGCTCGAGTACATYTGG CT-3')	GlnII689R: (5'-TGCATGCCSGAGCCGTT CCA-3')	Shamseldin et al., 2014
<i>rpoB</i>	rpoB83F: (5'-CCTSATCGAGGTTACACAGA AGGC-3')	RpoB1061R (5'-AGCGTGTTGCGGATATA GGCG-3')	Marek-Kozaczuk et al., 2013

Tabla 23. Parámetros de Termociclador

Método	Perfil						
	16S rARN	<i>recA</i> y <i>atpD</i>	<i>nodC</i>	<i>glnI</i>	<i>rpoB</i>		
Pre-desnaturalización	95°C 9 min.	95°C 9 min.	94°C 10 min.	95°C 9 min.	95°C 5 min.		
35 ciclos	Desnaturalización	94°C 1 min.	94°C 1 min.	94°C 55 seg.	94°C 1 min.	3 ciclos Desn. Anill. Exten.	94°C 2 min. 58°C 2 min. 72°C 1 min.
	Anillamiento	56°C 1 min. 20 seg	53°C 1 min. 20 seg	48,5°C 1 min. 20 seg	54°C 1 min. 10 seg	30 ciclos Desn. Anill. Exten.	94°C 30 seg. 58°C 1 min. 72°C 1 min.
	Extensión	72°C 2 min.	72°C 1 min	72°C 1 min.	72 °C 1 min.		
Extensión final	72°C 7 min.				72°C 5 min.		
Conservación	4,0°C ∞						

Tabla 24. Parámetros de Electroforesis

Componente	Cantidad					
	16S rARN	<i>recA</i>	<i>atpD</i>	<i>nodC</i>	<i>glnI</i>	<i>rpoB</i>
Agarosa	1,2%	1,2%				
Voltaje	70V	70V				
Tiempo	100 min.	106 min.				

2.6. Purificación de banda en gel de agarosa

Las bandas correspondientes a las regiones amplificadas se cortaron utilizando un esarpelo, se colocaron en un microtubo y el ADN se purificó del gel de agarosa utilizando el kit comercial GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit (Thermo Scientific®) según las indicaciones del fabricante.

Para ello, sobre las bandas se añadieron 200µl de “Extraction Buffer”. Éstos se incubaron a 55°C durante 10 – 15 minutos (corroborando que el gel de agarosa estuviera bien disuelto).

Posteriormente se le añadió 200µl de etanol (96-100%) y se mezcló bien. La solución se transfirió a una columna de purificación (“DNA Purification Micro Column”) preensamblada, centrifugando a 14.000xg por 1 minuto y descartando lo eluido. Luego se añaden 200µl de “Prewash Buffer” suplementado con etanol y se centrifuga a las mismas condiciones ya mencionadas, descartando lo eluido. Posteriormente se añadieron 700µl de “Wash Buffer” y se centrifugó, este paso se repite una siguiente vez, siempre descartando lo eluido. Luego la columna se centrifuga sola y es transferida a un nuevo tubo colector y sobre la membrana de ésta se añade 12µl de “Elution Buffer”, subsecuentemente se centrifuga a los parámetros ya descritos. Lo eluido es el gen ya purificado, éste se preserva a -20°C.

2.7. Secuenciación y análisis filogenético del gen 16SrRNA y los housekeeping

Los genes ya purificados son se enviaron al servicio de secuenciación de la compañía Macrogen (Europe). Los fragmentos generados, según fuera el caso, se ensamblaron mediante el programa SeqMan II (DNASTar Software). Los resultados obtenidos se editaron, evaluaron y analizaron utilizando los siguientes programas, servidores, bases de datos: BioEdit (BioEdit 7.2.1, Ibis Bioscience), EzTaxon (EzBioCloud, <http://www.ezbiocloud.net/>) (Yoon, S. H. et al. 2016), Blastn de NCBI y Mega 6.

2.8. Pruebas complementarias para caracterización y descripción de cepas que constituyen nuevas especies

Una vez realizada la caracterización fenotípica y genotípica de las cepas, a aquellas que mostraron indicios de ser nuevas especies se le realizó otra serie de pruebas para determinar si así lo eran.

Para obtener la biomasa bacteriana necesaria para la realización de dichas pruebas, si las cepas eran de género *Mesorhizobium* se utilizó el medio de cultivo TY (Bacto Triptona – 5g/l, extracto de levadura – 3g/l, CaCl₂ · 2H₂O, agar – 20g/l) y se incubaron durante 3 días; y en caso de ser *Domibacillus* el TSA (Sigma®: caseína peptona – 15g/l, Cloruro sódico – 5g/l, peptona de soja – 5g/l y agar 15g/l) e incubaron durante 48 horas, ambos géneros incubados a 28°C, a menos que se indique lo contrario a continuación. Cada prueba fue realizada por triplicado y también se evaluaron las cepas tipo de las especies filogenéticamente más cercanas.

En primer lugar, se evaluó la tolerancia a diferentes temperaturas, en este sentido se evaluó si crecían a 4°C, 10°C, 25°C, 28°C, 37°C y 45°C.

El crecimiento a diferentes pH fue evaluado utilizando los medios antes mencionados, pero sin agar (medios líquidos) en matraces de 100ml e incubados en agitación, el pH fue ajustado con soluciones de K₂HPO₄ y KH₂PO₄. Los rangos de pH evaluados fueron desde 5 hasta 12 (intervalos de 1).

La tolerancia a condiciones salinas se evaluó añadiendo distintas concentraciones de NaCl al medio de cultivo. Las concentraciones evaluadas fueron desde 0% NaCl hasta el 13%, con incrementos del 1%.

Materiales y Métodos

La prueba de catalasa se llevó a cabo añadiendo H₂O₂ al 30% sobre su crecimiento en placa; una producción de burbujas mostraría ser positivo a la presencia de la enzima catalasa (Peix et al., 2003).

La prueba de oxidasa se llevó utilizando el reactivo “N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride”; para esto se impregnó en papel de filtro estéril crecimiento microbiano en su respectivo medio con 24hrs de crecimiento y se añadieron unas gotas del reactivo. Una tonalidad azul-violeta indica resultado positivo.

Para la descripción de la nueva especie de *Domibacillus* se analizó la hidrólisis de almidón (Seiler & Scherer, 2003). La cepa fue crecida en Agar Nutritivo (Sigma®) suplementado con 1,5 y 10g/L de almidón soluble (Sigma®). Pasadas 72hrs de crecimiento, se eliminó el crecimiento microbiano de la placa con agua destilada y posteriormente se añadió una solución de Lugol durante 3 minutos. Posteriormente, se descartó el Lugol y se observó la placa, zonas claras alrededor de donde estuvo el crecimiento microbiano, indican que la cepa es productora de amilasas.

Además, para completar la caracterización fenotípica, se utilizaron las Galerías API® (Biomérieux) siguiendo las instrucciones fabricante. Para el género *Mesorhizobium* se utilizaron las galerías 20NE y ID32GN; y para *Domibacillus* se emplearon las galerías 20NE, 20E, 50CH y ZYM. Además, en las cepas de *Domibacillus* se utilizó el kit M-IDENT®-BACILLUS (Microkit)

Por otro lado, se realizó una caracterización quimiotaxonómica de la nueva especie de *Domibacillus* que incluyó el análisis de quinonas respiratorias, lípidos polares y DAP (ácido 2,6-diaminopimélico). Dicho análisis fue realizado en el servicio de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Además, el perfil de ácidos grasos de las cepas se determinó por el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca (IRNASA-CSIC), utilizándose el “Microbial Identification System” (Microbial ID, MIDI) Sherlock 6.1 y en la biblioteca RTSBA6 (Sasser, 1990).

Finalmente, se obtuvo la secuencia del genoma de todas aquellas cepas que constituían nuevas especies. Para ello, el ADN genómico de estas cepas fue extraído utilizando el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para esto, se crecieron las cepas en TY durante 3 días. Luego se recolectaron entre 50 a 100mg de bacterias y se colocaron en un microtubo. El ADN genómico fue enviado al Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, para su secuenciación, mediante la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante Velvet 1.2.10. (Zerbino & Birney, 2008), obteniéndose el borrador de la secuencia del genoma. La anotación automática del genoma se realizó empleando el programa RAST 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz et al., 2008) y la herramienta The SEED-viewer (Overbeek et al., 2013) se empleó para la caracterización de los genomas.

3. Análisis de mecanismos PGRP

3.1. Suspensión celular para pruebas PGPR

Para las pruebas de solubilización de fósforo, producción de celulosa, actividad celulolítica y producción de sideróforos se preparó una suspensión en agua destilada estéril a una densidad óptica de 0,8 a 600nm.

3.2. Solubilización de fósforo

Para determinar la capacidad de solubilización de fosfato de los aislados, se utilizó el medio de cultivo Pikovskaya-agar (Hernández-Leal, 2011; Nopparat et al, 2009) modificado. La composición del medio se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Medio Pikovskaya-agar

Componente	Cantidad (g/L)
Extracto de levadura (Bacto BD [®])	0,5
Dextrosa	10,0
Ca ₃ O ₈ P ₂	5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
KCl	0,2
MgSO ₄ (Panreac [®])	0,1
MnSO ₄ (H ₂ O)	0,0001
FeSO ₄	0,0001
Agar (Conda [®])	15,0

Se cultivan 5,0µl se una suspensión bacteriana de 0,8 a 600nm sobre el medio. Las placas se incuban a 28°C y se evaluó a los 6, 13, 20 y 30 días. Durante estos días se midió el diámetro de la colonia y el halo de solubilización a fin de determinar un porcentaje de eficiencia según la siguiente fórmula:

$$\%Ef = \frac{\text{Diámetro del halo} - \text{Diámetro de la colonia}}{\text{Diámetro de la colonia}} \times 100\%$$

3.3. Producción de celulosa

Para determinar la producción de celulosa (u otro polisacárido con enlaces β-1,4), se utilizó el medio de cultivo YMA (tabla 16), además de 25mg/L del colorante Rojo Congo. Este reactivo se une a los enlaces β-1,4de glucosa, por tanto, es comúnmente utilizado para la detección de celulosa. A los medios de cultivo se inocularon con 5,0µl de una suspensión bacteriana a una densidad óptica de 0,8 a 600nm. Las placas se incubaron a 28°C por 3 días. Una coloración rojiza de las colonias indica la presencia de polímeros con enlaces β-1,4, siendo la celulosa el más frecuente de estos polímeros.

3.4. Formación de biofilms

La determinación de biofilms se basó en lo descrito por Fujishige et al. (2006). Se prepararon los cultivos bacterianos en medio YMB (igual que el especificado en la tabla 16, pero sin agar), e incubaron a 28°C por 4 días (hasta llegar a la fase de latencia) en agitación a 150rpm. Las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadió al pellet nuevo YMB. Éstos fueron re-suspendidos y ajustado su densidad óptica a 0,2 a 600nm.

Luego se inocularon 100µl de estas suspensiones en placas de 96 pocillos de PVC (Cloruro de polivinilo) esterilizadas mediante radiación ultravioleta en 4 ocasiones durante 30 minutos cada una. Se realizan 3 set de placas para ir retirando y tomando medidas a 24, 48 y 72 horas. Los pocillos del borde se dejan sólo con YMB sin bacterias, para tenerlos como controles negativos y controles de esterilidad de la placa. Las placas se incubaron a 28°C durante 24, 48 y 72 horas sin agitación. A cada tiempo de incubación, un set de placas se retira, y se mide la densidad óptica del crecimiento bacteriano a 595nm en un lector de placas ASYS (Biochrom, Reino Unido).

Para determinar la presencia y cuantificar los biofilms, tras cada tiempo de incubación, se eliminó el medio girándolo rápidamente y dándole un golpe en seco a la placa a fin de eliminar los restos de medio YMB. Posteriormente, se añaden a cada pocillo 100µl de una solución de cristal violeta al 0,3% y se deja durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se eliminó el cristal violeta, de la misma forma que se eliminó el YMB de las placas, y se realizan tres lavados con 100µl de agua destilada estéril cada uno de los mismos con 5 minutos. Transcurridos los lavados y retirada el agua, se dejan secar las placas durante 1 hora en la cabina de flujo laminar vertical. Finalmente, se añadieron 100µl de una solución etanol:acetona (4:1) bien homogenizada a cada pocillo, dejándolo durante 15 minutos. Utilizando un lector de placas se midió la absorbancia de cada pocillo a 570nm.

3.5. Actividad celulolítica

La determinación de la actividad celulolítica se realizó en medio YMA (tabla 16) sobre el que se añade una delgada capa compuesta por: agarosa al 0,5% (p/v), carboximetilcelulosa (CMC) al 0,2% (p/v) en tampón PCA 100mM a pH 5 (Mateos et al. 1992). Una vez solidificado el medio se añadieron 5,0µl de una suspensión bacteriana de 0,8 a 600nm. Se realizó por triplicado a los tiempos de 3 y 5 días e incubadas a 28°C. Transcurridos los correspondientes días, se eliminó el crecimiento bacteriano con agua y se añadió Rojo Congo a una concentración de 0,1% (p/v) durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se retiró el colorante y se lavaron las placas tres veces con NaCl 1M durante 30 minutos cada una. En las zonas donde hay hidrólisis del CMC no se tiñe esa zona color rojo mostrando un halo que indica actividad celulolítica.

3.6. Producción de IAA

La determinación de Ácido Indolacético (IAA, por sus siglas en inglés) se realizó utilizando el medio JMM (O'Hara et al, 1989) con una modificación de éste, especificadas

en las tablas 26 y 27; a los medios, una vez esterilizados, se le añadió una solución de 0,167g/l de triptófano, esterilizado por filtración. Además, la solución de vitaminas (estériles) también fue añadida una vez esterilizado el medio en autoclave.

Las cepas se cultivaron en medio de cultivo YMA (tabla 16) durante 5 días a 28°C. Luego se prepararon inóculos a 0.5 (550 nm) con agua destilada estéril y se inocularon 100µl de la solución a 2ml de medio JMM, tabla 26 y 27, ambos medios fueron utilizados para cada una de las cepas.

Tabla 26. Medio JMM

Componente	Cantidad (g/l)
D-(+)-galactosa	1,8
L-(+)-arabinosa	1,5
K₂HPO₄	26,1 x 10 ⁻³
FeSO₄ · 7H₂O	5,5 x 10 ⁻³
CaCl₂ · 2H₂O	147 x 10 ⁻³
Solución de vitaminas (tabla 28)	1ml

Tabla 27. Medio JMM modificado

Componente	Cantidad
K₂HPO₄	0.006g
MgSO₄ · 7H₂O	0.004g
NaCl	0.002g
NH₄NO₃	0.02g
Glucosa	0.04g
Manitol	0.08g
Priruvato	0.08g
Solución de vitaminas (tabla 28)	8µl
Elementos trazas (tabla 29)	2µl
H₂O	10ml

Tabla 28. Solución de vitaminas

Componente	Cantidad (mg/l)
Rivoflavina	20,0
Ácido P-aminobenzoico	20,0
Ácido nicotínico	20,0
Biotina	20,0
Tiamina – HCl	20,0
Piridoxina – HCl	20,0
Pantotenato cálcico	20,0
Inositol	120,0

Tabla 29. Solución de elementos trazas

Componente	Cantidad (mg/l)
H₃BO₃	145,0
FESO₄ · H₂O	125,0
CuSO₄ · 5H₂O	5,0
MnCl₂ · 4 H₂O	4,3
CoCl₂ · 6 H₂O	59,0
ZnSO₄ · 7H₂O	108,0
Na₂MoO₄ · 7H₂O	125,0

El triptófano actúa como inductor de la producción del ácido indolacético. Los tubos son incubados a 28°C durante 7 días en completa oscuridad. Posteriormente se centrifugaron a 13.000rpm durante 3 minutos. Se tomó 1ml del sobrenadante, se colocó en un tubo de ensayo y se le añadieron 500µl del agente Salkowski (2 ml de FeCl₃ 0.5M+98 ml de HClO₄ al 35%) en proporción 2:1, dejándose reaccionar durante 15 minutos. En caso de observarse un cambio de coloración a rosado o rojiza, la producción de ácido indolacético es positiva. La intensidad de color se mide mediante espectrofotometría a 550nm, permitiendo una valoración semi-cuantitativa de la producción de IAA

3.7. Producción de sideróforos

La evaluación de la producción de sideróforos se determinó con el medio M9-CAS-Agar, modificado por Schwyn y Neilands (1987). La modificación consiste en añadir un solvente catiónico (HDTM) el cual estabiliza el complejo Fe-CAS, dándole un color azul característico (Alexander y Zuberer 1991). El medio se preparó mediante la elaboración de cuatro soluciones:

Solución 1:

Se mezclaron 10ml de FeCl₃ · 6H₂O (1mM) en HCl 10mM con una solución acuosa de 50ml de CAS (1.21mg/ml). Esta solución se tornó color púrpura, y se mezcló con 40ml de una solución acuosa de HDTMA (1.82mg/ml). Esta mezcla dota a la solución de un color azul marino. Esta solución se esterilizó en autoclave.

Solución 2.

Se preparó una solución como se muestra en la tabla 30, se ajustó el pH a 6.8, esterilizándose después en autoclave.

Tabla 30. Solución 2 de medio de determinación de sideróforos M9-CAS-Agar

Componente	Cantidad (g/750ml)
PIPES (Ácido 1,4-piperazinodietanosulfónico)	30,24
KH₂PO₄	0,3
NaCl	0,5
NH₄Cl	1,0
Agar	15,0

Solución 3

Se disuelven los compuestos mostrados en la tabla 31 en 70ml de agua destilada y esterilizan mediante autoclave.

Tabla 31. Solución 3 de medio de determinación de sideróforos M9-CAS-Agar

Componente	Cantidad
Sacarosa	2,0g
Manitol	2,0g
MgSO₄ · 7 H₂O	493,0mg
CaCl₂	11,0mg
MnSO₄ · H₂O	1,17mg
H₃BO₃	1,4mg
CuSO₄ · 5H₂O	0,04mg
ZnSO₄ · 7H₂O	1,2mg
Na₂MoO₄ · 2H₂O	1,0mg

Solución 4

Consistió en una solución de 3,0g de Cas-aminoácido (proveniente de la degradación parcial de la caseína) en 30ml de agua. Esta solución se esterilizó mediante filtración (filtros de 0,22µm, Millex®-GS).

3.8. ACC desaminasa

Para detectar la producción de enzima ACC desaminasa, se preparó medio de cultivo JMM y JMM modificado (tabla 26 y tabla 27, respectivamente) eliminando las fuentes de nitrógeno. A estos medios se les añadió 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) a una concentración de 3µM (García-Fraile et al., 2012; O'Hara et al., 1989; Penrose & Glick, 2003). El medio se sirvió en placas de 96 pocillos, 200µl por pocillos, e inoculados con las cepas. Las muestras se hicieron por triplicado y midió la densidad óptica a tiempo 0 (conocer la densidad inicial), 3, 5 y 7 días a 595nm.

4. Ensayos de promoción del crecimiento vegetal en cámara iluminada

4.1. Cultivo en cámara iluminada

Conforme a los diferentes perfiles RAPD, 16 de las cepas del género *Mesorhizobium* fueron elegidas para evaluar su potencial para determinar su capacidad para nodular plantas de *Cicer arietinum* L. en cámara iluminada. El sustrato utilizado fue vermiculita, la cual fue lavada con abundante agua para eliminar impurezas y sometida a tinalización mediante autoclave a 121°C a 15 psi durante 1 hora durante tres días consecutivos. La vermiculita se colocó en macetas de 1L y se colocaron 2 semillas estériles y pre-germinadas (tal y como se describe en el apartado 1.1 de la sección de materiales y métodos) de *Cicer arietinum* L. por maceta. A los 3 días de colocar las semillas se inocularon con 1ml de las cepas correspondientes a una densidad óptica de 0,5 (600nm). Las plantas fueron regadas con 100ml de una solución de medio Fahraeus (tabla 32), cada 3 días hasta los 42-45 días post-inoculación.

Tabla 32. Composición del medio Fahraeus

Componente	Cantidad (g/l)
MgSO₄ · 7H₂O	0,12
KH₂PO₄	0,10
Na₂HPO₄ · 2H₂O	0,15
Citrato Férrico	0,005g
CaCl₂ · 2H₂O	0,1
Solución de oligoelementos (tabla 33)	1ml

Tabla 33. Composición de la Solución de Oligoelementos

Componente	Cantidad (mg/ml)
MnSO₄ · 2H₂O	1,0
CuSO₄ · 5H₂O	1,0
ZnSO₄ · 5H₂O	1,0
H₃BO₃	1,0
Na₂MoO₄	1,0

En el caso del control positivo, las plantas fueron regadas con medio Fahraeus al que se suplementó con 1 ml de una solución de NH₄NO₃ a 5mM. A los 42 días, antes de la floración, las plantas se retiraron y se tomaron datos correspondientes a las longitudes y pesos, tanto aéreos como radiculares, contenido de clorofila, además del número y características de los nódulos.

4.2. Cortes y análisis de nódulos

Transcurridos 42 días desde la inoculación de las plantas con cada una de las cepas seleccionadas a las plantas de cada tratamiento se les retiraron los nódulos para analizar su

tamaño, forma, color y cantidad. La morfología externa e interna se evaluó detalladamente mediante el uso de un estereoscopio, mostrando especial énfasis en la coloración rosado-rojiza de los mismos.

Por otro lado, a dichos nódulos se le realizó un análisis histológico. Para esto se seleccionaron nódulos representativos de cada tratamiento y se almacenaron en formaldehído al 4%, para su procesamiento histológico, el cual fue realizado por el Servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca-CSIC, del Centro de Investigación del Cáncer, y consistió en cortes longitudinales y tinción de los nódulos. Para ello, una vez transcurridas al menos 24 horas desde su inclusión en formaldehído, los nódulos se deshidrataron mediante inmersiones seriadas en etanol desde 30% hasta un 95%. Posteriormente, fueron aclarados utilizando xilol en un procesador Thermo Shandon Excelsior y fueron incrustados en parafina. Subsecuentemente, se realizaron cortes longitudinales seriados de entre 2 a 3 μm de ancho utilizando el equipo HM 310 Microtom, para luego ser colocados sobre un portaobjetos y adicionado una pequeña cantidad de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) al 3% en buffer de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Las secciones fueron desparafinadas a través de dos extracciones; xilol y seguido de etanol absoluto. Consecutivamente, se fueron disminuyendo las concentraciones de etanol hasta tener finalmente agua. Una vez obtenido los cortes, éstos se tiñeron con una solución de azul de toluidina a una concentración de 0,01% durante 30 segundos a 1 minuto. Los portaobjetos se lavaron con agua y se cubrieron con una cubierta antideslizante, para luego ser visualizados mediante microscopía óptica.

5. Ensayo de colonización

5.1. Transformación de las cepas

Con la finalidad de evaluar cómo algunas de las cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium* sp, eran capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas de garbanzo y trigo, se les introdujeron por conjugación genes que codifican la expresión de proteínas fluorescentes verde o roja (GFP y RFP, respectivamente, por sus siglas en inglés Green/Red Fluorescent Protein). Para lograr esto se corroboró la susceptibilidad a diversas concentraciones de las cepas a los antibióticos tetraciclina (5, 10, 20, 50 y 100mg/l) y kanamicina (10, 20, 50, 100 y 200mg/l) ya que estos antibióticos serán utilizados como selección de los transformantes. Una vez corroborada la susceptibilidad de las cepas, las mismas fueron crecidas en medio Triptona y Extracto de Levadura (TY), cuya composición se especifica en la tabla 34, incubado a 28°C durante 5 días.

Tabla 34. Composición del medio de cultivo TY

Componente	Cantidad (g/L)
Bacto-Triptona (Difco®)	5,0
Extracto de levadura (Difco®)	3,0
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,5
Agar	20,0
Agua	1,0 L

Materiales y Métodos

La transferencia de cada plásmido a cada una de las cepas seleccionadas se realizó mediante conjugaciones bi- o triparentales. La transformación biparental se realizó mediante la cepa *Escherichia coli* S17.1 portadora del plásmido pHC60 (Cheng & Walker, 1998) la cual posee el gen de la proteína GFP y actuará como donadora de dicho plásmido. Esta cepa fue crecida “overnight” en medio Luria-Berthani (LB) (tabla 35) más tetraciclina 10mg/l.

Tabla 35. Composición del medio de cultivo LB

Componente	Cantidad (g/L)
Bacto-Triftona (Difco®)	10,0
Extracto de levadura (Difco®)	5,0
NaCl	10,0
Agar	20,0
Agua	1,0 L

En el caso de la conjugación para expresar la proteína RFP, se realizó mediante una conjugación triparental utilizando como cepa donadora una *Escherichia coli* DH5 α con el plásmido pBMRm, el cual tiene el gen RFP, y, además, se utilizó la cepa de *E. coli* 803 pRKB08 como que actúa como *Helper*. Estas cepas también se crecieron en medio LB (tabla 35), en el caso de la *Escherichia coli* DH5 α pBMRm el medio fue suplementado con tetraciclina 10mg/l y *E. coli* 803 pRKB08 con kanamicina 50mg/l, ambas crecidas a 37°C, durante un máximo de 24 horas antes de la transformación.

Una vez crecidas las cepas de *E. coli* y las cepas de *Mesorhizobium* sp (crecidas en TY durante 48 horas). utilizando un asa estéril y bajo condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar vertical se tomaron las cepas para realizar las transformaciones:

- Biparentales para GFP
 - *Mesorhizobium* sp. FCAP 04 + *Escherichia coli* S17.1 pHC60
 - *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 + *Escherichia coli* S17.1 pHC60
- Triparentales para RFP
 - *Mesorhizobium* sp. FCAP 04 + *Escherichia coli* DH5 α pBMRm + *Escherichia coli* 803 pRKB08
 - *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 + *Escherichia coli* DH5 α pBMRm + *Escherichia coli* 803 pRKB08

En el caso de las conjugaciones biparentales, se realizó una mezcla de ambas en una proporción 2:1 (*Mesorhizobium* : *Escherichia coli* S17.1 pHC60), en otras palabras, añadir el doble de bacterias de las cepas a transformar, en este caso *Mesorhizobium* sp. Para la transformación triparental, las cepas se mezclaron en una proporción 2:1:1 (*Mesorhizobium* : *Escherichia coli* DH5 α pBMRm : *Escherichia coli* 803 pRKB08). Las respectivas bacterias para cada una de las transformaciones se mezclaron a las proporciones indicadas y realizando movimientos circulares con el fin de homogenizar todos los microorganismos para facilitar la conjugación y por tanto, el traspaso del respectivo plásmido a nuestras cepas de

Mesorhizobium sp. Las respectivas combinaciones se incubaron en medio YMA (tabla 16) a 28°C “overnight”. Transcurrido ese tiempo, con un asa estéril se tomó parte de la mezcla y se realizó un agotamiento por estría en Medio Mínimo (tabla 36), (O’Gara & Shanmugam 1976), suplementado con 10mg/l de tetraciclina.

Tabla 36. Composición del Medio Mínimo

Componente	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,15
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05
NaCl	0,1
NH ₄ NO ₃	0,1
Manitol	10
Elementos traza (tabla 28)	1ml
Solución de vitamina (tabla 29)	1ml
Agar*	20

*Antes de adicionar el agar el pH se ajusta entre 6,8 a 7,0 utilizando KH₂PO₄ para acidificar o K₂HPO₄ para alcalinizar.

Estas placas en agotamientos en estría se incubaron a 28°C entre 4-7 días (evaluando la aparición de colonias aisladas). Posteriormente, cada colonia aislada se cultivó simultáneamente en Medio Mínimo (tabla 36) suplementado con 10mg/l de tetraciclina y en medio comercial “Agar Bilis y Rojo Violeta con lactosa” o VRB por sus siglas en inglés (Conda®) (tabla 37). Las placas con Medio Mínimo se incubaron a 28°C y las VRB a 37°C. En el medio VRB es un medio selectivo, donde solo crecerán las cepas de *Escherichia coli* y no *Mesorhizobium* sp. Por tanto, las colonias aisladas en un principio que no crecieron en el medio VRB, pero sí en Medio Mínimo con tetraciclina son los *Mesorhizobium* sp. Que han adquirido el plásmido de interés. se observaron mediante microscopía de fluorescencia para confirmar la expresión de las proteínas GFP o RFP se procede a realizar ensayos de colonización.

Tabla 37. Composición del Medio VRB (Conda®)

Componente	Cantidad (g/L)
Lactosa	10,0
Peptona de gelatina	7,0
NaCl	5,0
Extracto de Levadura	3,0
Mezcla de sales biliares	1,5
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,002
Agar bacteriológico	15,0

5.2. Inoculación de las cepas transformadas en garbanzo y trigo

5.2.1. Ensayo de colonización en garbanzo

Para evaluar cómo las cepas eran capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas de *Cicer arietinum* L. se inocularon las cepas de *Mesorhizobium* sp. transformadas como ya se explicó en el apartado anterior en plantas de garbanzo. Para esto se esterilizaron semillas de garbanzo cómo se explica en el apartado 1.1 de la sección de materiales y métodos. Una vez estériles, las semillas se colocaron en placas Petri con agar-agua al 1,5 % (tabla 15) en condiciones de oscuridad para su germinación. La inoculación y cultivo de las plantas se realizó en un sistema consistente en unaplaca Petri redonda de 140x20mm con 50 ml con agar-agua al 1,5%,. en el que la mitad del agar de la placa fue eliminado utilizando un escalpelo estéril, para dejar disponible un espacio mayor para el desarrollo de la parte aérea de la planta del garbanzo; mientras que la parte con agar permanece en la placa Petri para permitir el desarrollo del sistema radicular de la planta. Por tanto, las semillas de garbanzo pregerminadas se colocaron en el borde donde el agar fue cortado, a razón de 3 plántulas por placa Petri. Sobre la raíz y el resto del agar se inocularon 3ml (1 ml por planta) de una suspensión de la o las cepas correspondientes a una densidad óptica de 0,5 a 600nm. Subsecuentemente, se colocó un papel de filtro estéril que cubriese la zona del agar y las raíces de las plántulas del garbanzo. En el caso del control negativo (sin bacteria) se añadieron 3ml de agua destilada estéril. Además, las placas fueron colocadas de manera vertical y se cubrió con papel de estraza la parte de la placa que contenía el agar y donde se estaría desarrollando el sistema radicular de la planta. Las placas Petri con las plantas fueron colocadas en una cámara iluminada a una temperatura de 22°C con 50-60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Las plantas permanecieron durante 15 días y de manera periódica (5,10 y 15 días) fueron observadas al microscopio de fluorescencia.

5.2.2. Ensayo de colonización en trigo

De manera similar a lo ya descrito en la sección anterior se realizó el cultivo de trigo. En este caso las semillas se esterilizaron de la siguiente manera: etanol al 70% durante 1 minuto, luego con lejía comercial durante 5 minutos, seguido de varios lavados con agua destilada estéril. Después, las semillas se pregerminaron en agar-agua al 1,5% (tabla 15) durante 48 horas. El sistema utilizado para evaluar la colonización de las cepas fue igual al ya descrito para garbanzo (sección 5.2.1), con la única diferencia de que en esta ocasión se colocaron 5 semillas pregerminadas. Las plantas se evaluaron de manera periódica a los 5, 10 y 15 días post-inoculación, mediante la visualización bajo microscopía de fluorescencia.

5.3. Marcaje mediante inmunofluorescencia

En el caso de inoculaciones con cepas de *Bacillus* sp. o co-inoculaciones (*Mesorhizobium* sp. y *Bacillus* sp.) las cepas de género *Bacillus* fueron marcadas mediante un anticuerpo fluorescente. La inoculación de las cepas de *Bacillus* en los tratamientos correspondientes, consistió también en una suspensión bacteriana de una densidad óptica de 0,5 a 600nm, que se aplicó a las semillas estériles y pregerminadas en placas agar-agua como ya se ha descrito en las subsecciones anteriores bajo la sección 5 de materiales y métodos.

La visualización por inmunofluorescencia se realizó a los 9 días post-inoculación. Se cortaron trozos de raíces de unos 2 cm de longitud de diversas partes del sistema radicular de cada uno de los tratamientos inoculados con cepas de *Bacillus* sp. Dichos trozos de raíces fueron colocados en microtubos de 2ml con Buffer Fosfato Salino estéril (PBS por sus siglas en inglés) (tabla 38). El marcaje de las cepas de *Bacillus* con los anticuerpos fue realizado en el Centro de Investigación del Cáncer mediante el Servicio de Patología Molecular Comparada de la Universidad de Salamanca-CSIC. Primero se sumergieron las muestras en una solución de leche al 3% y Triton al 0,03% en PBS 1X durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 minutos. Subsecuentemente se añade el anticuerpo primario (Uricasa al 1/50) y se deja “overnight” a 4°C. Luego se lavan las raíces con PBS 3 veces durante 5 minutos. Posteriormente se le añade el anticuerpo secundario (FITC GOAT a 1/200) y se deja incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego ser lavados en 3 ocasiones seguidas con PBS durante 5 minutos cada una. Subsecuentemente se incuban con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol que es un marcador fluorescente) durante 10 minutos. Finalmente se realizan 3 lavados con PSB de 5 minutos.

Tabla 38. Composición del PBS 1X

Componente	Cantidad en g para 100 ml
NaCl	0.806
KCl	0.022
Na ₂ HPO ₄	0.115
KH ₂ PO ₄	0.02
Agua	100ml

5.4. Visualización de las raíces bajo microscopia fluorescencia

Para visualizar las raíces inoculadas con bacterias marcadas con fluorescencia (GFP, RFP o inmunofluorescencia) se tomaron los trozos de las raíces (de diversas zonas del sistema radicular) y se colocaron un portaobjetos limpio y seco. Seguidamente, se añadió un poco de agua sobre la raíz y se colocó un cubreobjetos intentando evitar la formación de burbujas. Las muestras fueron visualizadas mediante microscopio de epifluorescencia (Nikon® Eclipse 80i) intercambiando los filtros en caso de buscar fluorescencia roja, verde o ver en campo claro.

6. Ensayo de invernadero en garbanzo y trigo

6.1. Crecimiento y desarrollo de garbanzo en invernadero

Una vez analizados los resultados obtenidos tanto de mecanismos de promoción del crecimiento vegetal como de los ensayos de colonización, se procedió a realizar un ensayo en invernadero, el mismo se llevó a cabo por el Servicio de Invernadero Experimental del Parque

Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL). Para esto se utilizaron macetas redondas de 2,5L y se colocaron 3 semillas estériles pregerminadas (como se describe en el apartado 1.1 de la sección de materiales y métodos). El sustrato utilizado fue turba:vermiculita (a una proporción 3:1), no estéril. Cuando la parte aérea comenzó a salir del suelo, aproximadamente a los 5 días, se inocularon las plantas con las cepas seleccionadas y coinoculaciones de las mismas (FCAP 04, FCAP 26, FCAP 04 + FSZ 43, FCAP 04 + FSZ 47, FCAP 26 + FSZ 43, FCAP 26 + FSZ 47, FSZ 43 y FSZ 47) a una densidad óptica de 0,5 (600nm), además de controles sin inocular (con y sin nitrógeno).

A los 5 meses, momento de llegada a producción de las plantas, se evaluó el crecimiento y estado de desarrollo de las mismas. Posteriormente, se cosecharon las semillas de garbanzos de cada tratamiento y se retiró la parte aérea de las plantas.

6.2. Crecimiento y desarrollo de trigo en rotación con garbanzo en invernadero

A fin de evaluar si era posible que los nutrientes que quedaban en las macetas así como los nuevos compuestos nitrogenados acumulados por las plantas de garbanzo gracias a la simbiosis establecida con las cepas de *Mesorhizobium* fijadoras de nitrógeno serían capaces de sustentar el crecimiento, desarrollo y producción de otro cultivo, se procedió a sembrar un cereal, trigo.

En este sentido, en las macetas procedentes de los anteriores ensayos con plantas de garbanzo, con cada uno de los tratamientos especificados en el apartado anterior, se colocaron 5 semillas de trigo, las cuales habían sido esterilizadas previamente con etanol al 70% durante 1 minuto, luego con lejía comercial durante 5 minutos, seguido de varios lavados con agua destilada estéril. Se evaluó el crecimiento, desarrollo y producción de trigo al ser precedido por un cultivo de garbanzo, contabilizando la cantidad de semillas y peso para los 10 diferentes tratamientos evaluados.

7. Ensayo de campo en garbanzo

Para evaluar la efectividad de las mejores cepas de *Mesorhizobium* sp. conforme a los análisis de cámara iluminada, se realizaron ensayos de campo en la localidad de Tardáguila, Salamanca (41.1542778, -5.5879874). El diseño del experimento de campo consistió en parcelas de 2 x 2 metros, separadas entre ellas y el resto del campo por pasillos también de 2 metros (figura 17). Se preparó una solución de 1litro con cada cepa resuspendida en agua (FCAP 04 y FCAP 26) tras crecer las cepas en medio YMA (tabla 16) durante 5 días a 28°C. Transcurrido el tiempo el crecimiento microbiano de las placas recuperó y mezcló con 700ml de agua destilada estéril. Una vez bien homogenizado se ajustó el volumen a 1000ml. Así mismo los inóculos finales se ajustaron hasta tener una concentración aproximada de 10^8 células/ml.

Ya preparadas las soluciones de los inóculos, las semillas de garbanzo fueron sumergidas en cada uno de ellos durante 5 minutos antes de ser sembradas en el campo. Las semillas ya inoculadas se colocaron en hileras (en parcelas de 2m²) a 3-4cm de profundidad y a 10 cm de distancia entre cada semilla. Transcurridas unas 16 semanas, se recolectaron todas las

vainas de 16 plantas seleccionadas al azar por cada parcela. Posteriormente se recuperaron las semillas, cuantificaron y pesaron, analizando además su composición de elementos mediante el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) en Murcia, España.

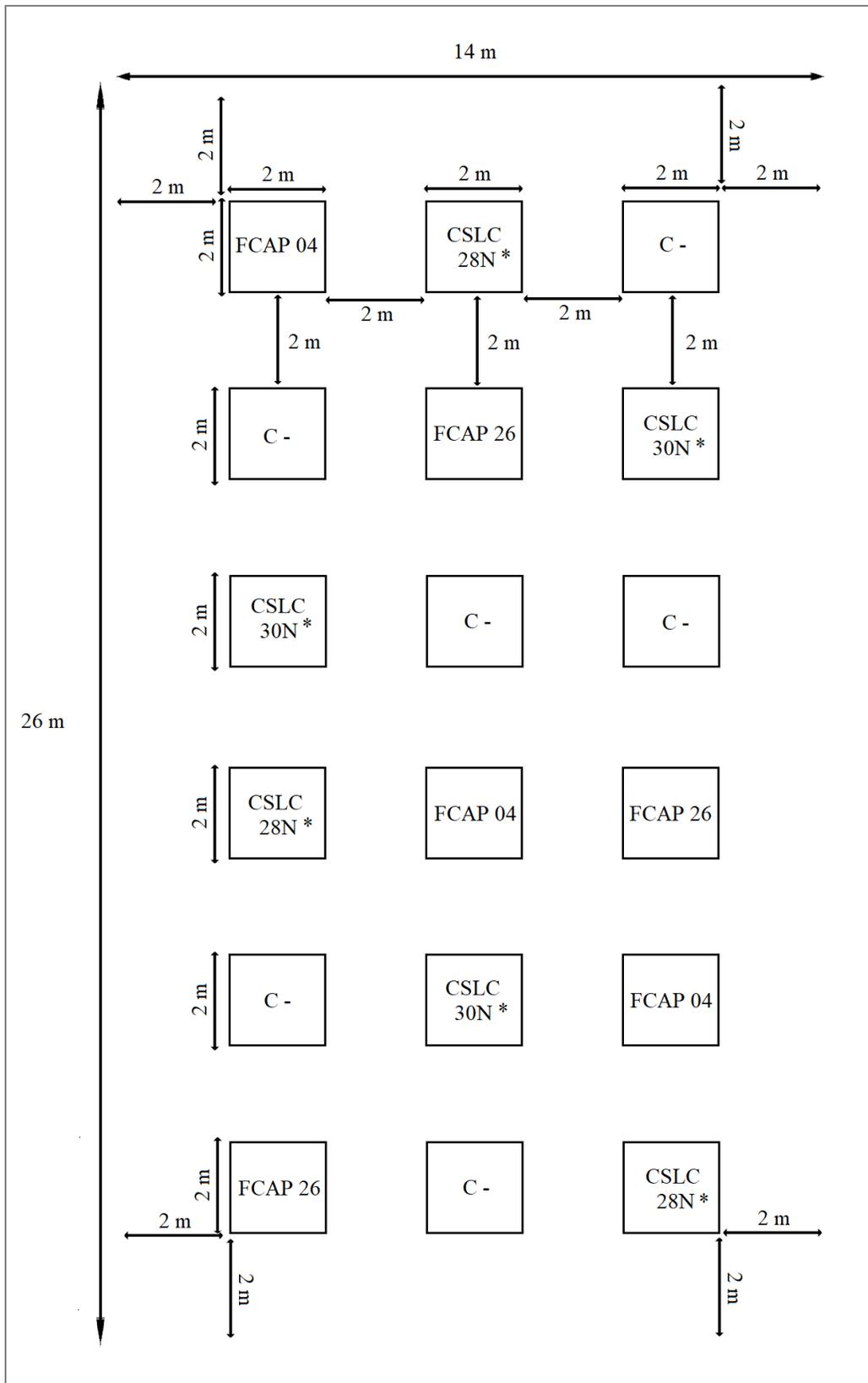


Figura 17. Diagrama de diseño de campo para el cultivo de *Cicer arietinum* L.
*Plantas inoculadas con otras cepas de *Mesorhizobium* sp. ajenas a este trabajo.

8. Fitorremediación de metales

8.1. Selección de microorganismo

La cepa seleccionada para este análisis fue la FCAP 26, ya que mostró buen potencial PGPR, ésta es perteneciente al género *Mesorhizobium* y aislada de nódulos de *Cicer arietinum* L. la cual mostró potencial como organismo PGPR. El crecimiento de la misma se llevó a cabo cultivándola en medio YMA (tabla 16) durante 5 días a 28°C, para realizar los análisis pertinentes.

8.2. Tolerancia a diversas concentraciones de metales

La cepa FCAP 26 fue sometida a varias concentraciones de diversos metales, hasta el nivel máximo de tolerancia de la cepa. Para esto se utilizó medio YMA (tabla 16) suplementado con las siguientes concentraciones de metales:

- Para evaluar la tolerancia al Cobre y Zinc se utilizó estos metales en su forma de sulfatos (Vázquez et al., 2008; Grison et al., 2015). Las concentraciones de CuSO₄ y ZnSO₄ fueron 100µM, 200µM, 400µM, 800µM, 1mM, 2mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM, 15mM, 25mM, 40mM y 50mM.

-La tolerancia al aluminio se evaluó en su forma de cloruro (AlCl₃) (Vicente et al., 2016) a las mismas concentraciones descrita CuSO₄ y ZnSO₄.

-La tolerancia a cadmio, plomo y mercurio se corroboró mediante sus formas de cloruros (Ike et al., 2007) a las concentraciones ya descritas para los otros metales, hasta el máximo de 25mM.

Además, se seleccionaron unas micorrizas de la marca BioFlower® (Micoplus Flower) la cuales son empleadas como productos biológicos naturales capaces de colonizar una amplia variabilidad de plantas a fin de mejorar su capacidad de adquisición de nutrientes y protegerlas frente a patógenos. La marca de micorrizas seleccionadas contiene una combinación de hongos ecto y endomicorrízicos. La misma contiene los hongos: *Rhizopogon* spp, *Scleroderma* spp, *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*.

8.3. Selección de plantas y esterilización de las semillas

Las plantas seleccionadas para corroborar si la interacción con la cepa FCAP 26 y las micorrizas podrían servir para bioacumular más metales fueron *Erophaca baetica* L. y *Astragalus pelecinus* L., plantas capaces de tolerar concentraciones de algunos metales (Rufo L. & de la Fuente, V., 2010; Pastor & Hernández, 2002). En el caso de las semillas de *Erophaca baetica* L., se esterilizaron mediante un lavado con etanol al 70% durante 2 minutos, seguidamente se lavó con lejía comercial al 10% por 20 minutos y, por último, 5 lavados con agua destilada estéril (Reichman, 2007). Las semillas estériles se pregerminaron en placas Petri con agar-agua al 1,5% durante 7 días a 28°C en oscuridad. Las semillas de *Astragalus pelecinus* L. se esterilizaron utilizando una solución de HgCl₂ al 2,5% por 5 minutos, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua destilada es estéril, luego se

colocaron en placas con agar-agua al 1,5% e incubaron a 28°C durante 72 horas en total oscuridad.

8.4. Interacción planta-microorganismo y su tolerancia a metales “in vitro”

A fin de evaluar cómo esta cepa y las micorrizas son capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas, se realizó un ensayo en placas Petri tal como se describe en el apartado 5.2.1 de materiales y métodos, con la única diferencia de que se utilizaron placas Petri de 120 x 120mm. Además, el medio agar-agua (1,5%) que tenían estas placas contenía cada uno de los diferentes metales pesados en ensayo, por separado, a la concentración que la cepa FCAP 26 tuvo sus niveles máximos de tolerancia. Los metales añadidos al medio agar-agua fueron esterilizados mediante filtración con filtros de 0,22µm.

Tanto para las plantas de *Erophaca baetica* L. como *Astragalus pelecinus* L., se colocaron 5 semillas por cada placa Petri. Las plantas se evaluaron a los 3, 6 y 9 días post-inoculación. Por ende, se evalúan los siguientes tratamientos: Control sin inocular y sin presencia de metales; control sin inocular, FCAP 26, Micorriza y FCAP 26 + Micorriza para cada uno de los siguientes metales: CuSO₄, ZnSO₄, AlCl₃, PbCl₂ o HgCl₂ (cada metal se evaluó por separado). Las plantas se inocularon, se colocó papel de filtro cubriendo la raíz, se sellaron las placas e incubaron en la cámara iluminada, de la misma manera que la ya descrita en la sección 5.2.1 de materiales y métodos.

8.5. Evaluación de colonización del sistema radicular frente a la presencia de metales

8.5.1. Marcaje, tinción de los microorganismos y ensayos *in vitro* de colonización de raíces

Con el objetivo de evaluar si la cepa FCAP 26 y las micorrizas eran capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas bajo la presencia de estos metales la cepa FCAP 26 se transformó para que expresase la proteína verde fluorescente (GFP), tal y como se describe en la sección 5.1 de materiales y métodos.

La visualización de los hongos en el sistema radicular de ambas plantas se realizó mediante el método descrito por Mishra et al., 2014 modificado: se cortaron trozos de aproximadamente 2 cm de longitud de raíces de diversas partes del sistema radicular de cada una de las plantas. Las mismas fueron colocadas en microtubos. La tinción de los hongos se realizó en tres fases: la primera consistió en introducir las raíces de una solución de KOH al 10% durante 20 minutos, en la segunda fase las raíces fueron transferidas a microtubos con una solución de HCl 1M durante 15 minutos, y en tercer lugar éstas fueron introducidas en una solución de azul de lactofenol a una proporción 1:6 (lactofenol:agua) durante 5 minutos.

8.5.2. Visualización mediante microscopía

Los trozos de las raíces fueron colocados sobre portaobjetos limpios y secos. Para observar las bacterias de la cepa FCAP 26 marcada con GFP y observar un mejor contraste, las raíces se tiñeron con una solución de yoduro de propidio (Sigma) a una concentración de 10 μ M. Así pues, una vez colocadas las raíces sobre portaobjetos, sobre éstas se añadió la solución de yoduro de propidio hasta cubrirla (50-100 μ l) y se cubrieron con un cubreobjetos. Posteriormente, se observaron las muestras utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon® Eclipse 80i) ajustando los filtros correspondientes para observar las bacterias marcadas con GFP y el color rojo fluorescente emitido por toda la raíz cubierta con el yoduro de propidio, con el fin de utilizar software de edición de fotos para realizar una composición.

Para observar las micorrizas se utilizó microscopía óptica (Nikon® Eclipse 80i). Las raíces fueron colocadas sobre portaobjetos y se cubrieron con un poco de agua y un cubreobjetos. Posteriormente, se visualizaron mediante microscopía de campo claro donde las hifas color azul sobre los tejidos radiculares. Cabe destacar que algunos hongos muestran hifas muy pigmentadas, las cuales no se tornarán de un marcado color azul y serán observadas como especie de color caramelo, importante identificar estructuras tubulares muy largas sobre el tejido radicular.

8.6. Tolerancia y bioacumulación de metales bajo condiciones de invernadero

El ensayo en invernadero se llevó a cabo en el Servicio de Invernadero Experimental del Parque Científico de la Universidad de Salamanca (PC-USAL). En este ensayo solo se utilizaron los metales que mostraron buenos resultados *in vitro*: ZnSO₄, AlCl₃ y PbCl₂. Por tanto, los tratamientos realizados fueron:

- Control sin inocular y sin presencia de metales
- Control sin inocular y en presencia de cada uno de los metales (ZnSO₄, AlCl₃, PbCl₂)
- FCAP 26
- Micorriza
- FCAP 26 + Micorriza para cada uno de los metales

Cabe añadir que estos tratamientos se realizaron para ambas plantas (*Erophaca baetica* L. y *Astragalus pelecinus* L., además esta última planta todos los metales fueron mezclado en las mismas macetas).

Se utilizaron macetas de un volumen de 0,7L las cuales fueron rellenas con un sustrato compuesto de turba con vermiculita en una proporción de 3:1, respectivamente, añadiéndose también el metal correspondiente, añadiendo la mayor concentración de los metales tolerada por las plantas inoculadas con bacterias en los ensayos *in vitro*, tomando en cuenta el

volumen de las macetas para el cálculo. En cada maceta se colocaron 5 semillas esterilizadas y pregerminadas (siguiendo lo descrito en la sección 8.3) de la planta correspondiente. Una vez germinadas las semillas en las macetas se dejaron solamente 3 plantas por macetas, las cuales fueron inoculadas con 1ml de una suspensión bacteriana de una densidad óptica de 0,5 a 600nm y en el caso de la micorriza comercial, la proporción indicada por el fabricante.

Las plantas de *Erophaca baetica* L. estuvieron en invernadero durante 11 semanas, ya que su crecimiento y desarrollo era un poco más lento. En cambio, *Astragalus pelecinus* L. solamente estuvo 6 semanas en invernadero. Una vez transcurrido ese tiempo para cada una de las plantas, se extrajeron de las macetas y fueron lavadas cuidadosamente. Se les tomaron medidas de pesos, tanto húmedo como seco, de las partes aéreas y radiculares, se midieron las longitudes aéreas y radiculares y se tomaron medidas del contenido en clorofila utilizando un dispositivo Konica Minolta® SPAD-505 Plus. Por último, a los mejores tratamientos junto a su respectivo control se les determinó el contenido en carbono, nitrógeno y la presencia del metal añadido al suelo en su interior, con el fin de evaluar y cuantificar si había sido bioacumulado por la planta en mayor cantidad cuando son inoculadas ya sea por una bacteria con potencial PGPR y/o por micorrizas.

9. Ensayos del potencial de las cepas de este estudio como antifúngicos

9.1. Aislamiento de hongos fitopatógenos de semillas de garbanzo e identificación de cepas productoras de antifúngico entre los aislados de este estudio

Los hongos utilizados en las pruebas para evaluar si nuestras cepas eran capaces de inhibir su crecimiento, fueron aislados de semillas de garbanzo en otros ensayos donde crecieron hongos sobre las mismas cubriendo toda su superficie y la plántula no se lograba desarrollar. Estos hongos fueron aislados y crecidos en medio Sabouraud-Cloranfenicol (Sigma®) (tabla 39) e incubados a 25°C, revisando y haciendo varios cultivos para confirmar su pureza.

Tabla 39. Composición del medio de cultivo Sabouraud-Cloranfenicol

Componente	Cantidad g/L
Peptona de Caseína	5,0
Dextrosa	40,0
Digestión péptica de tejido animal	5,0
Cloranfenicol	0,05
Agar	15,0

Una vez purificadas las cepas, éstas fueron crecidas en medio Agar Patata Dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) (tabla 40) durante 7 días a 25°C. Cuando las cepas estuvieron crecidas, el micelio fue recolectado con un asa de platino en forma de L esterilizada. La extracción de ADN se realizó como se describe en la sección 2.3.2 de materiales y métodos.

Tabla 40. Composición del medio de cultivo PDA

Componente	Cantidad g/L
Extracto de patata	4,0
Dextrosa	20,0
Agar	20,0

Los hongos fueron identificados mediante la amplificación de la región espaciadora interna o ITS (por sus siglas en inglés). Para esto se utilizaron 15µl de REDTaq® DNA Polymerase master mix, 2µl del primer ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') a una concentración de 2µM, 2µl del primer ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') a 2µM, 9,0µl de agua destilada y 2µl del ADN extraído. La amplificación se llevó a cabo con los siguientes parámetros del termociclador: 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de: 95°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto y 20 segundos y 72°C por 1 minuto y 30 segundos; una extensión final de 72°C por 7 minutos. El producto de la amplificación se visualizó mediante electroforesis con gel de agarosa al 1,0% a 70V durante 100 minutos. La extracción y purificación de la banda del gel es similar a la descrita en la sección 2.6 de materiales y métodos; y la identificación se realizó mediante un “Basic Local Alignment Search Tool” de NCBI.

Una vez identificados los diferentes hongos que afectaron el crecimiento de las plántulas de garbanzo, se evaluó si la colección de bacterias aisladas de nódulo de garbanzo de este estudio eran capaces de inhibir algunos de los hongos aislados. En este sentido, se realizó una primera fase, en la cual se utilizaron placas Petri cuadradas (120 x 120mm) y se preparó una suspensión bacteriana a una turbidez similar al número 6 de la escala McFarland. Todas las bacterias fueron crecidas en medio YMA (tabla 16) e incubadas a 28°C, el tiempo de incubación varió para cada uno de los grupos de microorganismos; las bacterias del grupo rizobio se dejaron crecer durante 5 días, las actinobacterias durante 12 días y los demás bacilos Gram positivos durante 48 horas. En las placas Petri con medio YMA (tabla 16), se colocaron 5µl de la solución del inóculo, como se observa en la figura 18, en la que cada círculo representa una cepa diferente. Posteriormente, entre cada uno de los inóculos bacterianos, de manera vertical se extendió un asa con una suspensión de esporas fúngicas. Esta placa fue incubada a 28°C y se evaluó de forma periódica a fin de identificar las cepas capaces de inhibir los diferentes hongos identificados.

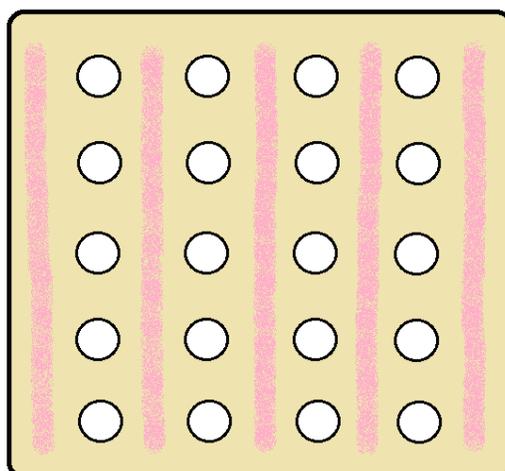


Figura 18. Esbozo para corroborar la inhibición del crecimiento fúngico por parte de las cepas aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L. Los círculos blancos representan los inóculos de cada cepa y las líneas en rosa el hongo.

Con aquellas cepas que mostraron alguna interacción antagonista con los hongos, se realizó una segunda fase para confirmar y evaluar el grado de inhibición de los hongos. En esta ocasión se utilizó el Medio Antibiótico N°1 (Conda Prosis®) (tabla 41), éste es un medio estandarizado para realizar ensayos de producción de antibióticos.

Tabla 41. Composición del Medio Antibiótico

Componente	Cantidad g/L
Peptona	6,0
Digestión pancreática de caseína	4,0
Extracto de levadura	3,0
Extracto de carne	1,5
Dextrosa	1,0
Agar	15,0

En cada placa Petri redonda (100 x 15mm) y con el Medio Antibiótico N°1 se inoculó en el mismo centro en forma de una línea la cepa con potencial antifúngico, utilizando un asa estéril. En la misma placa en los extremos alejados de la cepa (en la línea central) se cultivaron utilizando un asa estéril en forma de L los hongos fitopatógenos. Estas placas fueron incubadas a 25°C, temperatura óptima de crecimiento de los hongos empleados, y se evaluaron de forma periódica a fin de ver si se veía afectado el crecimiento radial de los hongos según se acercaban a la línea central de la cepa bacteriana aislada de nódulo de garbanzo.

9.2. Ensayo invernadero para probar el potencial antifúngico en planta de los aislados bacterianos

9.2.1. Inoculación y cultivo de garbanzo en presencia de *Fusarium* sp.

El ensayo de invernadero y la inoculación de las cepas bacterianas se realizó de la misma manera ya descrita en la sección 6.1 de materiales y métodos, con algunas diferencias: Las semillas pregerminadas antes de cultivarlas fueron introducidas en una solución de esporas de los hongos seleccionados pertenecientes al género *Fusarium* durante 5 minutos. Estas suspensiones contenían entre 2,5 a 4,7 x 10⁶ UFC/ml de hongos filamentosos. Esta suspensión fue obtenida tras crecer los hongos en PDA a 25°C durante 14 días, este tiempo prolongado sirvió para favorecer la esporulación de los hongos. Bajo condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar vertical a estas placas se les añadió agua destilada estéril y con un asa estéril se mezcló para intentar recuperar el mayor número de esporas e hifas capaces de volver a formar un nuevo crecimiento independiente. La cantidad de UFC se determinó mediante diluciones seriadas, inoculando en placas de PDA y evaluación del crecimiento diario.

Después, antes de colocar las plantas en las macetas, éstas fueron sumergidas en la solución fúngica correspondiente. A los 2 días las plantas fueron inoculadas con aquellas cepas que mostraron actividad antifúngica *in vitro*. Cabe añadir que también se inoculó y coinoculó en presencia de estos hongos las cepas que mostraron los mejores resultados invernadero en el ensayo anterior (sección 5.2.1). Las plantas se dejaron durante 2 meses, y se evaluó el número de plantas desarrolladas, longitudes (radicular y parte aérea), pesos (húmedo y seco para la parte aérea y radicular). Como controles del ensayo se inocularon plantas con hongos fitopatógenos sin bacterias productoras de antifúngicos y plantas sin inocular con bacterias ni hongos.

10. Adaptabilidad de cepas filogenéticamente relacionadas, aisladas con 14 años de diferencias.

10.1. Estudio genético

Como ya se mencionó anteriormente, en este trabajo se aislaron cepas bacterianas a partir de plantas trampa de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) crecidas en suelo procedentes de la localidad de Fuentesauco. Estos aislados se obtuvieron en dos periodos de tiempo diferentes, en primer lugar, las cepas denominadas FCAP en el año 2000 (32 cepas) y luego las cepas FSZ en 2014 (66 cepas). Tras haber realizado un análisis filogenético del gen 16S rRNA, los genes housekeeping *recA*, *glnII*, *atpD*, *rpoB* y la concatenación de *recA* con *glnII* de las cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium* de este estudio, muestran la existencia de un grupo de cepas muy relacionadas entre sí, pero aislados con 14 años de diferencias. Estas cepas fueron FCAP 30, FSZ 50 y FSZ 51.

Por tanto, a estas cepas se le extrajo el ADN con el fin de evaluar si existían cambios genéticos que pudieran estar relacionados con mejores tolerancias a condiciones medioambientales más adversas (sequía, mayores temperaturas, tiempos prolongados de

calor, resistencia a presencia de metales, entre otros). El ADN genómico se extrajo utilizando el kit Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante, como se muestra en la sección 2.8 de materiales y métodos. El ADN genómico fue enviado al Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, para su secuenciación, mediante la plataforma Illumina Miseq (2x250pb). Las secuencias obtenidas se ensamblaron mediante Velvet 1.2.10.

Una vez obtenida la secuencia del genoma, la misma fue anotada utilizando el programa RAST 4.0. (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek et al., 2013).

10.2. Adaptabilidad de las cepas en condiciones tropicales

A fin de evaluar si las cepas aisladas en este estudio se adaptarían a condiciones tropicales, se inocularon en plantas de garbanzo cultivadas en macetas como se explicó en la sección 6.1 de materiales y métodos, pero utilizando como sustratos diversos suelos de Puerto Rico, Inceptidol (suelos volcánicos recientes) y Etisol (pobres en materia orgánica y con desarrollo limitado), siendo estos últimos recogidos a 38m de la costa y molisol (suelo de pastizales). Además del estrés que puedan tener por las condiciones del suelo, los diferentes tratamientos y controles se colocarán en 2 microclimas característicos de las zonas tropicales a fin de confirmar cómo es la interacción con las plantas a diversas temperaturas y cantidad de precipitación. Por tanto, las plantas con cada tipo de suelo fueron colocadas en 2 lugares de Puerto Rico: una zona de altas precipitaciones y temperaturas más frescas (Villalba) y una zona más seca y temperaturas más altas (Ponce). El crecimiento y desarrollo de las plantas de garbanzo fueron evaluados y analizados sus longitudes aéreas, longitudes radiculares, cantidad de nódulos, pesos húmedos aéreos, pesos húmedos radiculares, pesos secos aéreos, pesos secos radiculares. En resumen, se colocó utilizando los tres suelos diferentes, en dos microclimas diferentes los tratamientos de plantas con FCAP 30, FSZ 50 y control sin inocular.

11. Análisis de datos

La anotación de los datos numéricos para su posterior análisis y procesamiento se realizó utilizando el programa Excel (Microsoft). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA utilizando el software Statview 5.0 (SAS Institute Inc.) con un nivel de significancia de $p \geq 0.05$.

Las fotografías tomadas se realizaron utilizando una cámara digital compacta Canon PowerShot G12, 10MP, 5x. La edición de todas las imágenes se realizó con el programa Adobe Photoshop CS5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Estudio de Biodiversidad bacteriana de endófitos y
endosimbiontes presente en nódulos de *Cicer arietinum*
L.**

CAPÍTULO I

1. Recolección de muestras y aislamiento

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es una de las tres leguminosas más cultivadas y de mayor importancia a nivel mundial, además, es una fuente importante de proteínas en las dietas humanas a base de cereales en países en vías de desarrollo (Laranjo et al., 2008). A pesar de esto, no se considera una planta modelo y, por lo tanto, es una de las leguminosas menos estudiadas (Khan et al., 2010). Por consiguiente, en este trabajo se pretende en primer lugar conocer la biodiversidad bacteriana presente en el interior de los nódulos a fin de determinar si los microorganismos endófitos presentes en el nódulo podrían tener alguna relación simbiótica eficiente, que pudiera ser aplicada mediante la adición de biofertilizante en los cultivos de esta planta y quizás en otras.

En primer lugar, se tomó suelo de la localidad de Fuentesauco, en la provincia de Zamora, España (41.230873, -5.488914) (figura 19), municipio de gran tradición en el cultivo de esta leguminosa, de hecho, el garbanzo que se cultiva en esta zona posee una Indicación Geográfica Protegida (Garbanzo de Fuentesauco). Para que este tipo de garbanzo mantenga esta Indicación Geográfica Protegida deben ser cultivados en las siguientes municipalidades de zamoranas: Argujillo, La Bóveda de Toro, Cañizal, Castrillo de la Guareña, El Cubo de Tierra del Vino, Cuelgamures, Fuentelapeña, Fuentesauco, Fuentespreadas, Gema, Guarrate, El Maderal, El Pego, El Piñero, San Miguel de la Ribera, Santa Clara de Avedillo, Sanzoles, Vadillo de la Guareña, Vallesa, Villabuena del Puente, Villaescusa y Villamor de los Escuderos; comprendiendo una zona de 678 km². El tipo de garbanzo cultivado en estas zonas se caracteriza por ser un grano con un pico pronunciado, color crema de piel rugosa y sin manchas. Tras su recolección presenta albumen mantecoso, poco granuloso y piel blanda (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente), este tipo de selección de grano se comenzó desde 1994 (Rodríguez et al., 2006).



Figura 19. Localización del suelo que se empleó para la realización de estos estudios.

Los suelos de esta zona son suelos profundos de buen drenaje. Su textura es franca o franco-arenosa y su pH es ácido o ligeramente alcalino, donde sus niveles de calcio asimilable es bajos o medios. Además, la relación carbono/nitrógeno es baja y la salinidad es muy baja. Cabe destacar que en esta zona los inviernos tiende a ser largos y fríos, donde las heladas son frecuentes, esto facilita el control de plagas y otras enfermedades en las plantas de garbanzo (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Dichas condiciones edáficas y climatológicas influirán en la microbiota del suelo y, por consiguiente, su interacción con las plantas de garbanzo.

Debido a la importancia de este cultivo en esta zona de Indicación Geográfica Protegida de garbanzo, este fue el lugar elegido para la recogida del suelo empleado en este estudio. El suelo fue colectado y colocado en macetas en las cuales se cultivaron semillas de garbanzo esterilizadas y pregerminadas, con el fin de utilizarlas como plantas trampa. Una vez las plantas se desarrollaron, se recogieron sus nódulos y se aislaron de ellos microorganismos endófitos, tal y como se explica en la sección 1.3 de materiales y métodos, obteniendo un total de 66 cepas las cuales fueron denominadas como FSZ seguidas de una numeración (Tabla 42). Además, entre las colecciones de microorganismos de nuestro grupo de investigación existía un grupo de 29 cepas que fueron aisladas también de garbanzo en el año 2000, siguiendo la misma metodología y procedentes de la misma zona de estudio, las cuales se incluyeron también en este trabajo. Estas cepas fueron denominadas FCAP seguidas de la numeración correspondiente (Tabla 42). Así, en este trabajo se han estudiado 95 cepas, 66 aisladas en el año 2014 (cepas FSZ) y 29 aisladas en el año 2000 (cepas FCAP).

2. Caracterización fenotípica de las cepas aisladas de nódulos de garbanzo

2.1. Características morfológicas coloniales

Las características de las colonias de las cepas de este estudio crecidas en medio YMA ya muestra la existencia de diversidad entre las mismas (Tabla 42).

A rasgos generales, hubo un grupo de microorganismos que ya a los 2 días mostraban buen crecimiento. Los mismos mostraban un color blanco, aunque algunos variaban en tonalidad blanquecina. La mayoría tenían una forma colonial redonda y la elevación de éstas variaba, alguna eran flat y otras convexas. De igual forma, el margen de estas colonias algunas eran irregulares y otras fueron de margen entero, dichas características por cada cepa se muestran en la tabla 42.

Otro grupo grande de microorganismos se desarrollaron bien en medio YMA a los 5 días. Las cepas de este segundo grupo mostraron colonias de color blanco, forma circular, elevación convexa y margen entero. Y una característica destacable de este grupo de microorganismos fue que las colonias mostraban mucosidad. Se corresponden con esta morfología los aislados denominados FCAP (exceptuando FCAP 28), FSZ 50-52, FSZ 61, FSZ 63, FSZ 64 y FSZ 66.

Por último, se observó un tercer grupo donde la mayoría de las colonias crecieron pasados los 8 días. Este grupo diverso de microorganismos estaba constituido por las cepas FSZ 53 -58 y FSZ 65. En los mismos observamos colores de las colonias como marrón, marrón-anaranjado, anaranjado intenso, verde oscuro, rosado y anaranjado. A rasgos generales, estas cepas tenían forma redonda y margen entero. La elevación de las colonias de este grupo era convexa o plana; además, se incrustaban en el medio de cultivo.

La figura 19, muestra algunas de las colonias y sus características morfológicas.

Tabla 42. Listado y características morfológicas coloniales de los endófitos aislados de nódulos de garbanzo en medio YMA.

Muestras	Color de Colonia	Forma de Colonia	Elevación	Margen	Otras Características
FCAP 03	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 04	Blanco-crema	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 06	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 09	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 11	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 15	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 16	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 17	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 18	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 19	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 20	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 21	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 22	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 23	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 24	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 25	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 26	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 28	Blanco	Irregular	Flat	Lobulado	No mucoso
FCAP 29	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 30	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 31	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 33	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 34	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 35	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 36	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 37	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso

Muestras	Color de Colonia	Forma de Colonia	Elevación	Margen	Otras Características
FCAP 38	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 39	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FCAP 40	Blanco	Circular	Convexa	Entero	Mucoso
FSZ 01	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	irregular	Poco brillante
FSZ 02	Translúcido	Irregular	Flat	Irregular	No mucosa
FSZ 03	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	irregular	Poco brillante
FSZ 04	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	irregular	Poco brillante
FSZ 05	Blanco	Redonda	Convexa	Entera	Poco brillante
FSZ 06	Translúcido	Irregular	Flat	lobulado	No mucosa
FSZ 07	Blanco	Redonda	Convexa	Entera	No mucosa ni brillante
FSZ 08	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa ni brillante
FSZ 09	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Brillante
FSZ 10	Blanco	Redonda	Convexa	Entera	Poco brillante
FSZ11	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa ni brillante
FSZ 12	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa ni brillante
FSZ 13	Blanco	Redonda	Convexa	Entera	Poco brillante
FSZ 14	Blanco	Redonda	Flat	Entero	No Mucosa
FSZ 15	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	Poco brillante
FSZ 16	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	Poco brillante
FSZ 17	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa
FSZ 18	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa, colonias muy pequeñas
FSZ 19	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	Poco brillante

Muestras	Color de Colonia	Forma de Colonia	Elevación	Margen	Otras Características
FSZ 20	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa ni brillante
FSZ 21	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa ni brillante
FSZ 22	Blanco	Redonda	Convexa	Entera	Poco brillante
FSZ 23	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	Poco brillante
FSZ 24	Blanco translúcido	Redonda	Convexa	Entero	No mucosa
FSZ 25	Blanco, borde Translúcido	Redonda	Convexa	Irregular	Poco brillante
FSZ 26	Translúcido	Redonda	Flat	Entero	No Mucosa
FSZ 27	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Poco brillante
FSZ 28	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	No Mucosa
FSZ 29	Translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No Mucosa
FSZ 30	Blanco Translúcido	Redonda	Convexa	Entero	No Mucosa
FSZ 31	Blanco	Redonda	Flat	Entero	Poco brillante
FSZ 32	Blanco-crema	Redonda	Flat	Irregular	No Mucosa
FSZ 33	Blanco translúcido	Redonda	Flat	Entero	No Mucosa
FSZ 34	Blanco Translúcido	Redonda	Convexa	Entero	No Mucosa
FSZ 35	Blanco	Redondo	Conexa	Entero	No mucosa
FSZ 36	Blanco Translúcido	Redondo	Flat	Entero	No mucosa
FSZ 37	Blanco	Redondo	Conexa	Entero	No mucosa
FSZ 38	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	No mucosa y poco brillante
FSZ 39	Blanco Translúcido	Redonda	Flat	Lobulado	No Mucosa
FSZ 40	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	No mucosa, iridiscente
FSZ 41	Blanco Translúcido	Redonda	Flat	Entero	No Mucosa
FSZ 42	Translúcido	Redonda	Flat	Entero	No mucosa ni brillante
FSZ 43	Blanco translúcido	Redonda	Flat	Entero	No mucosa
FSZ 44	Blanco con borde translúcido	Redonda	Flat	Irregular	No mucosa

Muestras	Color de Colonia	Forma de Colonia	Elevación	Margen	Otras Características
FSZ 45	Translúcido	Redonda	Flat	Entero	No mucosa ni brillante
FSZ 46	Blanco translúcido	Redonda	Flat	Entero	No Mucosa
FSZ 47	Translúcido	Redonda	Flat	Entero	No mucosa
FSZ 48	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Poco brillante
FSZ 49	Translúcido	Redonda	Convexa	Irregularidades	No mucoso
FSZ 50	Blanco-crema	Redonda	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 51	Blanco	Redondo	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 52	Blanco-crema	Redondo	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 53	Marrón	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa y duro
FSZ 54	Marrón-naranja	Redondo	Flat	Entero	No mucosa y duro
FSZ 55	Anaranjado intenso	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa y duro
FSZ 56	Verde oscuro	Redondo	Flat	Entero	No mucosa y duro
FSZ 57	Rosado	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa y un poco duro
FSZ 58	Anaranjado	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa y duro
FSZ 59	Blanco	Irregular	Flat	Irregular	No mucosa
FSZ 60	Blanco	Irregular	Flat	Irregular	No mucosa
FSZ 61	Blanco	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa, iridiscente
FSZ 62	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 63	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 64	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Mucosa
FSZ 65	Anaranjado	Redondo	Convexa	Entero	No mucosa y duro
FSZ 66	Blanco	Redonda	Convexa	Entero	Mucosa

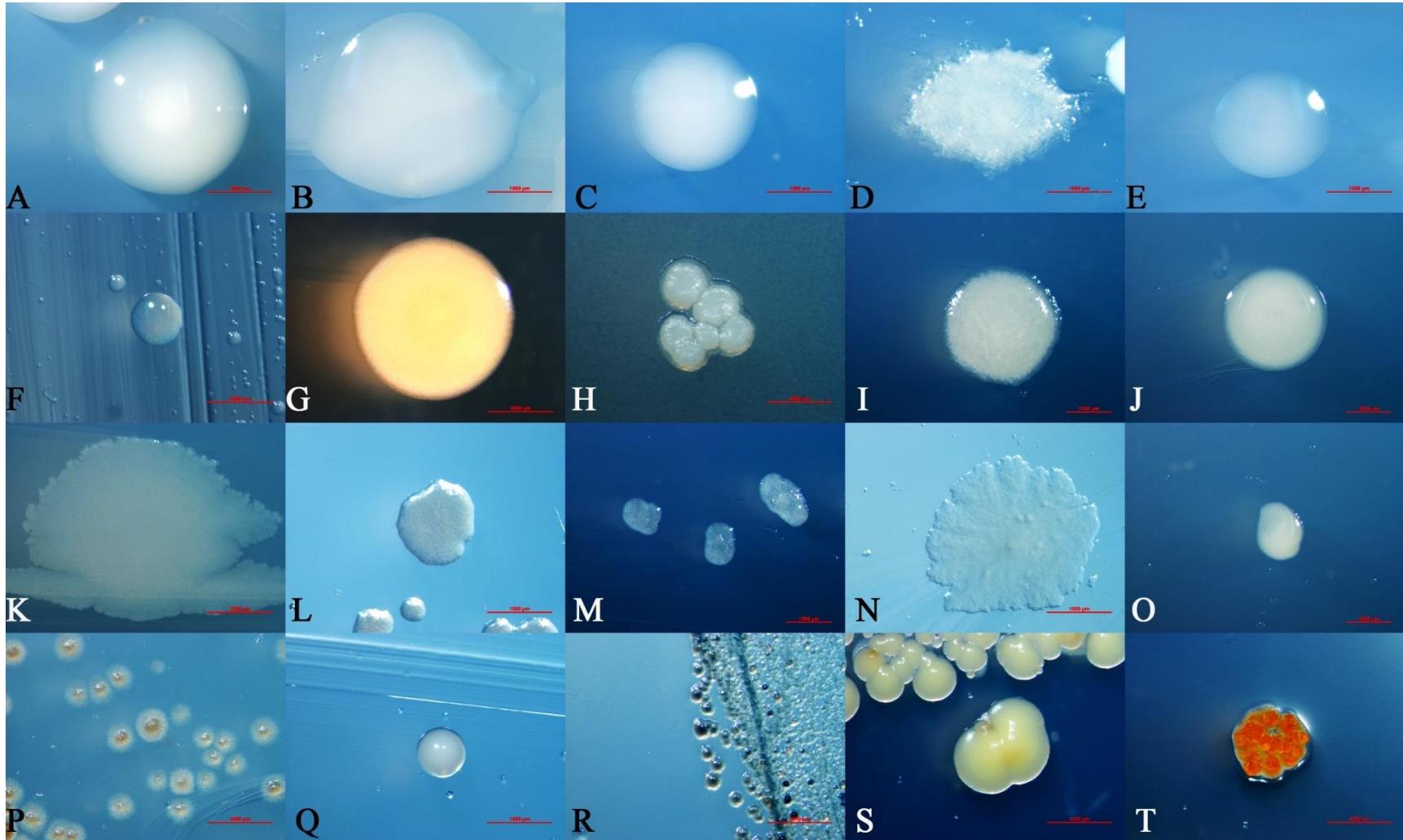


Figura 19. Muestra la morfología colonial de algunas de las cepas aislados como endófitos de nódulos de *Cicer arietinum* L. A. FCAP 04, B. FCAP 15, C. FCAP 19, D. FCAP 28, E. FCAP 29, F. FCAP 30, G. FSZ 02, H. FSZ 04, I. FSZ 05, J. FSZ 14, K. FSZ 26, L. FSZ 38, M. FSZ 39, N. FSZ 49, O. FSZ 52, P. FSZ 53, Q. FSZ 54, R. FSZ 56, S. FSZ 57 y T. FSZ 58.

2.2. Características morfológicas microscópicas

Una vez aisladas y crecidas las cepas, se evaluaron sus características microscópicas mediante tinción Gram de las células y observación de las preparaciones con microscopía óptica. En este sentido, la morfología celular de la mayoría de las cepas fue bacilar. De este grupo las que mostraron las características mucosas (tabla 42) resultaron ser bacterias Gram negativas. Por otro lado, los bacilos no mucosos resultaron ser bacterias Gram positivas.

Además, el grupo de microorganismos que mostraban crecimiento pasados los 8 días y mostraban diversidad de colores presentaban una morfología de filamentos ramificados

Las características microscópicas de cada una de las cepas se muestran en la tabla 43. Además, imágenes recogidas de algunas cepas representativas de cada grupo se pueden observar en la en la figura 20.

Tabla 43. Características microscópicas de las cepas de estudio

Muestras	Forma	Gram	Muestras	Forma	Gram
FCAP 03	Bacilo	Gram -	FCAP 39	Bacilo	Gram -
FCAP 04	Bacilo	Gram -	FCAP 40	Bacilo	Gram -
FCAP 06	Bacilo	Gram -	FSZ 01	Bacilo	Gram +
FCAP 09	Bacilo	Gram -	FSZ 02	Bacilo	Gram +
FCAP 11	Bacilo	Gram -	FSZ 03	Bacilo	Gram +
FCAP 15	Bacilo	Gram -	FSZ 04	Bacilo	Gram +
FCAP 16	Bacilo	Gram -	FSZ 05	Bacilo	Gram +
FCAP 17	Bacilo	Gram -	FSZ 06	Bacilo	Gram +
FCAP 18	Bacilo	Gram -	FSZ 07	Bacilo	Gram +
FCAP 19	Bacilo	Gram -	FSZ 08	Bacilo	Gram +
FCAP 20	Bacilo	Gram -	FSZ 09	Bacilo	Gram +
FCAP 21	Bacilo	Gram -	FSZ 10	Bacilo	Gram +
FCAP 22	Bacilo	Gram -	FSZ11	Bacilo	Gram +
FCAP 23	Bacilo	Gram -	FSZ 12	Bacilo	Gram +
FCAP 24	Bacilo	Gram -	FSZ 13	Bacilo	Gram +
FCAP 25	Bacilo	Gram -	FSZ 14	Bacilo	Gram +
FCAP 26	Bacilo	Gram -	FSZ 15	Bacilo	Gram +
FCAP 28	Bacilo	Gram +	FSZ 16	Bacilo	Gram +
FCAP 29	Bacilo	Gram -	FSZ 17	Bacilo	Gram +
FCAP 30	Bacilo	Gram -	FSZ 18	Bacilo	Gram +
FCAP 31	Bacilo	Gram -	FSZ 19	Bacilo	Gram +
FCAP 33	Bacilo	Gram -	FSZ 20	Bacilo	Gram +
FCAP 34	Bacilo	Gram -	FSZ 21	Bacilo	Gram +
FCAP 35	Bacilo	Gram -	FSZ 22	Bacilo	Gram +
FCAP 36	Bacilo	Gram -	FSZ 23	Bacilo	Gram +
FCAP 37	Bacilo	Gram -	FSZ 24	Bacilo	Gram +
FCAP 38	Bacilo	Gram -	FSZ 25	Bacilo	Gram +

Muestras	Forma	Gram
FSZ 26	Bacilo	Gram +
FSZ 27	Bacilo	Gram +
FSZ 28	Bacilo	Gram +
FSZ 29	Bacilo	Gram +
FSZ 30	Bacilo	Gram +
FSZ 31	Bacilo	Gram +
FSZ 32	Bacilo	Gram +
FSZ 33	Bacilo	Gram +
FSZ 34	Bacilo	Gram +
FSZ 35	Bacilo	Gram +
FSZ 36	Bacilo	Gram +
FSZ 37	Bacilo	Gram +
FSZ 38	Bacilo	Gram +
FSZ 39	Bacilo	Gram +
FSZ 40	Bacilo	Gram +
FSZ 41	Bacilo	Gram +
FSZ 42	Bacilo	Gram +
FSZ 43	Bacilo	Gram +
FSZ 44	Bacilo	Gram +
FSZ 45	Bacilo	Gram +
FSZ 46	Bacilo	Gram +

Muestras	Forma	Gram
FSZ 47	Bacilo	Gram +
FSZ 48	Bacilo	Gram +
FSZ 49	Bacilo	Gram +
FSZ 50	Bacilo	Gram -
FSZ 51	Bacilo	Gram -
FSZ 52	Bacilo	Gram -
FSZ 53	Actino	Gram +
FSZ 54	Actino	Gram +
FSZ 55	Actino	Gram +
FSZ 56	Actino	Gram +
FSZ 57	Actino	Gram +
FSZ 58	Actino	Gram +
FSZ 59	Bacilo	Gram +
FSZ 60	Bacilo	Gram +
FSZ 61	Bacilo	Gram +
FSZ 62	Bacilo	Gram +
FSZ 63	Bacilo	Gram -
FSZ 64	Bacilo	Gram -
FSZ 65	Actino	Gram +
FSZ 66	Bacilo	Gram -

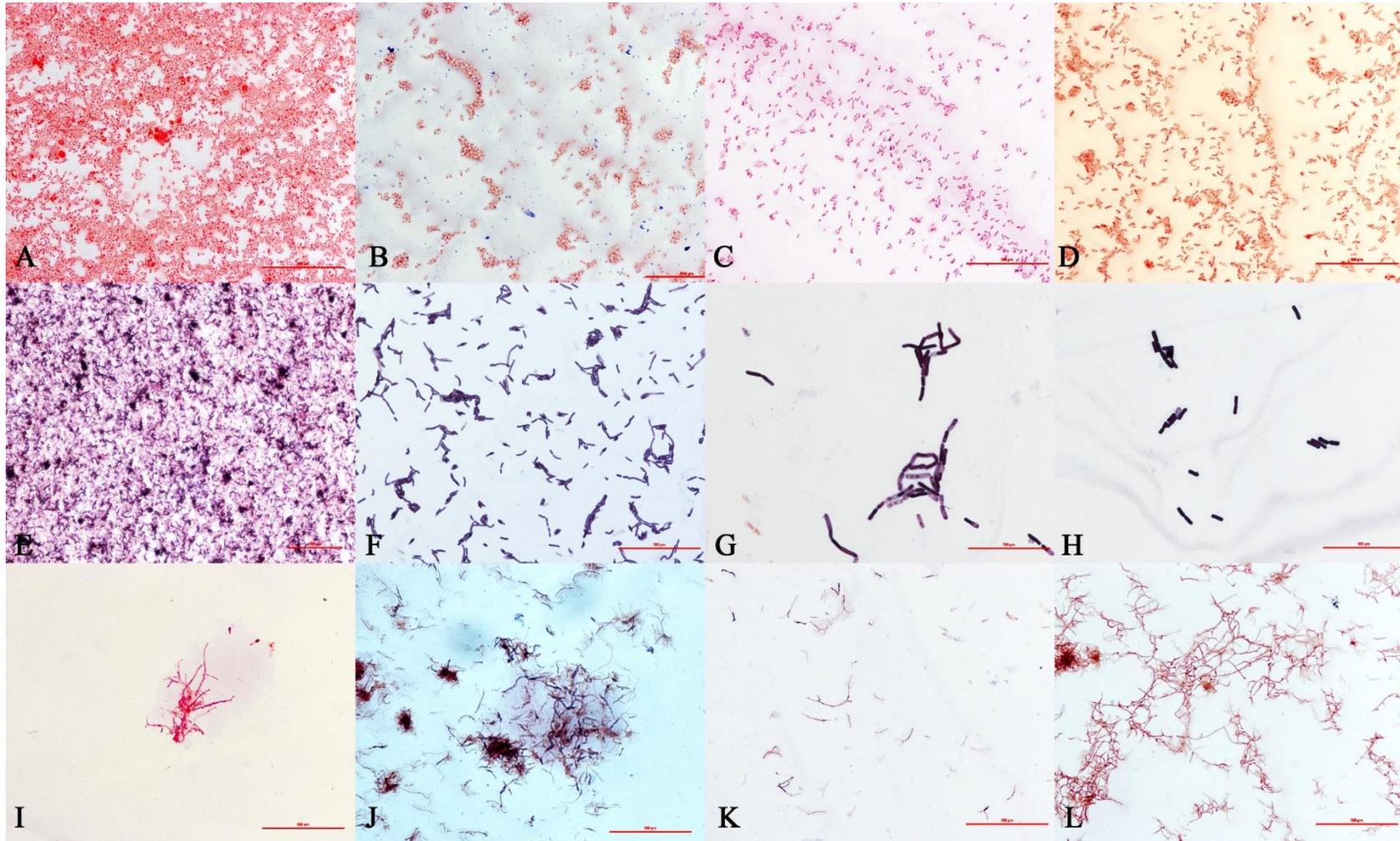


Figura 20. Ejemplos de las cepas endófitas de garbanzo visualizados mediante microscopía óptica y teñidos mediante tinción Gram. A – D Bacilos Gram negativos; E – H Bacilos Gram positivos; I – L Bacterias filamentosas A. FSZ 50, B. FCAP 03, C. FSZ 61, D. FSZ 63, E. FSZ 14, F. FSZ 26, G. FSZ 31, H. FSZ 43, I. FSZ 56, J. FSZ 57, K. FSZ 58 y L. FSZ 65.

3. Caracterización genotípica de las cepas aisladas de nódulos de garbanzo

3.1. Análisis de diversidad microbiana mediante Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico (RAPD).

Para analizar la diversidad existente entre los aislados de este estudio, se llevó a cabo la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés). Los perfiles obtenidos muestran una gran diversidad al comparar todas las cepas como se aprecia en la figura 21. Si analizamos esta totalidad de las cepas conforme a las agrupaciones generadas utilizando el software Bionumeric, podremos determinar unos 50 posibles grupos que están por encima de un 89,5% del coeficiente de correlación Pearson (Figura 21). Cabe destacar que además de evaluar la correlación Pearson, también se evaluó Dice y Jaccard.

Por otro lado, correlacionando lo observado en relación a las características morfológicas y los perfiles de RAPD, se puede hacer un mejor análisis junto con el software Bionumerics, dividiendo las cepas en las tres diferentes morfologías celulares observadas: bacilos Gram negativos, bacilos Gram positivos y bacterias filamentosas. En este sentido, las 35 cepas Gram negativas generaron unos 16 perfiles diferentes (Figura 22). Dentro del grupo de las bacterias con morfología de bacilos Gram positivos, el total de 53 cepas, fueron agrupadas en 46 perfiles diferentes (Figura 23). Cabe destacar que fue necesario realizar una evaluación tanto del coeficiente Pearson, como Dice y Jaccard para poder definir mejor los grupos ya que hubo un grupo de organismos que generaron unas cuatro bandas y el coeficiente Pearson por sí solo no fue capaz de subdividir bien este subgrupo. En tercer lugar, se evaluó las cepas que mostraron morfología de células filamentosas; las 7 cepas de este grupo presentaron 6 perfiles diferentes (Figura 23). En resumen, de la totalidad de las 95 cepas aisladas del interior de los nódulos de garbanzo, se identificaron unos 68 perfiles diferentes. De cada uno de estos perfiles se seleccionó una cepa representante a la que se le secuenció el gen 16S rRNA para su identificación.

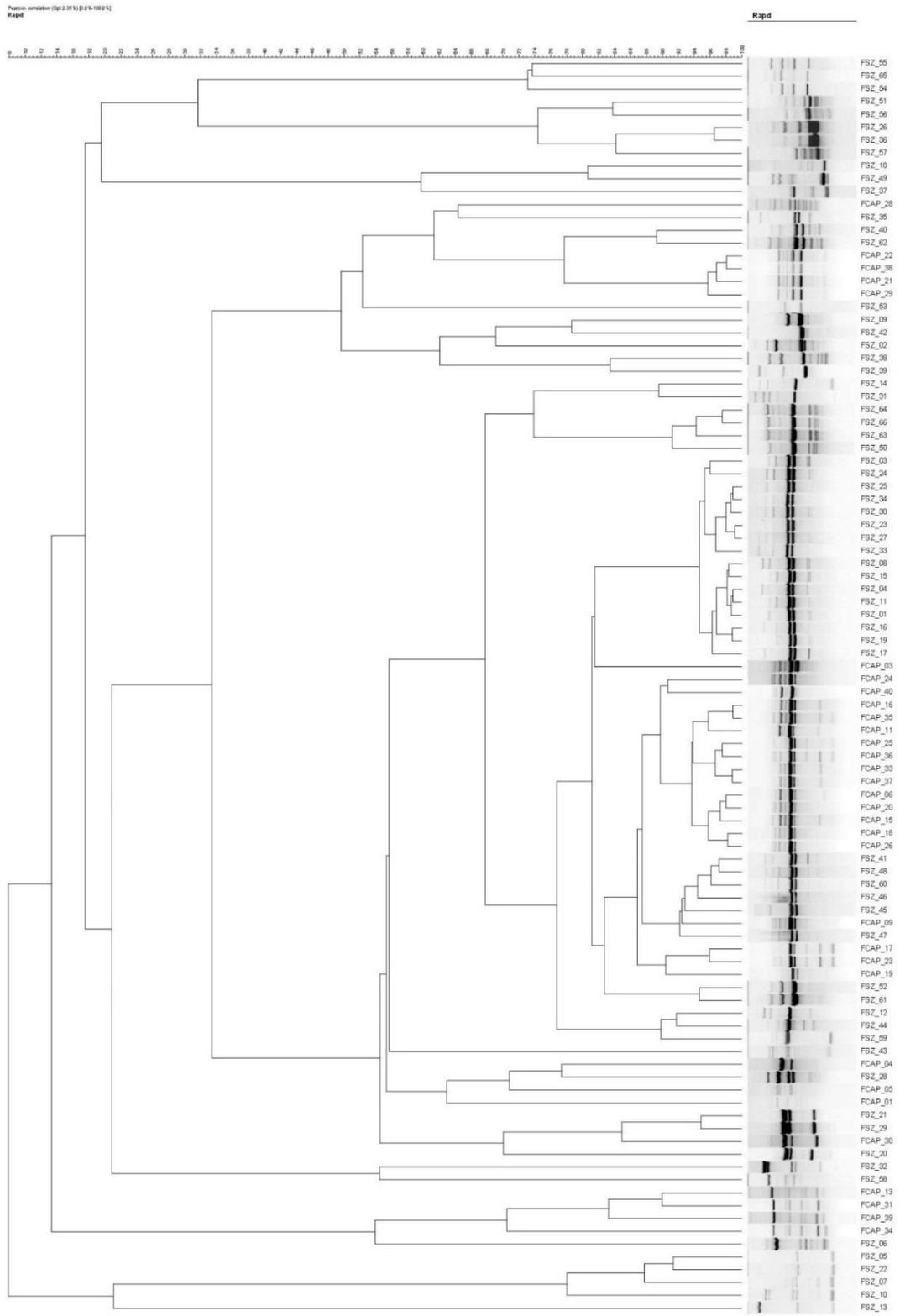


Figura 21. Dendrograma de RAPD basado en la agrupación UPGMA y en el coeficiente de correlación Pearson de todos los endófitos aislados del interior de *Cicer arietinum* L.

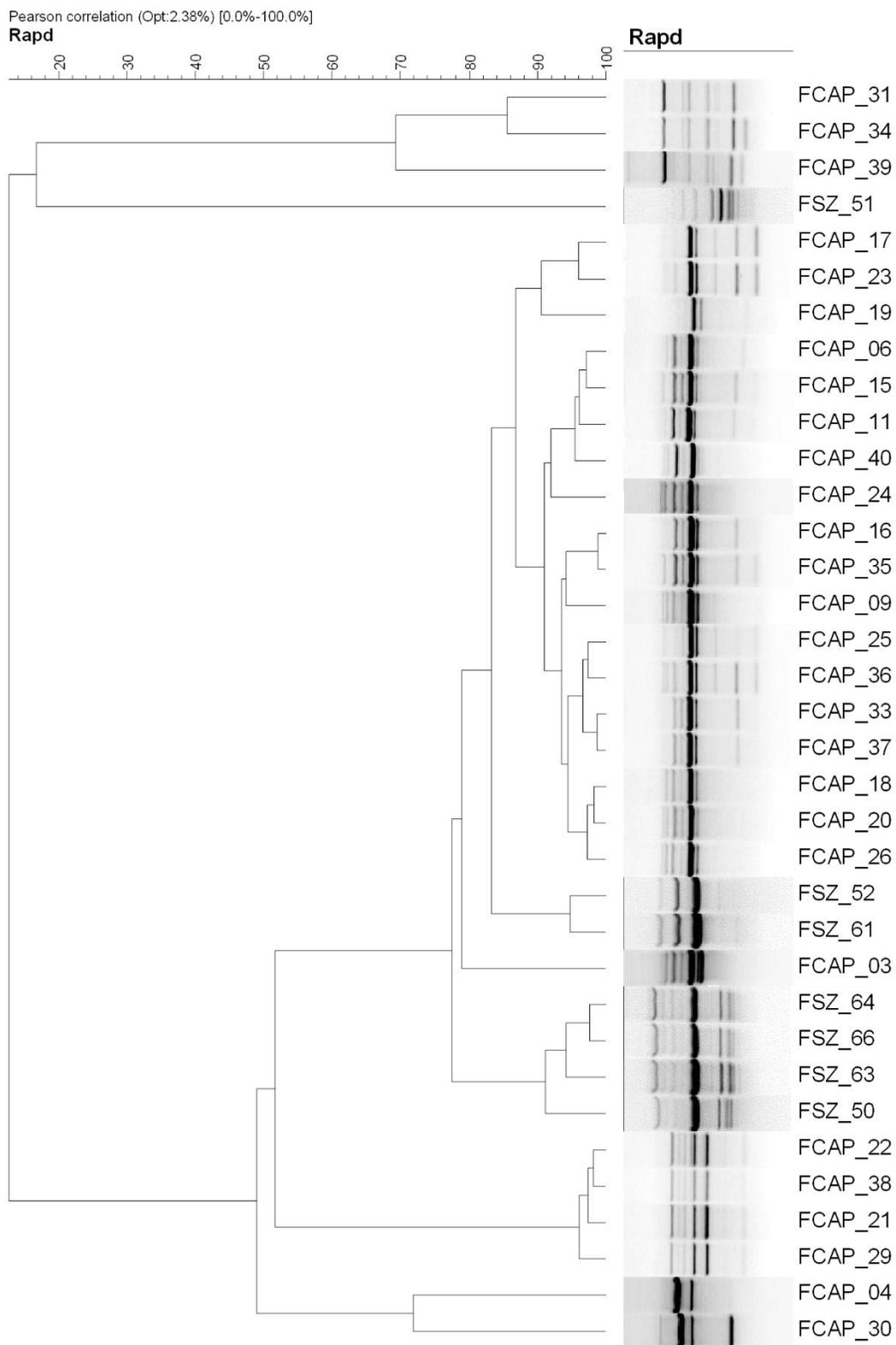


Figura 22. Dendrograma de las cepas con morfología de bacilos Gram negativos analizadas por un RAPD basado en agrupación UPGMA y coeficiente Pearson.

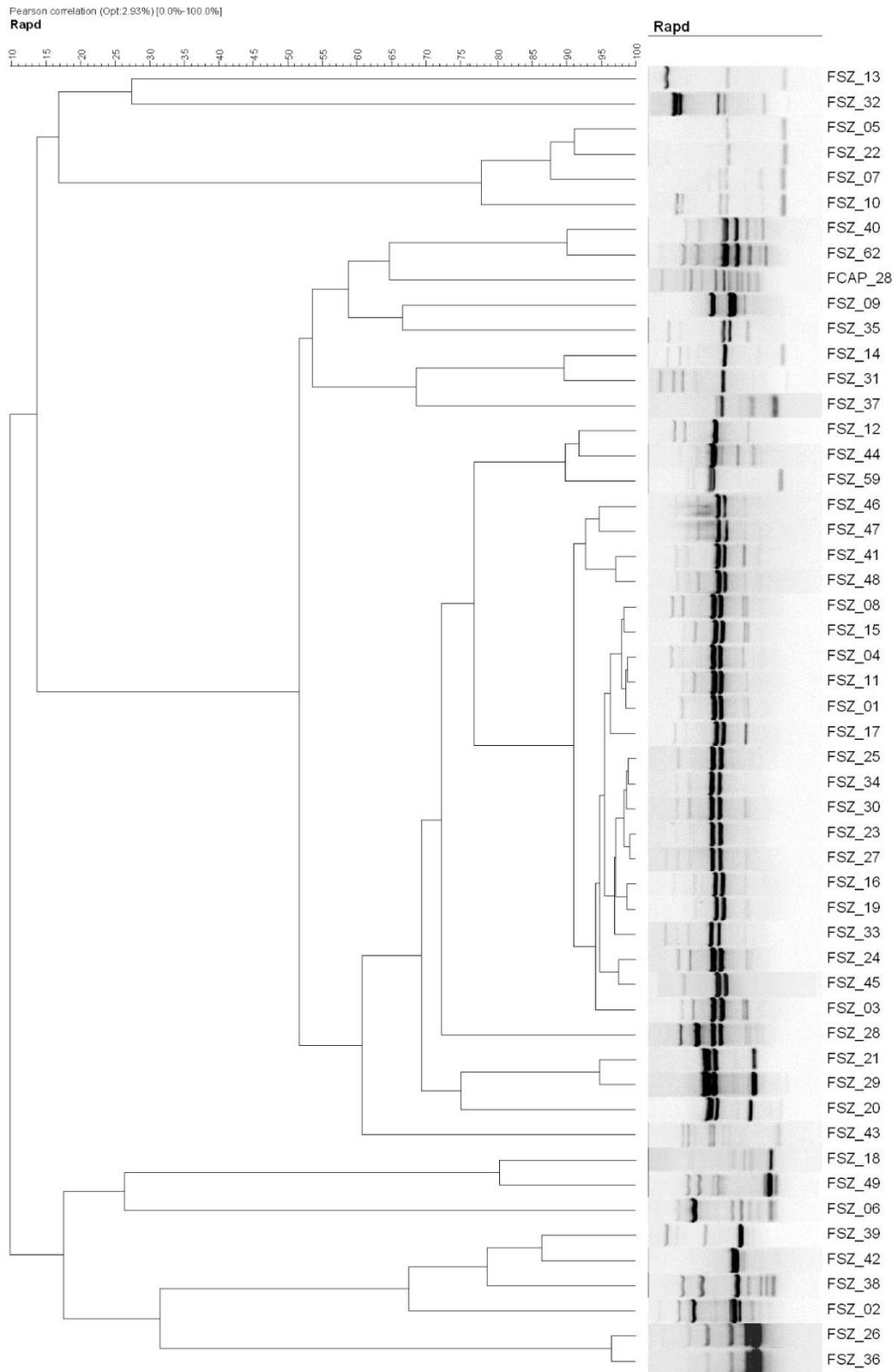


Figura 23. Dendrograma de las cepas con morfología de bacilos Gram positivos analizadas por un RAPD basado en agrupación UPGMA y coeficiente Pearson.

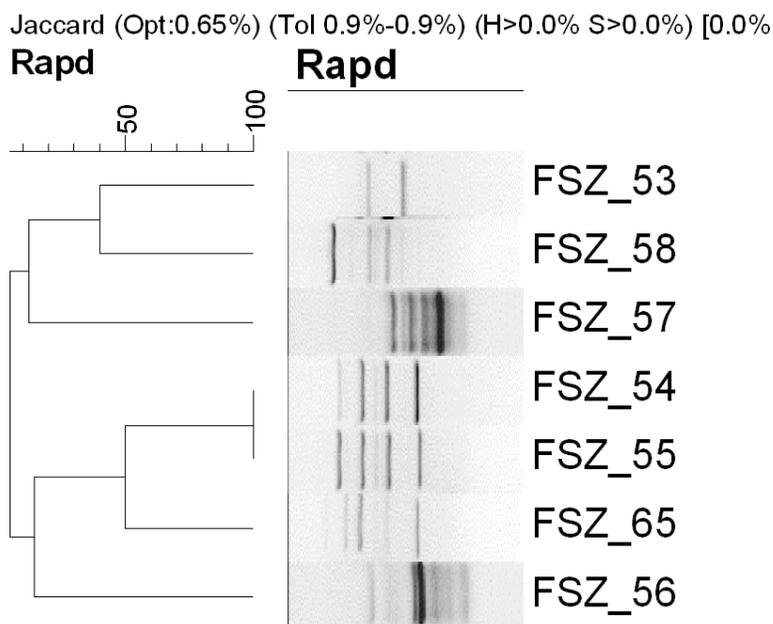


Figura 24. Dendrograma de las cepas con morfología filamentosa analizadas por un RAPD basado en agrupación UPGMA y coeficiente Jaccard.

3.2. Evaluación de las secuencias del gen 16S del ARN ribosomal

Una vez identificado los diversos perfiles genéticos se procedió a seleccionar un miembro de cada perfil para amplificar y secuenciar el gen 16S rRNA. Respecto a los bacilos Gram positivos, las 53 cepas se agruparon en 46 perfiles y el análisis de las secuencias de cada representante de esos 46 perfiles permitió clasificar estas cepas en cuatro géneros diferentes: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus* y *Domibacillus*. La Tabla 44 muestra las especies del género *Bacillus* más próximas a las cepas de este estudio. Éstas se dividen de la siguiente manera: 24 cepas fueron identificadas como *Brevibacterium halotolerans* (reclasificada como *Bacillus halotolerans*, Tindall et al., 2017). Los demás grupos fueron *Bacillus arybhattai* con 8 cepas, *Bacillus megaterium* con 2 cepas, *Bacillus licheniformis* con 3 cepas, *Bacillus timonensis* también con 3 cepas, y *Bacillus halosaccharovorans*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* y *B. aerius*, éstas últimas cuatro especies mencionadas con una cada una. Este género representa un 95% de las bacterias Gram positivas aisladas del suelo y tienen una distribución a nivel mundial. El género *Bacillus* es uno de los géneros más estudiados y uno de los que se obtienen aislados con más frecuencia como endófitos (Ilyas & Bano, 2012). Además, diversas cepas del género *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas por su potencial PGPR (junto con las *Pseudomonas* y rizobios), pues, son capaces de colonizar de manera competitiva el sistema radicular de diversas plantas. Además, diferentes especies de este género pueden utilizarse no solo para fomentar el crecimiento de las plantas, sino también como control biológico (Kumar et al., 2011; Ilyas & Bano, 2012; Kokalis-Burelle et al., 2002; Berg, 2009).

Tabla 44. Identificación a nivel de especie de las cepas de este estudio pertenecientes al género *Bacillus*.

Especie	Cepa
<i>Brevibacterium halotolerans</i> (<i>Bacillus halotolerans</i>)	FSZ 04, FSZ 11, FSZ 16, FSZ 19, FSZ 17, FSZ 23, FSZ 34, FSZ 24, FSZ 30, FSZ 08, FSZ 01, FSZ 15, FSZ 03, FSZ 46, FSZ 47, FSZ 48, FSZ 60, FSZ 09, FSZ 12, FSZ 25, FSZ 27, FSZ 33, FSZ 41, FSZ 45
<i>Bacillus arybhattai</i>	FSZ 05, FSZ 22, FSZ 07, FSZ 10, FSZ 13, FSZ 32, FSZ 35, FSZ 37
<i>Bacillus megaterium</i>	FSZ 14, FSZ 31
<i>Bacillus halosaccharovorans</i>	FSZ 18
<i>Bacillus licheniformis</i>	FSZ 20, FSZ 21, FSZ 29
<i>Bacillus timonensis</i>	FSZ 26, FSZ 36, FSZ 44
<i>Bacillus sonorensis</i>	FSZ 39
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	FSZ 42
<i>Bacillus aerius</i>	FSZ 59

Por otra parte, 5 cepas del estudio se identificaron como pertenecientes al género *Paenibacillus*, las cuales fueron agrupadas en 3 diferentes especies: *P. faecis*, *P. lautus* y *P. tundrae* (Tabla 45). Se han identificado otras especies de *Paenibacillus* como *P. polymyxa* que ha demostrado un buen potencial para fomentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Ésta promueve el crecimiento vegetal de diversas plantas, así pues, posee un rango amplio de hospedadores y coloniza de forma eficiente mediante biofilms (Timmusk et al., 2005). Algunas especies de *Paenibacillus* muestran actividades antagonistas contra algunos fitopatógenos. Por tanto, las cepas de *Paenibacillus* podrían mostrar una excelente capacidad para una agricultura sostenible (Rybakova et al., 2016).

En tercer lugar, tenemos 2 cepas, FSZ 02 y FSZ 06, pertenecientes al género *Domibacillus*, ya que mostraron una similitud de un 98,8% respecto al gen 16S rRNA con su especie más próxima la cual es *D. robiginosus*, manteniéndose en un clado más aislado en el árbol filogenético, lo cual parece indicar que constituyen una nueva especie del género *Domibacillus*. El género *Domibacillus* fue establecido recientemente por Seiler y colaboradores (2013), describiendo la especie *Domibacillus robiginosus*. Este género

pertenece al phylum *Firmicutes*, class *Bacilli*, order *Bacillales* and family *Bacillaceae* (Xu et al., 2016). Desde entonces se han descrito solo 9 especies bajo este género procedentes de diversos entornos. La especie *D. robiginosus* WS 4628^T se aisló del suelo de un cuarto limpio de una farmacéutica en el este de Alemania (Seiler et al., 2013), *D. indicus* SD111^T de sedimentos marinos a 5m de profundidad en Lakshadweep en India (Sharma et al., 2014), *D. enclensis* NIO-1016^T de muestra de sedimentos de la isla Choraó en la provincia de Goa, también en India (Sonalkar et al., 2014), *D. tundrae* PAMC 80007^T de una muestra de suelo de una tundra de Council en Alaska (USA) (Gyeong et al., 2015), *D. iocasae* S6^T procedente de sedimentos del mar profundo de Okinawa Trough en Japón (Sun & Sun, 2016), *D. antri* XD80^T se aisló de suelo procedente de una cueva en Lichuan, en la provincia de Hubei en China (Xu et al., 2016), *D. aminovorans* DSM 1314^T recientemente reclasificada bajo este género y anteriormente conocida como *Bacillus aminovorans* fue aislada de suelos de sedimentos de manglares y la superficie de macroalgas intermareales en India (Verma et al., 2017a). Las últimas 2 especies descritas fueron *D. mangrovi* SAOS44^T y *D. epiphyticus* SAB38^T aisladas de hábitats marinos de la costa oeste central de la India (Verma et al., 2017b). En resumen, todas las especies de este género han sido aislada de diversos ambientes, sin embargo, ningunos de ellos son procedentes o fueron aislados como endófitos de tejidos vegetales.

Tabla 45. Especies más próximas del género *Paenibacillus* a las cepas aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L.

Especie	Cepa
<i>Paenibacillus faecis</i>	FSZ 38, FSZ 40, FSZ 62
<i>Paenibacillus lautus</i>	FSZ 49
<i>Paenibacillus tundrae</i>	FCAP 28

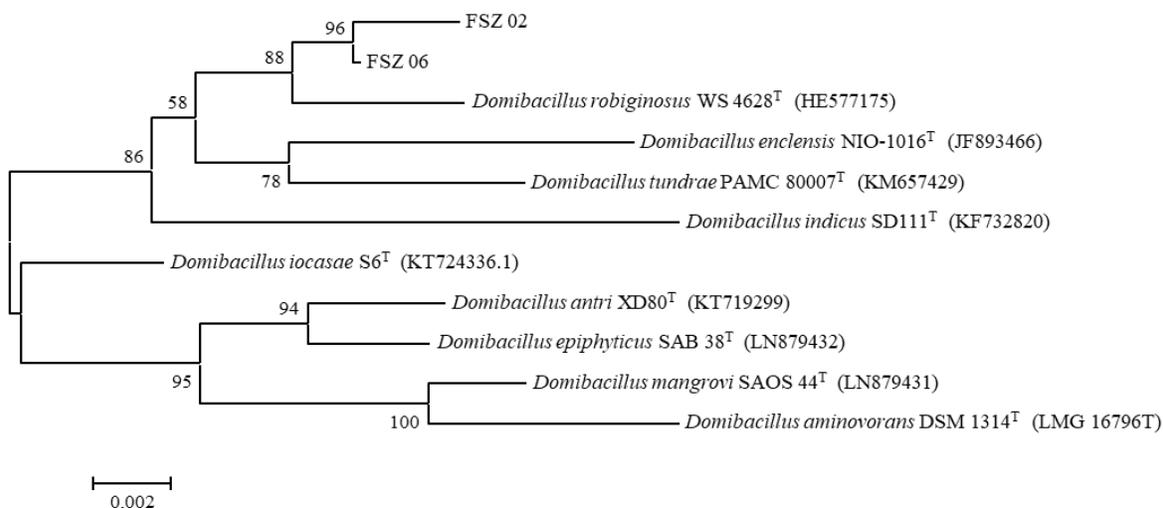


Figura 25. Estudio filogenético de las especies tipo pertenecientes al género *Domibacillus* basados en el gen ribosómico 16S. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,002 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

Por otro lado, la cepa FSZ 28 fue identificada como *Aneurinibacillus migulanus*. El capítulo 5 de esta tesis se centra en el estudio de esta cepa. Los microorganismos que observamos a través de microscopía con característica de bacterias filamentosas, se clasificaron según la secuencia de su gen 16S rRNA en dos géneros diferentes: *Micromonospora* y *Sphaerisporangium* (Figura 26). Referente al género *Micromonospora*, 3 cepas se identificaron como *M. saelicesensis*, 1 como *M. matsumotoense* y otra cepa como *M. yangpuensis*. Por otra parte, solo una cepa (FSZ 53) fue identificada como *Sphaerisporangium dianthi*. En el caso de las *Micromonosporas* éstas se han reportado principalmente en suelos y ambientes acuáticos, donde se cree que está involucrado en los procesos de reciclaje de materia orgánica, principalmente celulosa (Benito et al., 2017). La primera vez que se aisló cepas de *Micromonosporas* en el interior de nódulos fijadores de nitrógeno fue en 2007, en plantas de *Lupinus angustifolius* (Trujillo et al., 2007). Desde entonces se ha continuado identificando y estudiado especies de este género en interacciones con otras plantas (Benito et al., 2017). Por otro lado, un estudio realizado por Janso y Carter (2010) estudiaron diferentes endófitos del grupo de los actinomicetos (actinobacterias) procedentes de diferentes plantas tropicales. Ellos encontraron que diferentes cepas del género *Sphaerisporangium* las cuales nunca se habían reportado estaban apareciendo con bastante prevalencia en su estudio. De hecho, la especie identificada en nuestro estudio (*Sphaerisporangium dianthi*) fue identificada como nueva especie y aislada de una planta medicinal china llamada *Dianthus chinensis* L. (Xing et al., 2015).

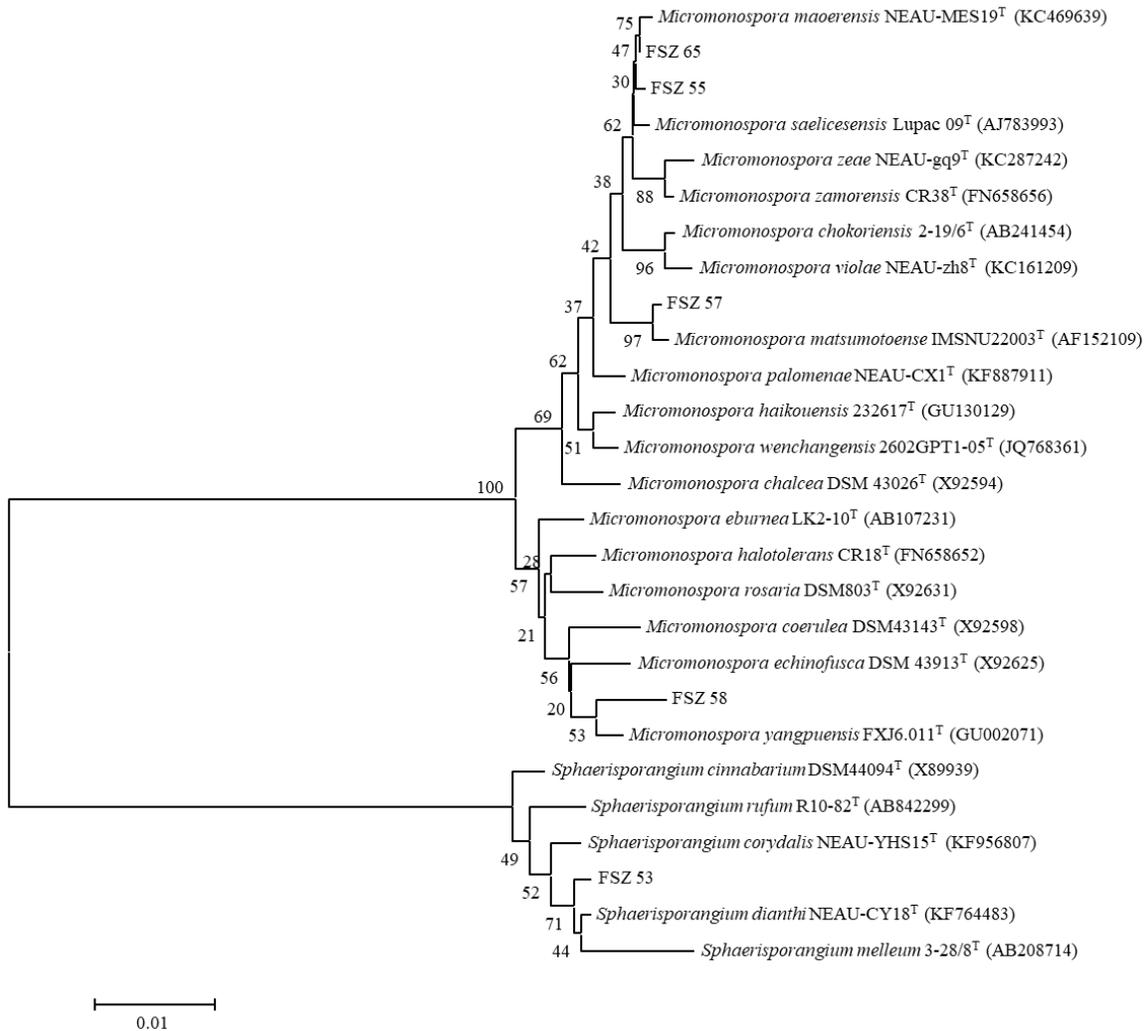


Figura 26. Estudio filogenético de las especies pertenecientes los géneros; *Micromonospora* y *Sphaerisporangium* basados en el gen ribosómico 16S. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,01 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

Por último, las bacterias identificadas como bacilos Gram negativos, fueron todas identificadas en base a la secuencia del gen 16s rRNA como cepas del género *Mesorhizobium* (Figura 27). Como se observa en dicha figura, a pesar de que todas estas cepas proceden del interior de nódulos de garbanzo, observamos que presentan una gran diversidad, estando muy diversificadas por todo el árbol filogenético del género *Mesorhizobium*. La secuencia del gen 16S de los 16 representantes de perfiles de RAPD obtenidos con los 35 aislados de este grupo de bacterias, nos permite clasificar estas cepas en 6 grupos principales, como se muestra en la figura 27.

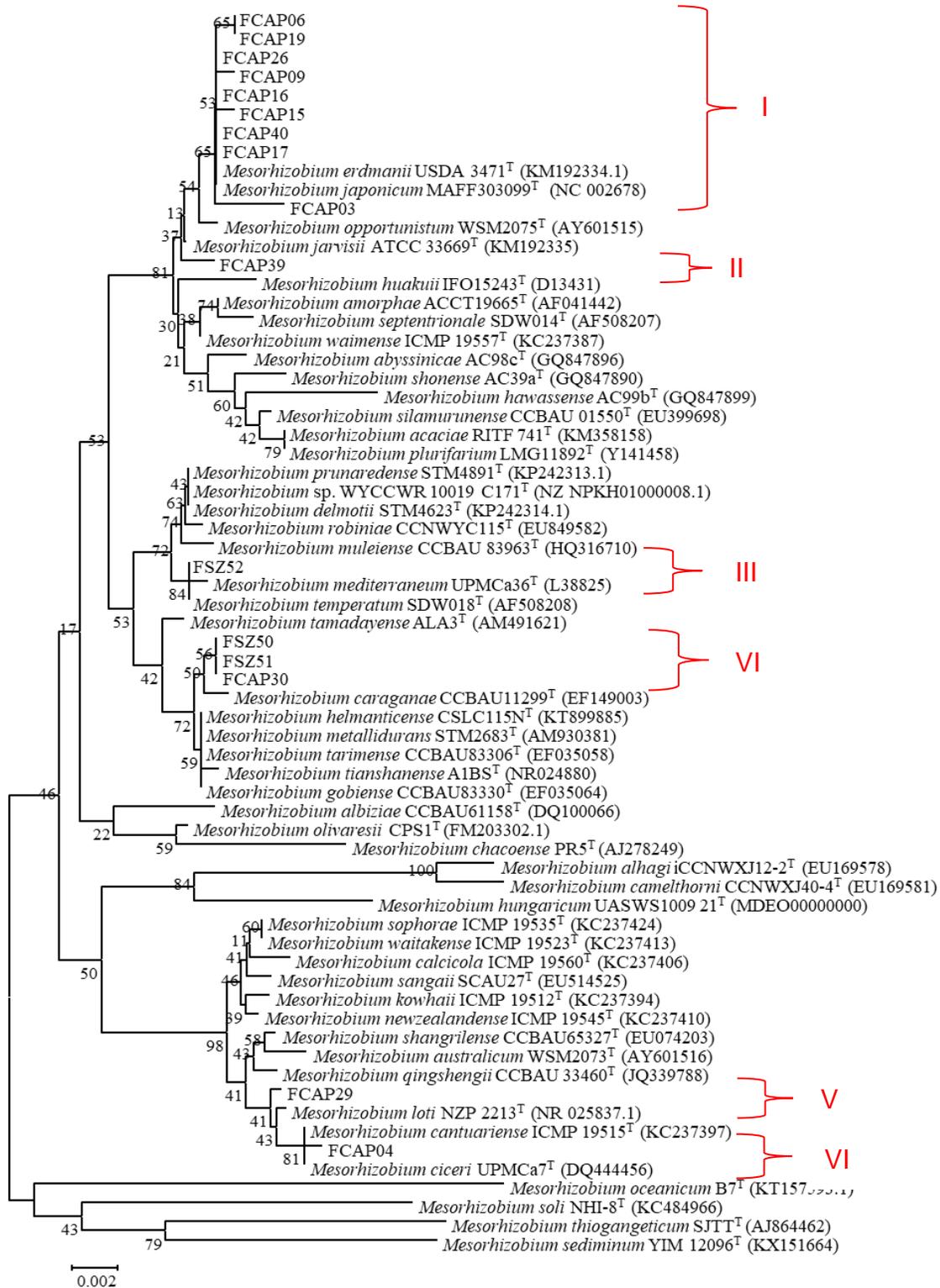


Figura 27. Estudio filogenético de las especies del género *Mesorhizobium* basados en el gen ribosómico 16S. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,002 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3. Secuenciación y análisis de las secuencias de genes *housekeeping* o constitutivos y genes simbióticos en las cepas del género *Mesorhizobium*

Dentro de las especies pertenecientes al género *Mesorhizobium*, es insuficiente la clasificación mediante el gen 16S rRNA, por consiguiente, resulta imprescindible el secuenciar otros genes, como los denominados genes *housekeeping*. Además, la descripción de cepas del género, así como ocurre para el resto de rizobia, incluye la secuenciación de genes relacionados con las relaciones simbióticas con su planta hospedadora, como es el caso del gen *nodC*. Por lo tanto, en los siguientes apartados se detalla el análisis de las secuencias de estos genes en las cepas de este estudio identificadas como *Mesorhizobium*.

Estos genes presenta características importantes para ser empleado en estudios ecológicos ya que: posee presencia universal en todos los procariotas, posee regiones de lenta evolución, debido a que su función es poco susceptible a transferencia lateral de genes y posee un tamaño lo suficientemente grande a fin de conservar información filogenética importante. Estos genes puede mostrar desventajas entre ellas está la que recae en las propiedades de los genes que codifican para proteína ya que el código genético es degenerado, o sea, más de un aminoácido puede ser codificado por varios codones. Esto podría dificultar el diseño de primer para el posterior estudio de estos genes (Case et al., 2007).

3.3.1. Secuenciación del gen *recA*

Para poder identificar nuestras cepas de *Mesorhizobium* dentro de las especies ya descritas, en primer lugar, se evaluó el gen *recA*. Algunas de las especies capaces de nodular leguminosas resulta difícil determinar su taxonomía (Bontemps et al., 2010), y por consiguiente se encuentran en una revisión constante, por ejemplo, *Burkholderia*. Una forma en la que se ha mejorado la clasificación de las especies pertenecientes al género antes mencionado fue el análisis del gen *recA*. (Payne et al., 2005). La proteína RecA se encuentra en todas las bacterias de vida libre, siendo un gen de evolución lenta manteniendo entre un 60 a 70% de conservación en todo el Dominio Bacteria (Bell & Kowalczykowski, 2016). Esta proteína está implicada en el metabolismo del ADN, éstas recombinasas se encargan de doblela reparación y mantenimiento de la doble cadena de ADN (Prentiss et al., 2015).

Este gen resulta imprescindible a la hora de clasificar las especies dentro de género *Mesorhizobium*. Al momento de describir *Mesorhizobium huakuii* uno de varios genes analizados fue el *recA* donde las 10 cepas aisladas se separaron en 4 grupos diferentes, siendo estos 4 grupos distintos a las cepas tipos descritas de *Mesorhizobium* hasta entonces (Tan et al., 2012).

Así pues, el análisis filogenético de las secuencias del gen *recA* de las cepas aisladas de este estudio identificadas como *Mesorhizobium* sp. Junto con las de las cepas tipo de las especies descritas en el género *Mesorhizobium*, muestra como nuestros aislados se clasificaron en 5 grupos diferentes (Figura 28). Estos grupos coinciden con lo ya observado

en el estudio filogenético del gen 16S rRNA (Figura 27), exceptuando que la cepa FCAP 39, que constituía el grupo II en el análisis filogenético de las secuencias del gen ribosómico 16S y en esta ocasión está junto con el grupo I. Cabe destacar que todos los grupos, exceptuando la cepa FCAP 04, mostraron un distanciamiento mayor a las cepas tipo de sus especies más próximas que el existente entre algunas de las secuencias de las cepas tipo de diferentes especies ya descritas de *Mesorhizobium*, . Por consiguiente, existe la posibilidad que al menos 5 de estos grupos sean nuevas especies, sin embargo, es necesario ver el comportamiento de otros genes *housekeeping*.

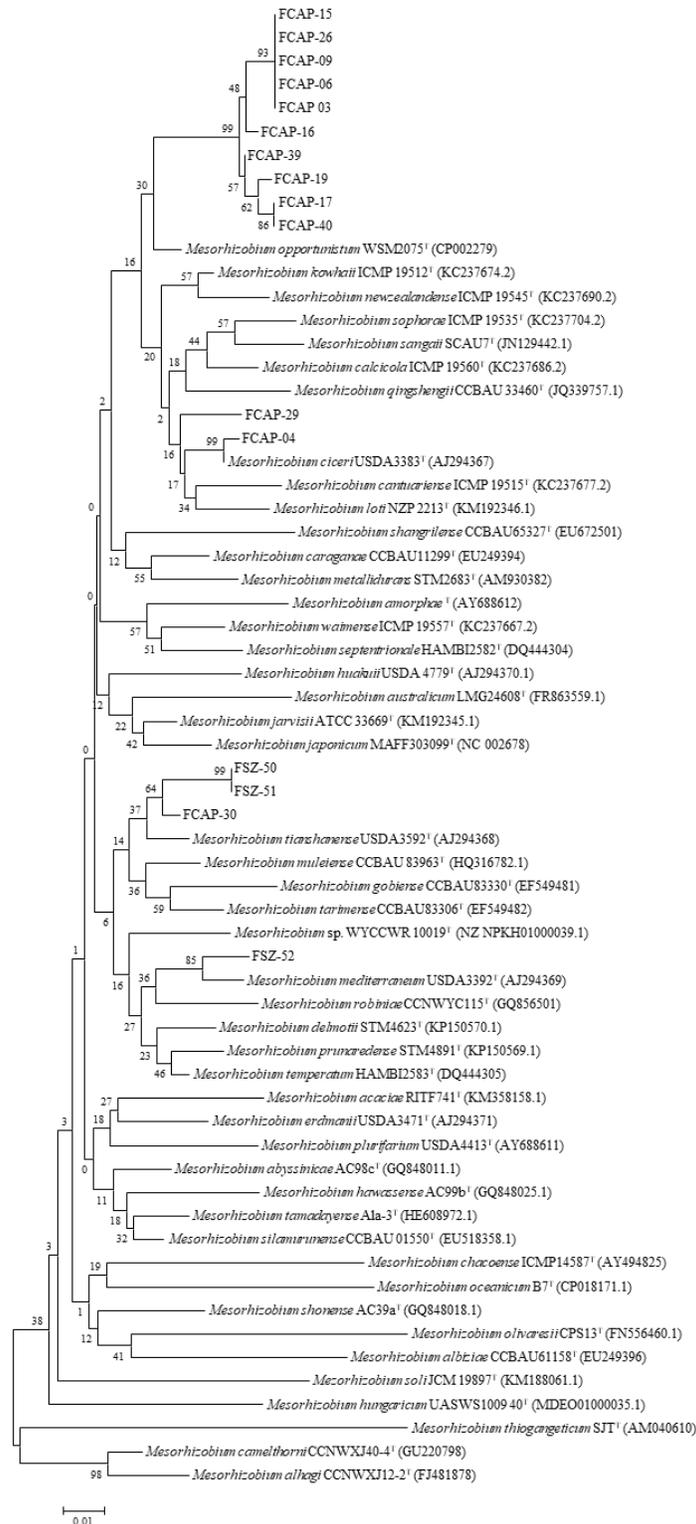


Figura 28. Estudio filogenético de las cepas de este estudio clasificadas dentro del género *Mesorhizobium* basado en el gen *recA*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,01 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3.2. Secuenciación del gen *glnII*

El gen *glnII* codifica para una glutamina sintetasa II, enzima implicada en el metabolismo de nitrógeno al que permite la síntesis de glutamina. Un estudio realizado en *Bradyrhizobium* han cuantificado que este gen tuvo un nivel de conservación de 71,8% entre las especies (Menna et al., 2009). El análisis de este gen se ha realizado en diferentes rizobios más comunes, e inclusive en *Frankia* una bacteria fijadora de nitrógeno en simbiosis que es un Actinobacteria. Un trabajo realizado por Cournoyer & Lavire (1999) utilizó este gen en *Frankia* logrando resolver derivaciones filogenéticas bien resultas obteniendo deducciones y tendencias evolutivas entre especies de este género, pues lo estudios hasta la fecha utilizando *nif* y *rrn* mantenían que su árbol evolutivo aún no fuera lo suficientemente claro. De igual modo en el género *Mesorhizobium* la descripción de nuevas cepas ya utilizan y le dan importancia a la secuenciación de este gen (De Meyer et al., 2015; Zhu et al., 2015).

Al analizar el árbol filogenético de las secuencias del gen *glnII* de las cepas de este estudio y las cepas tipo de las especies del género *Mesorhizobium* (Figura 29) podemos observar que aún se conservan los grupos que se han mostrados al analizar el gene 16S rRNA. A diferencia de lo analizado con el gen *recA*, la cepa FCAP 39 se vuelve a distanciar del grupo I. Por tanto, se logra observar los 6 grupos diferentes entre los aislados de este estudio. Además, con el gen *glnII* se logra observar más en detalle a lo observado con el gen *recA*. En este sentido, la cepa FCAP 04 es igual que la especie *Mesorhizobium ciceri* USDA3383^T. Los otros 5 grupos nuevamente muestran una distancia filogenética significativa respecto a la existente entre diferentes especies ya descritas en el género y, por consiguiente, podría apoyar la teoría de que podría tratarse de nuevas especies.

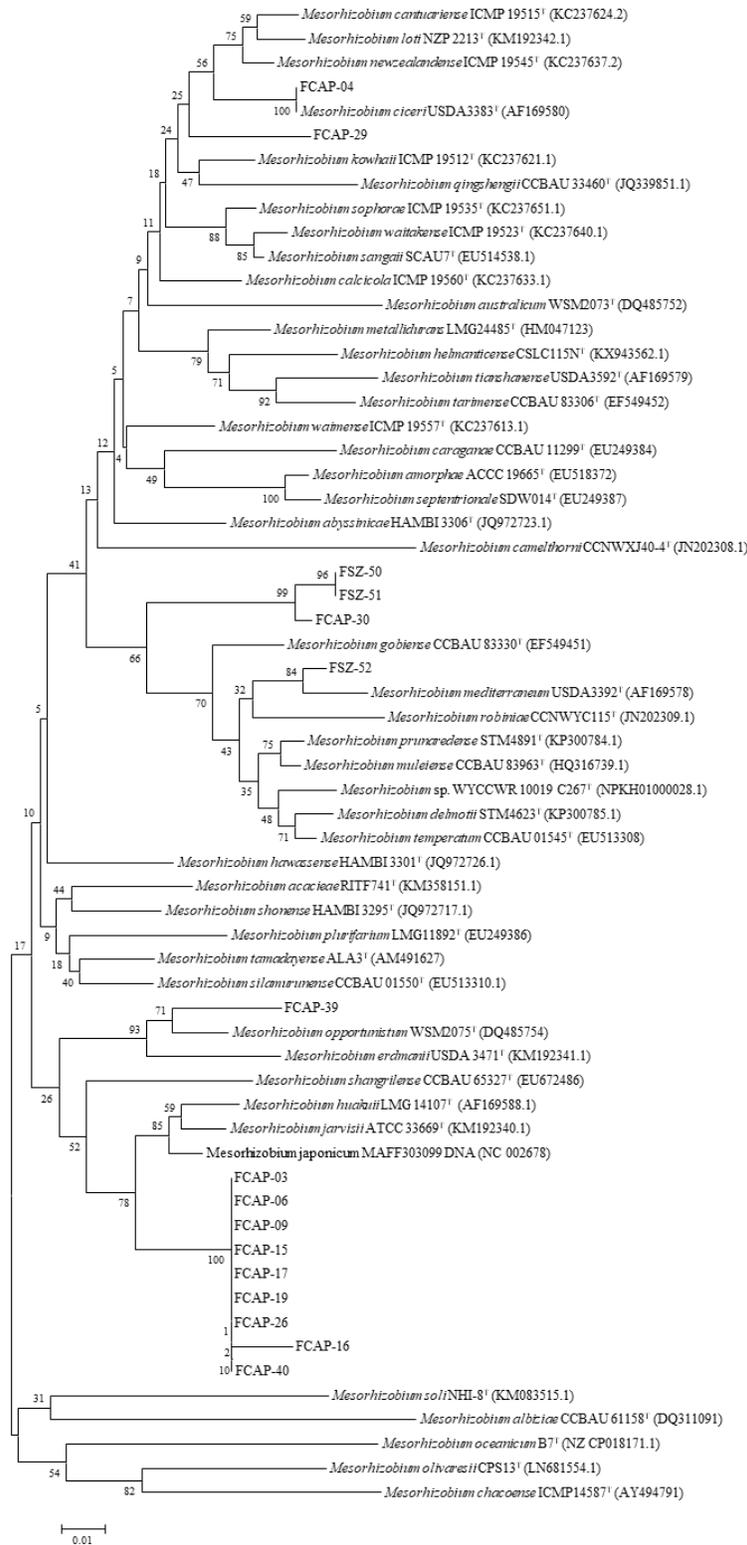


Figura 29. Estudio filogenético de las cepas de este estudio clasificadas dentro del género *Mesorhizobium* basado en el gen *glnII*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,01 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3.3. Secuenciación del gen *rpoB*

Otro gen importante que ayuda a comprender mejor las relaciones taxonómicas en diversos géneros bacterianos, como es el género *Mesorhizobium*, es el gen *rpoB*. Éste puede ser utilizado en estudios centrados en la diversidad subespecífica, por consiguiente, complementa la información que proporciona el gen 16S rRNA (Case et al., 2007). Así pues, permite una medición precisa de la diversidad y relaciones filogenéticas (Case et al., 2007). Este gen codifica para la sub-unidad β de la RNA polimerasa y su secuencia podría ser una herramienta importante para describir nuevas especies (Adékambi et al., 2009). De hecho, existen trabajos que proponen la secuenciación parcial de dicho gen como una nueva herramienta para identificar bacterias, inclusive aislados de muestras clínicas (Adékambi et al., 2009; Drancourt & Raoult, 2002).

De igual manera que con los otros genes mencionados en los anteriores apartados, el gen *rpoB*, también es de importancia para definir nuevas especies dentro del género *Mesorhizobium*. Como puede observarse en la Figura 30, en la que se muestra el árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen *rpoB* de los aislados de este grupo y de las cepas tipo de las especies descritas del género *Mesorhizobium*, la tendencia de los grupos que se viene observando en los genes ya mostrados se mantiene. Cabe destacar que la cepa FCAP 39 se agrupó de forma similar al gene *recA*, sin embargo, hasta lo observado esta cepa aparece como un grupo independiente en los genes 16S rRNA y *glnII*.

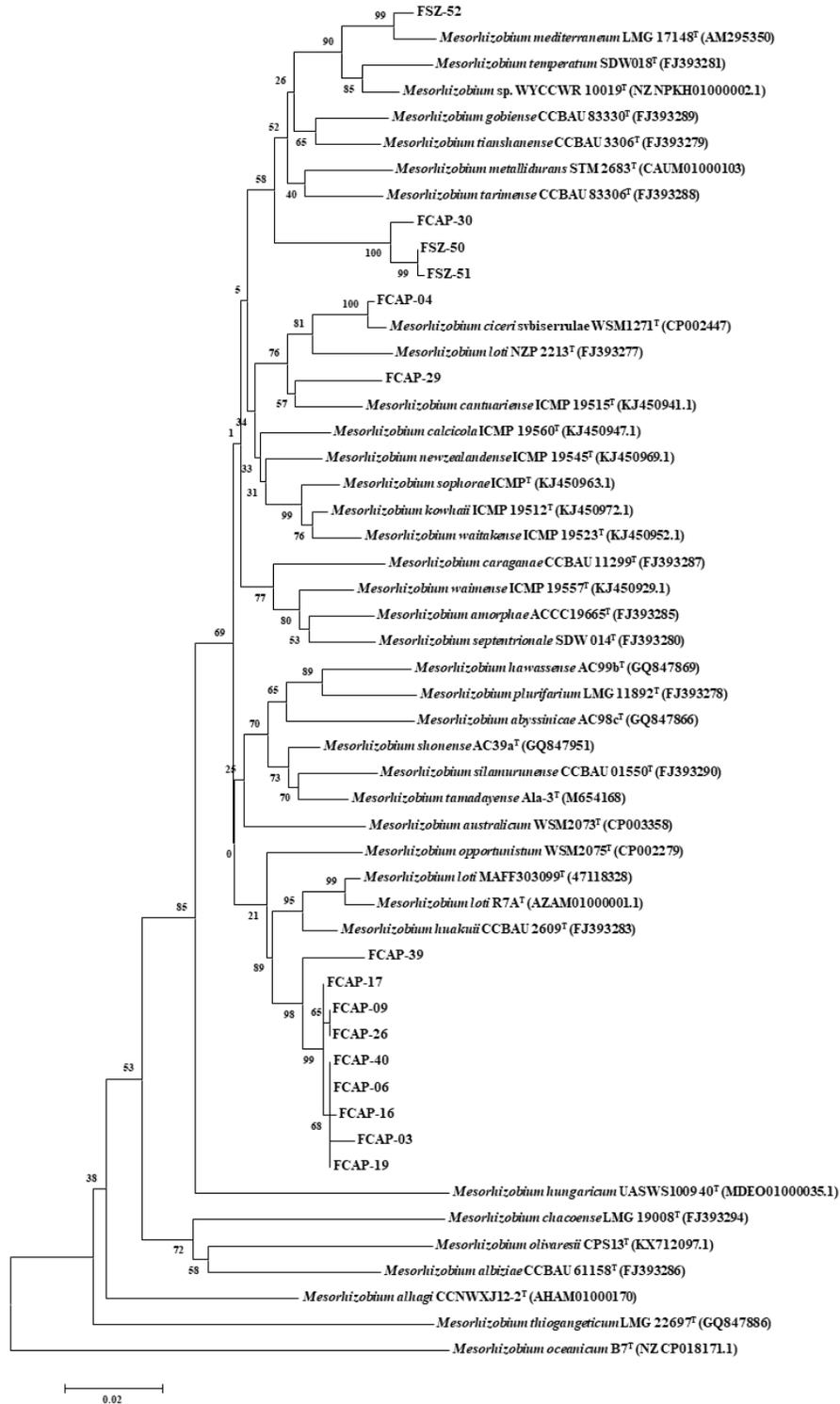


Figura 30. Estudio filogenético de las cepas de este estudio clasificadas dentro del género *Mesorhizobium* basado en el gen ribosómico *rpoB*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,02 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3.4. Secuenciación del gen *atpD*

Otros de los genes que se tienden a utilizar para clasificar taxonómicamente especies de algunos géneros como *Mesorhizobium* es el gen *atpD*. Un estudio con cepas de rizobia determinó que de los principales genes *housekeeping* el *atpD* fue el menos conservado (Menna et al., 2009). Este gen codifica para la subunidad beta de la ATP sintasa de membrana, enzima importante para la producción de energía (Gaunt et al., 2001). Cabe mencionar que dentro de la secuencia de este gen existen pequeñas inserciones y eliminaciones, proporcionando evidencia filogenética adicional. Por ejemplo, *Azorhizobium caulinodans* y *Brevundimonas bullata* tienen una inserción de 15 pb en la posición 301, también en dicha posición *Bradyrhizobium japonicum* tiene una inserción de 12 pb (Gaunt et al., 2001).

Dentro de la familia Rhizobiaceae se ha utilizado este gen, junto con otros genes para poder dilucidar sus posiciones taxonómicas. Por ejemplo, existen especies de *Rhizobium* que no muestran posiciones filogenéticas claras. Esto es debido a que es un grupo extremadamente heterogéneo. Dichos análisis han propiciado a que se delinee géneros nuevos y especies (Mousavi et al., 2015). De hecho, el análisis y la concatenación de las secuencias de los genes *recA*, *atpD* y *glnII*, realizado con diversas cepas de *Mesorhizobium*, determinó que la cepa USDA 3471, anteriormente identificada como *M. loti*, fuera reclasificada como una especie nueva llamada *Mesorhizobium erdmanii*, y la cepa ATCC 33669, también identificada previamente como *M. loti*, fuera reclasificada como la nueva especie *Mesorhizobium jarvisii*, (Martínez-Hidalgo et al., 2015).

En el árbol filogenético obtenido con las secuencias del gen *atpD* de las cepas de este estudio y las cepas tipo de las especies descritas del género *Mesorhizobium* (Figura 31) se observa la aparición de nuestros aislados en 5 grupo diferentes. En esta ocasión la cepa FCAP 39 aparece dentro de otro grupo, similar a lo observado en el análisis de las secuencias de los genes *recA* y *rpoB*. Nuevamente se tiende a observar que a excepción de la cepa FCAP 04, los demás grupos muestran un distanciamiento filogenético a sus especies más próximas mayor que el existente entre otras especies próximas descritas como diferentes especies, posiblemente confirmando, como se ha comentado en los árboles anteriores, que podrían constituir especies nuevas dentro del género.

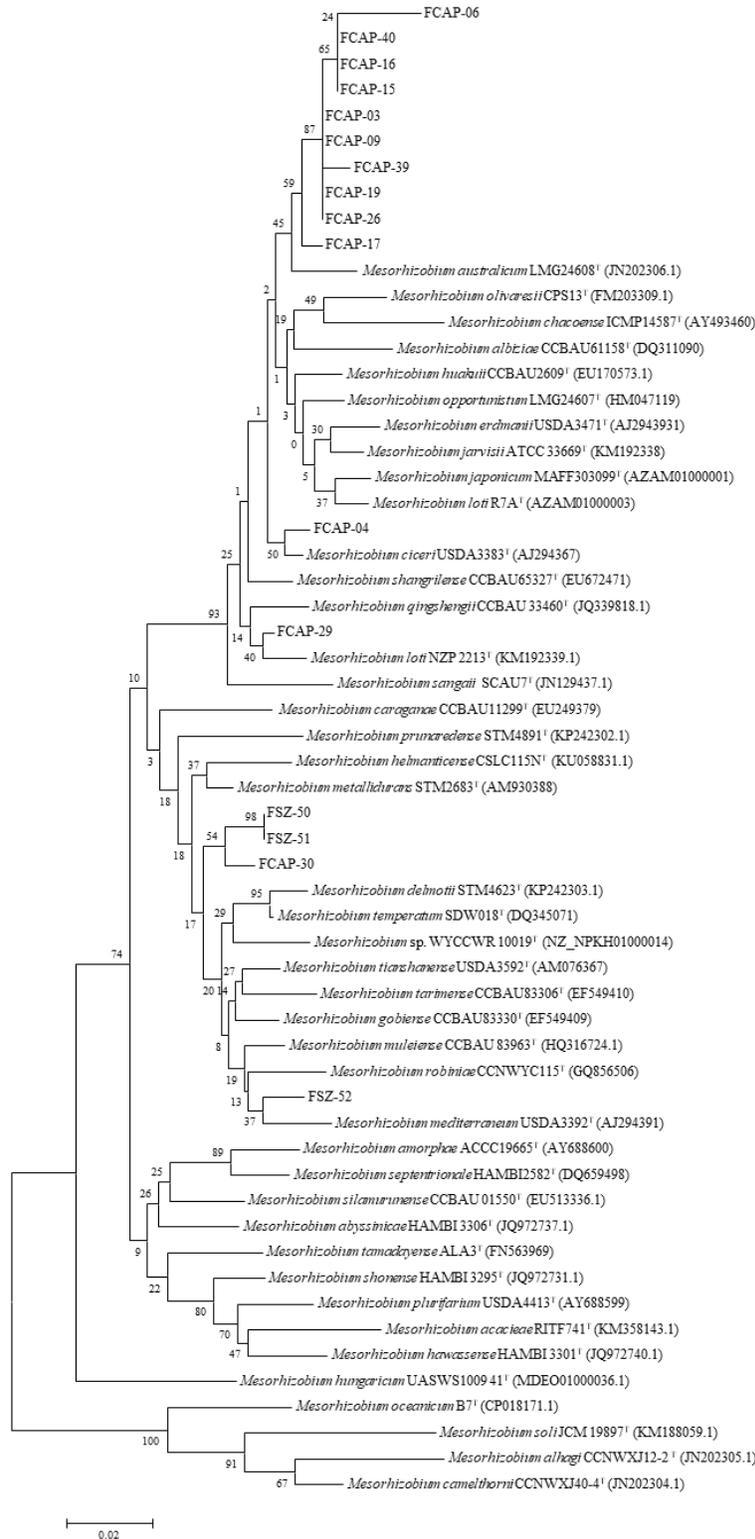


Figura 31. Estudio filogenético de las cepas de este estudio clasificadas dentro del género *Mesorhizobium* basado en el gen *atpD*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,02 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3.5. Concatenación *recA-glnII*

Como se ha realizado en otras investigaciones, en este estudio se realizó un análisis filogenético de las secuencias concatenadas de los genes *recA* y *glnII*, por su alto nivel de conservación, en *Mesorhizobium*. Entre las últimas nuevas especies descritas dentro de este género se ha utilizado esta concatenación (Martínez-Hidalgo et al., 2015; Marcos-García et al., 2017; Lorite et al., 2016). La Figura 32 muestra el árbol filogenético resultante del análisis de la concatenación de dichos genes, tanto de las cepas de este estudio como de las cepas tipo de las especies descritas en el género.

Referente a la cepa FCAP 04, ésta se encontró muy cercana filogenéticamente a la especie *Mesorhizobium ciceri*, siendo la distancia entre éstas lo suficientemente cercana en comparación con la distancia menor entre especies ya descritas. Por lo tanto, se puede determinar que la cepa FCAP 04 pertenece a la especie *Mesorhizobium ciceri*. Esta especie fue la primera descrita como nodulante de garbanzo por Nour y colaboradores (1994).

En esta ocasión la cepa FCAP 39 se separó en un clado independiente de su especie más cercana, *Mesorhizobium opportunistum*. Sin embargo, debería hacerse un estudio genómico para poder comprender mejor la posición taxonómica de esta cepa, ya que con el análisis de algunos genes de este estudio se correlacionaba con otras de nuestro aislamiento, mientras que con los análisis en base a otros genes la acercaban a otras especies ya descritas en el género.

En el caso de la cepa FSZ 52, su especie más próxima al analizar todos los genes de forma individual y los genes *recA* y *glnII* concatenados es *Mesorhizobium mediterraneum*. Sin embargo, hay que destacar que analizando los árboles filogenéticos hay especies ya descritas como *M. delmotii* y *M. temperatum* o *M. waitakense* con *M. sangaii* que poseen un distanciamiento igual o menor que *M. mediterraneum* con FSZ 52.

Otra cepa independiente en el clado fue FCAP 29, evaluando los genes de forma independiente y los concatenados de la figura 32 observamos que esta cepa se correlaciona con *M. ciceri*, *M. newzealandense*, *M. cantuariense* y *M. loti*. Las especies antes mencionadas son las más cercanas, sin embargo, están suficientemente distanciadas de la cepa FCAP 29 como para ser consideradas como una posible nueva especie.

Por otra parte, existe un grupo de mayor tamaño donde se agruparon la mayoría de las cepas aisladas de garbanzo. El mismo se mantuvo constante en los diversos análisis genéticos, exceptuando que a veces se incorporaba la cepa FCAP 39 y en otras ocasiones no. Dicho grupo estaba compuesto por las cepas FCAP 17, FCAP 40, FCAP 19, FCAP 16, FCAP 03, FCAP 06, FCAP 09, FCAP 15 y FCAP 26. Referente a este grupo y conforme a los cladogramas observados posiblemente este grupo de cepas se trate de más de una especie. La dificultad para describir estas especies recae en que a fin de describirla se necesitan hacer diversas pruebas con las cepas más filogenéticamente cercanas, el problema es que las posibles especies más cercanas también son nuestras. Por lo tanto, sería necesario realizar análisis genómicos para poder dilucidar mejor este grupo y determinar de cuántas especies nuevas se trata.

Por otro lado, tenemos otro grupo compuesto por las cepas FCAP 30, FSZ 50 y FSZ 51. Nuevamente, estas cepas se encuentran en un clado independiente, tanto en la concatenación de los genes *recA* y *glnII*, como en los demás genes analizados (Figuras 27-31).

Cabe destacar que todas las cepas de este estudio fueron aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L. procedentes de suelo de la localidad de Fuentesauco en Zamora, España. Sin embargo, las cepas denominadas como FCAP fueron aisladas en el año 2000 y las FSZ en el año 2014. Los estudios filogenéticos de los genes analizados en este estudio muestran que algunas de estas cepas aisladas en periodos de tiempo muy diferentes se encuentran filogenéticamente muy relacionadas, razón por la cual se trabajará con éstas en otro Capítulo.

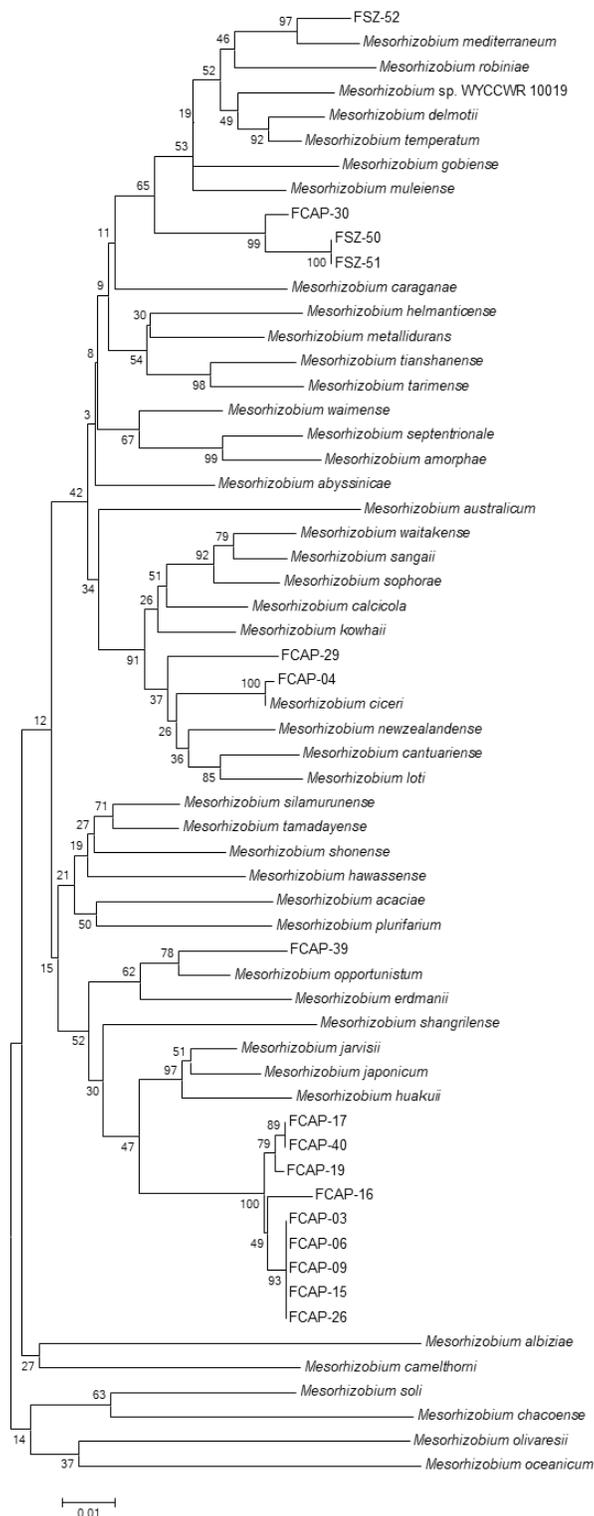


Figura 32. Estudio filogenético de las cepas de este estudio clasificadas dentro del género *Mesorhizobium* basado en la concatenación de las secuencias de los genes *recA* y *glnII*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,01 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

3.3.6. Secuenciación del gen *nodC*

Los genes *nod* definen la función central para el reconocimiento del huésped la invasión de las plantas por parte de las bacterias del grupo de los rizobia. Los genes denominados *nodA* cuya función es producir una Aciltransferasa, *nodB* una Chitooligosaccharido deacetylasa, *nodC* una N-acetilglucosaminiltransferasa (quitina sintasa), *nodD* es un regulador común de los genes *nod*, *nodIJ* para el transporte de los factores Nod, *nodPO*, *nodX* y *nodEF* para la síntesis de los sustituyentes de los factores Nod (Long, 1996; Laranjo et al., 2014). La producción de los factores Nod, el cual es un lipo-quito-oligosacáridos, produce que se desencadene una respuesta en las leguminosas donde se incluye la división celular, importante para la formación de los nódulos y subsecuentemente es ahí donde se fijará el nitrógeno (Shiro et al., 2016). En *Mesorhizobium* usualmente existe una copia del gen *nodC* y los genes *nodC* de cepas diferentes que nodulan una misma leguminosa están estrechamente relacionados entre sí (Rivas et al., 2007).

Conforme a un estudio realizado por Rivas y colaboradores (2007) encontró que cepas de *Mesorhizobium amorphae* y *Mesorhizobium tianshanense*, portan genes de simbiosis específicos de endosimbiontes comunes de *Cicer arietinum* L. lo que constituye el biovar *ciceri*. Estas cepas son filogenéticamente divergentes de aislados de garbanzo. Los genes de éstas, tanto del *nodC* como *nifH* tenían un 99% de similitud con los nodulantes comunes de garbanzo, *Mesorhizobium ciceri* y *Mesorhizobium mediterraneum*. Sus resultados mostraron que estos genes simbióticos han sido adquiridos por estas cepas mediante la coevolución con garbanzo. Por consiguiente, se propuso una nueva división infrasubespecífica llamada biovar *ciceri* a fin de incluir cepas capaces de nodular *Cicer arietinum* L.

En otras palabras, el *nodC* que produce una quitina sintasa es responsable del primer paso en el ensamblaje del factor Nod, siendo esencial para la nodulación en todos los rizobios. Estos patrones de secuencia del *nodC* (también *nifH*) muestran la estrecha relación entre los rizobios y su huésped. Por tanto, se puede utilizar el gen *nodC* (y *nifH*) como una detección rápida de *Mesorhizobium* nodulantes de garbanzos (Laranjo et al., 2008; Laranjo et al., 2014).

A diferencia de lo analizado con los genes anteriores, en este caso como era de esperar y conforme a lo encontrado en la literatura, todas nuestras cepas se mantuvieron cerca en un mismo grupo muy cercano. En este clado se encuentran *M. huakuii*, *M. muleiense*, *M. mediterraneum* y *M. ciceri* junto con nuestras cepas, como se muestra en la figura 33. Conforme a lo mostrado en la figura 34, obtenida de Laranjo y colaboradores (2014), observamos que en este análisis de las especies *M. muleiense*, *M. mediterraneum* y *M. ciceri* debido a su secuencia del *nodC* todos son capaces de nodular las plantas de garbanzo. A pesar del análisis de los genes 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *atpD* y la concatenación de *recA-glnII* nuestras cepas aparecían en diferentes áreas del árbol, dispersas por el mismo, sin embargo, con el *nodC* al todos estar en un mismo clado confirma lo que se ha estado observando en otros estudios. En este sentido, se indica la posible transferencia horizontal de los genes *nodC*, lo que podría explicar que especies de *Mesorhizobium* filogenéticamente hablando tengan este gen tan similar.

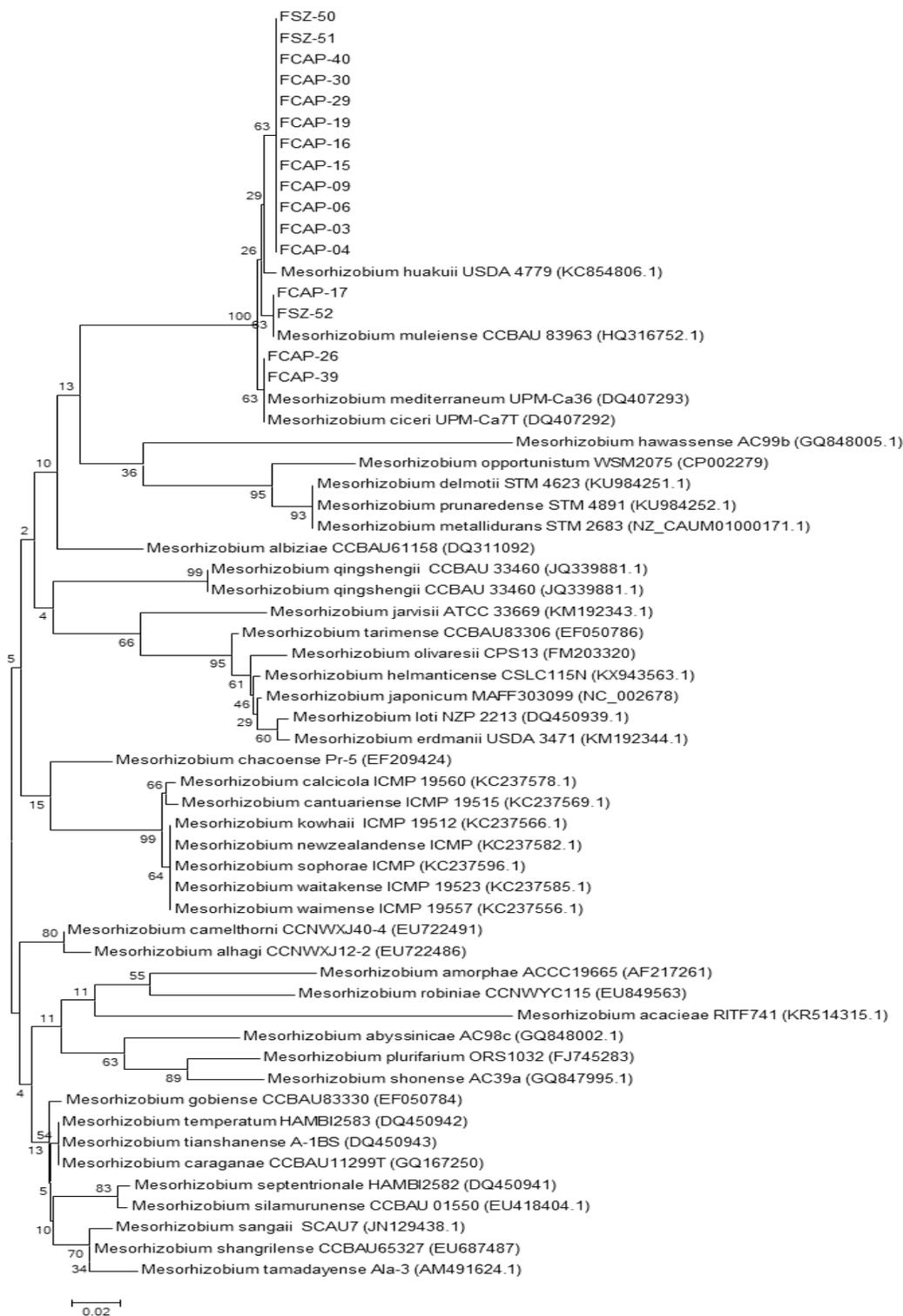


Figura 33. Estudio filogenético de las especies del género *Mesorhizobium* basados en el gen ribosómico *rpoB*. Análisis obtenido con el método Neighbour-Joining y el parámetro de Kimura 2-p, mediante 1000 réplicas. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos, la barra indica 0,02 sustituciones por posiciones de nucleótidos.

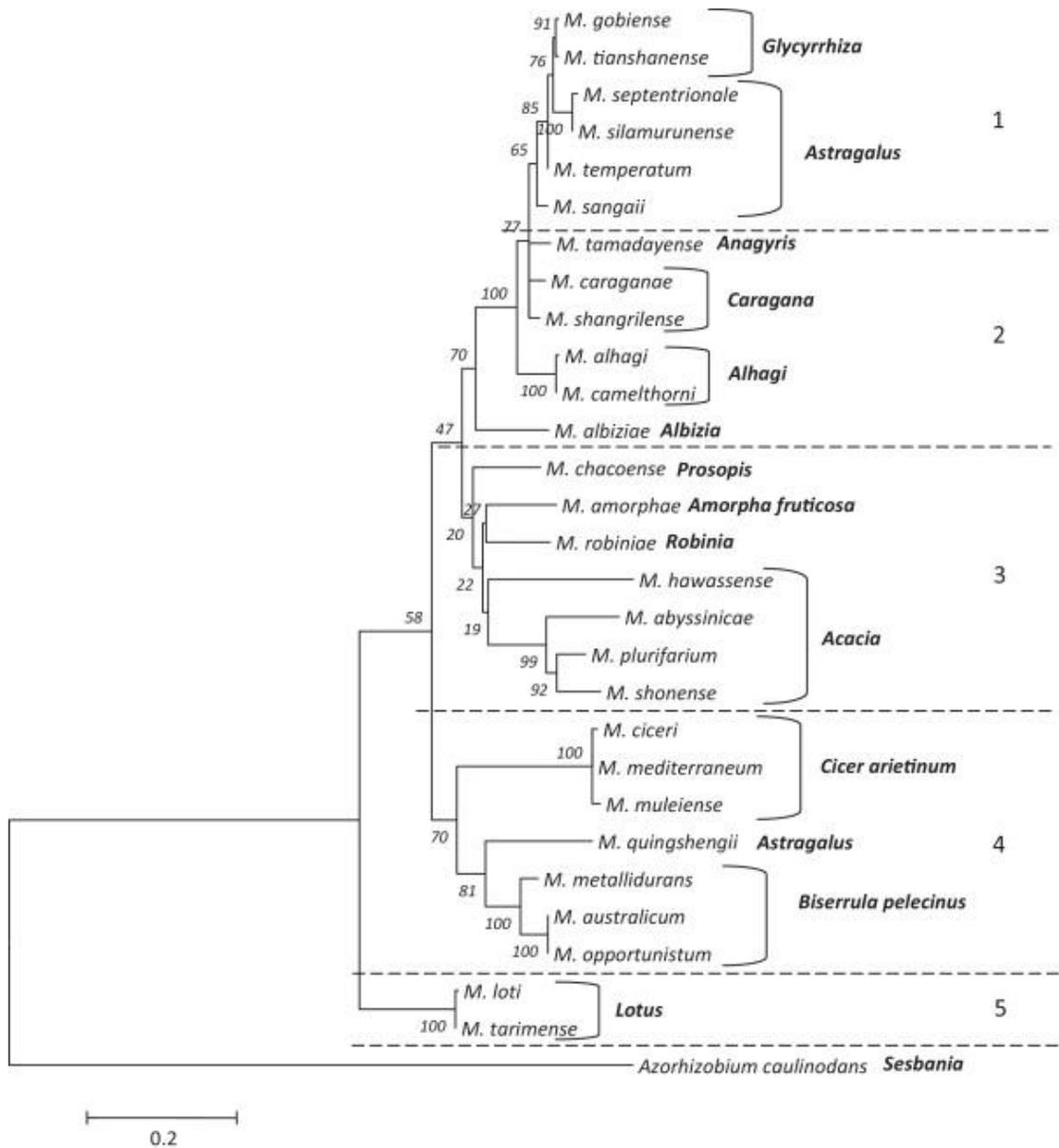


Figura 34. Árbol filogenético del gen *nodC* de diferentes especies del género *Mesorhizobium* junto a su planta hospedadora, basado en el método Maximum Likelihood phylogeny. Imagen obtenida de Laranjo et al., 2014.

4. Caracterización de las posibles nuevas especies

Conforme a los resultados obtenidos, las 95 cepas analizadas en este trabajo de investigación, pertenecían a 7 géneros diferentes, donde los mayores porcentajes de cepas recaen en los géneros *Bacillus* y *Mesorhizobium* como se muestra en la figura 35. Como hemos mencionado anteriormente, algunas de éstas de acuerdo con los análisis filogenéticos,

podrían constituir nuevas especies, las cuales se explicarán los resultados quimiotaxonómicos a continuación.

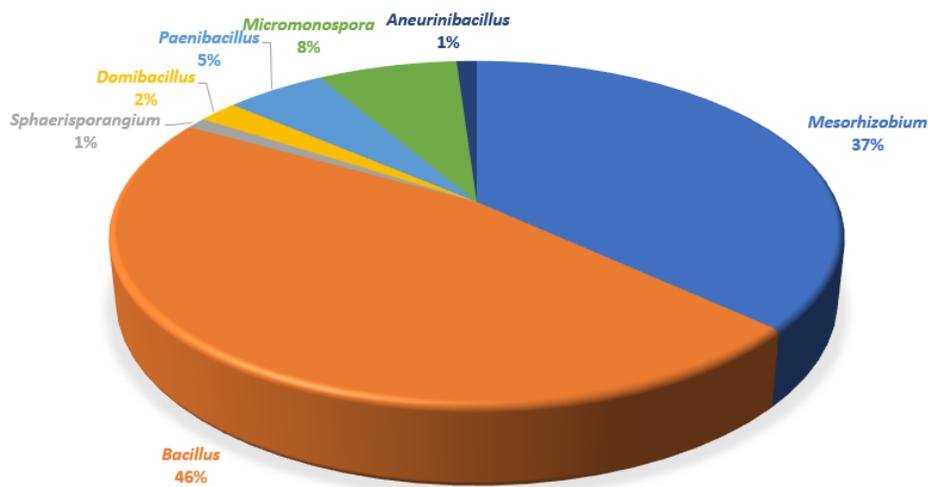


Figura 35. Proporción de todos los géneros de las cepas aisladas de los nódulos de garbanzo utilizadas en este trabajo.

4.1. Descripción de *Domibacillus* FSZ 02 como nueva especie del género *Domibacillus*

La cepa FSZ 02 es un bacilo Gram positivo que se propone como *Domibacillus* sp. nov, al mostrar un porcentaje de similitud de 98,8% con la especie más próxima, *D. robiginosus* WS 4628. En medio TSA, forma colonias de color rosado, forma circular, convexa y margen entero. Crece entre 25°C y 37°C, aunque ya a 37°C no mostraba la característica pigmentación rosada. A temperaturas de 10°C o a 45°C no presenta crecimiento. Su crecimiento se observa a pH ente 7 y 10; donde no crece por debajo de pH 6 ni por encima de los 11. Además, es capaz de crecer hasta un 5% de concentración NaCl. La cepa FSZ 02 es negativa para la producción de fosfatasa alcalina, esterasa (C4), esterasalipasa (C8), lipasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, fosfatasa ácida, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, N-acétil- β -glucosaminidasa, α -mannosidasa y α -fucosidasa. Sin embargo, es positiva para la producción de leucina arilamidasa, α -quimotripsina, naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa, β -glucuronidasa, β -glucosidasa. Además, fue capaz de fermentar glicerol, L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, L-rhamnosa, D-manitol, D-sorbitol, arbutina, esculina citrato férrico, salicina, D-celibiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-sacarosa, D-trealosa, D-rafinosa, almidón, glicógeno. Además, tiene capacidad de reducción de nitratos a nitritos, y asimila manosa, N-acetil-glucosamina, gluconato potásico, malato y citrato trisódico. Es catalasas y oxidasa positiva e hidroliza el almidón (a concentraciones de 1 g/l y 5 g/l). Los ácidos grasos predominantes fueron 15:0 anteiso (32,74%), 15:0 iso (19,17%) y 16:1 w11c (18,05%). Las principales quinonas respiratorias fueron MK6 (85%), MK7 (10%) y MK5 (5%). El ácido meso-diaminopimélico reportado principalmente fue el

A1 γ , además se encontró 3 variantes del tipo A4 γ (A31.1, A31.2 y A31.3). Los lípidos polares presentes fueron: Fosfolípido, Fosfatidilglicerol, Fosfatidiletanolamina y Difosfatidilglicerol. Así pues, esta especie será descrita y publicada como nueva especie.

4.2. Descripción de *Mesorhizobium* FSZ 52 como una nueva especie del género *Mesorhizobium*

La cepa FSZ 52 es un bacilo Gram negativo, cuyas colonias son color blanco, redondas, con elevación convexa y margen entero. El análisis filogenético de los genes 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *atpD*, *rpoB* y la concatenación *recA-glnII* mostró que la especie descrita más próxima filogenéticamente a la cepa FSZ 52 es *Mesorhizobium mediterraneum*. Sin embargo, las similitudes entre las secuencias de dichos genes de la cepa FSZ 52 y *Mesorhizobium mediterraneum* USDA3392^T son de 98,3%, 97,6%, 98,8%, para *recA*, *glnII* y *rpoB* respectivamente.

Mesorhizobium FSZ 52 crece a temperatura de 15°C a 28°C, con una temperatura óptima de 25°C - 28°C. Tolerancia de NaCl hasta 1,5%. El rango de crecimiento referente al pH es de 5 a 8,5 con un mejor crecimiento en pH entre 6 a 8. Es oxidasa positiva. hidrólisis (B-glucosidasa) escualina, β -galactosidasa (para NitroFenil- β D-Galactopiranosidasa). Es capaz de asimilar: glucosa, arabinosa, manosa, manitol, maltosa, ácido adípico, malato, trisódico, L-rhamnosa, D-sacarosa, D-maltosa, acetato sódico, acetato láctico, glicógeno, D-melibiosa, L-frucosa, D-sorbitol, L-arabinosa, citrato trisódico, L-histidina, 2-cetogluconato potásico, ácido 4-hidroxibenzóico y L-prolina. Es negativo en la reducción de nitratos a nitritos, fermentación de glucosa, arginina dihidrolasa, hidrólisis de proteasa (gelatina) y ureasa. No asimila gluconato potásico, ácido cáprico, N-Acetil-Glucosamina, ácido fenilacético, D-ribosa, inositol, ácido itacónico, ácido subérico, manolato sódico, L-alanina, 5-cetogluconato potásico, ácido 3-hidroxibenzóico, L-serina, salicina, ácido propiónico, ácido valérico y ácido 3-hidroxibutírico. Sus principales ácidos grasos son 18:1 w7c (41,23%), 18:1 w6c (41,23%), 19:0 cyclo w8c (23,03%) y 16:0 (10,06) Así pues, esta especie será descrita y publicada como nueva especie.

**Análisis de los endófitos de *Cicer arietinum* L. como
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
(PGPR)**

CAPÍTULO II

1. Potencial de los mecanismos PGPR

A fin de identificar el potencial de las 95 cepas de este estudio como posibles simbiosiontes de *Cicer arietinum* L. (garbanzo), se procedió a realizar una serie de pruebas *in vitro* a fin de conocer si las mismas son capaces de fomentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. En este sentido, se procedió a evaluar la producción de celulosa y celulasas, sideróforos, ácido indol acético, ACC desaminasa y solubilización de fosfato.

El identificar cepas que muestren estas capacidades, permite que puedan ser utilizadas como potenciales biofertilizantes. En muchas ocasiones los nutrientes están presentes en el suelo, sin embargo, dichos elementos no están disponibles en formas asimilables para las plantas. No obstante, algunos microorganismos tienen rutas metabólicas para el procesamiento de algunos de estos compuestos y transformarlos en formas más asequibles para las plantas. Por tanto, se pueden mejorar los rendimientos agrícolas de una forma más ecoeficiente (Sayyed et al., 2012).

Así, el identificar si algunas de nuestras cepas poseen un buen potencial para fomentar el crecimiento y desarrollo de las plantas podría ser un buen principio para el desarrollo de biofertilizantes.

Ya se conoce de antemano que algunos de los géneros en los que se clasifican algunos aislados de en este trabajo se han descrito como organismos con potencial PGPR. Por ejemplo, *Bacillus* (también *Paenibacillus*) al ser un género muy diverso tiene diferentes capacidades PGPR: producción de fitohormonas, solubilización fosfatos, producción de sideróforos, producción de antibióticos, inhibición de la síntesis de etileno en las plantas e inducción de la resistencia sistémica patógena de las plantas (Kumar et al., 2011; Ilyas & Bano, 2012; Kokalis-Burelle et al., 2002).

Otros de los microorganismos más utilizados y estudiado por su potencial como PGPR son los rizobios, capaces de fijar el nitrógeno en simbiosis con plantas leguminosas, además de producir otros mecanismos de promoción del crecimiento de las plantas, como Solubilización de fosfato, producción de; fitohormonas, celulosas, celulasas, biofilms, entre otros (Laranjo et al., 2014) . En este sentido hemos identificado 35 cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium*. El identificar que éstas además de fijar nitrógeno posean otras capacidades para mejorar el crecimiento y desarrollo vegetal podrían generar buenos prototipos para desarrollar buenos biofertilizantes para garbanzo.

En la tabla 46, se muestran todos los resultados de todas las cepas para las pruebas PGPR ensayadas.

Tabla 46. Resultados de las pruebas PGPR realizado a las 95 cepas aisladas del interior de nódulos de *Cicer arietinum* L.

Cepa	Celulasa	Celulosa	Sideróforo	% de Producción	Fosfato	% de Solubilización	IAA
FCAP 03	+	+	-	-	+	50%	+
FCAP 04	+	++	+	43,65%	+	130%	+
FCAP 06	+	+	-	-	+	44,44%	+
FCAP 09	+	+	+	10,56%	+	25%	+
FCAP 11	+	+	-	-	+	110%	++
FCAP 15	+	++	-	-	+	62,50%	++
FCAP 16	+	++	-	-	+	27,27%	-
FCAP 17	+	++	-	-	+	25,85%	-
FCAP 18	+	+	-	-	+	23,64%	-
FCAP 19	+	+	-	-	+	30%	-
FCAP 20	+	++	-	-	+	16,67%	+
FCAP 21	+	++	+	26,25%	+	116,67%	-
FCAP 22	+	++	+	55%	+	83,22%	-
FCAP 23	+	+	-	-	+	30%	-
FCAP 24	-	++	-	-	+	28,64%	-
FCAP 25	+	+	-	-	+	15%	+++
FCAP 26	+	++	-	-	+	60,61%	+
FCAP 28	+	-	-	-	+	63,64%	+
FCAP 29	+	++	+	55,83%	+	87,76%	+
FCAP 30	+	+++	-	-	+	127,27%	-
FCAP 31	+	++	-	-	+	20%	-
FCAP 33	+	+	-	-	+	60,99%	-
FCAP 34	+	++	-	-	+	125%	-
FCAP 35	+	+	-	-	+	50%	+
FCAP 36	-	+	-	-	+	17,80%	-
FCAP 37	+	+	-	-	+	58,33%	-
FCAP 38	+	++	+	36,36%	+	105%	-

Cepa	Celulasa	Celulosa	Sideróforo	% de Producción	Fosfato	% de Solubilización	IAA
FCAP 39	+	+++	-	-	+	50%	-
FCAP 40	+	++	-	-	+	30%	+
FSZ 01	+	+++	-	-	+	40,56%	-
FSZ 02	-	++	-	-	-	-	++
FSZ 03	+	++	-	-	+	39,23%	+
FSZ 04	+	++	-	-	+	23,89%	+
FSZ 05	-	+++	-	-	+	28,14%	-
FSZ 06	-	++	-	-	-	-	+
FSZ 07	-	+++	-	-	+	19,64%	++
FSZ 08	+	+	-	-	+	29,17%	-
FSZ 09	+	++	-	-	+	6,67%	+
FSZ 10	-	+++	-	-	+	22,73%	+
FSZ 11	+	+++	-	-	+	7,69%	++
FSZ 12	+	+	-	-	+	21,12%	++
FSZ 13	-	++	-	-	+	17,65%	-
FSZ 14	+	+++	-	-	+	18,72%	-
FSZ 15	+	+	-	-	+	32,74%	-
FSZ 16	+	+	-	-	+	45,46%	-
FSZ 17	+	+	-	-	+	47,56%	-
FSZ 18	+	++	-	-	+	40%	+++
FSZ 19	+	+	-	-	+	16,58%	+
FSZ 20	+	++	-	-	+	20%	+
FSZ 21	+	++	-	-	+	20%	-
FSZ 22	-	++	-	-	+	23,08%	+++
FSZ 23	+	+	-	-	+	37,50%	-
FSZ 24	+	+	-	-	+	40%	+
FSZ 25	+	++	-	-	+	25,90%	-
FSZ 26	-	+++	-	-	-	-	-

Cepa	Celulasa	Celulosa	Sideróforo	% de Producción	Fosfato	% de Solubilización	IAA
FSZ 27	+	+	-	-	+	65,15%	+
FSZ 28	-	++++	+	59,70%	+	12,14%	-
FSZ 29	+	++	+	20,06%	+	15,39%	+
FSZ 30	+	+	-	-	+	17,65%	+
FSZ 31	-	++	-	-	+	15,38%	+++
FSZ 32	-	++	-	-	+	20%	+++
FSZ 33	+	+	-	-	+	9,52%	-
FSZ 34	+	+	-	-	+	23,81%	-
FSZ 35	+	++	-	-	+	20%	+++
FSZ 36	-	++	-	-	-	-	+
FSZ 37	-	++	-	-	+	40%	++
FSZ 38	+	+++	-	-	+	40%	-
FSZ 39	+	++	-	-	+	20,83%	-
FSZ 40	+	+++	-	-	+	33,33%	-
FSZ 41	+	+	-	-	+	25%	-
FSZ 42	+	++	-	-	+	38,89%	-
FSZ 43	-	+++	-	-	+	57,14	+++
FSZ 44	-	+++	-	-	-	-	+
FSZ 45	+	+	-	-	+	72,73%	+
FSZ 46	+	+	-	-	+	25%	-
FSZ 47	+	+	-	-	+	25%	+
FSZ 48	+	+	-	-	+	17,65%	-
FSZ 49	-	+++	-	-	-	-	+++
FSZ 50	-	+++	-	-	+	93,73%	+
FSZ 51	+	++	-	-	-	-	+
FSZ 52	-	++	-	-	+	210%	+
FSZ 53	-	+	-	-	-	-	-

Cepa	Celulasa	Celulosa	Sideróforo	% de Producción	Fosfato	% de Solubilización	IAA
FSZ 54	+	Sin determinar	-	-	-	-	+++
FSZ 55	+	Sin determinar	-	-	-	-	+
FSZ 56	+	+	-	-	-	-	-
FSZ 57	-	Sin determinar	-	-	-	-	++
FSZ 58	-	Sin determinar	-	-	-	-	-
FSZ 59	+	+	-	-	+	26,67%	-
FSZ 60	+	+	-	-	+	15,97%	-
FSZ 61	-	++	-	-	+	190%	+
FSZ 62	+	+++	-	-	+	20%	+
FSZ 63	-	++	-	-	+	47,32%	+
FSZ 64	-	++	-	-	+	125%	+
FSZ 65	+	Sin determinar	-	-	-	-	+
FSZ 66	-	++	-	-	+	82,64%	+

1.1. Producción de celulosa y celulasas

Uno de los ensayos importantes e imprescindibles para evaluar el potencial como organismo PGPR es su capacidad para producir celulosa. La celulosa es un tipo de polisacárido que puede tener muchas funciones, entre ellas la producción de biofilms (tema que se discutirá en la próxima subsección, 1.2 de este capítulo), confiriendo adhesión y elasticidad a la comunidad microbiana (Serra et al. 2013). Asimismo, se ha descrito cómo la celulosa está implicada en los mecanismos de adhesión de diversas bacterias PGPR a la superficie de las raíces de las plantas (REFERENCIA) y, si se produce una relación más estrecha y estable con el sistema radicular de la planta, habrá un mejor aprovechamiento de los beneficios que los microorganismos le puedan proveer a la bacteria.

Por lo tanto, se evaluó la capacidad de las cepas de este estudio para producir celulosa u otros polisacáridos con enlaces β -1,4, utilizando Rojo Congo en el medio YMA. En este caso, como se muestra en la Figura 36, algunas de las cepas aisladas de nódulos de garbanzo fueron productoras de celulosa u otros polisacáridos con enlaces β -1,4, las cuales por acción de la unión del colorante Rojo Congo a los enlaces β -1,4 origina una formación de colonias con un color más rojo que aquellas que no formen este tipo de polisacárido, en las que su colonia mantendrá su coloración característica. En este sentido las cepas con mayor capacidad para producir celulosa pertenecían al género *Mesorhizobium* y fueron: FCAP 30, FCAP 39, FSZ 50. y, de hecho, todas las cepas del género *Mesorhizobium* fueron productores de este polisacárido.

Referente al género *Bacillus*, las cepas con mayor capacidad para producir celulosa fueron FSZ 01, FSZ 05, FSZ 07, FSZ 10, FSZ 11, FSZ 14, FSZ 26, FSZ 43 y FSZ 44. Uno de los géneros que mostró una mayor cantidad de producción fueron los *Paenibacillus*. Cabe mencionar que otras de las cepas que produjeron bastante de este tipo de polisacárido fue la cepa FSZ 28, la cual fue la única cepa calificada bajo el género *Aneurinibacillus*. En el caso de las actinobacterias no se pudo determinar su con mayor capacidad para producir celulosa ya que el intenso color de sus colonias dificultaba el visualizar una coloración rojiza debida al Rojo Congo.

En los primeros procesos de unión de la bacteria al sistema radicular de la planta están implicadas proteínas bacterianas como adhesinas o proteínas flagelares; sin embargo, son los polisacáridos son los principales componentes en esa unión los que proporcionan una adhesión firme a los pelos radiculares, anclando las comunidades bacterianas (Robledo et al., 2012). Por consiguiente, la mayoría de nuestras cepas bacterianas muestran, aunque en diferente grado, su capacidad para producir celulosa y, por tanto, se podría inferir una mejor unión al sistema radicular, la cual se confirmará evaluando la capacidad de las cepas para producir de biofilms.

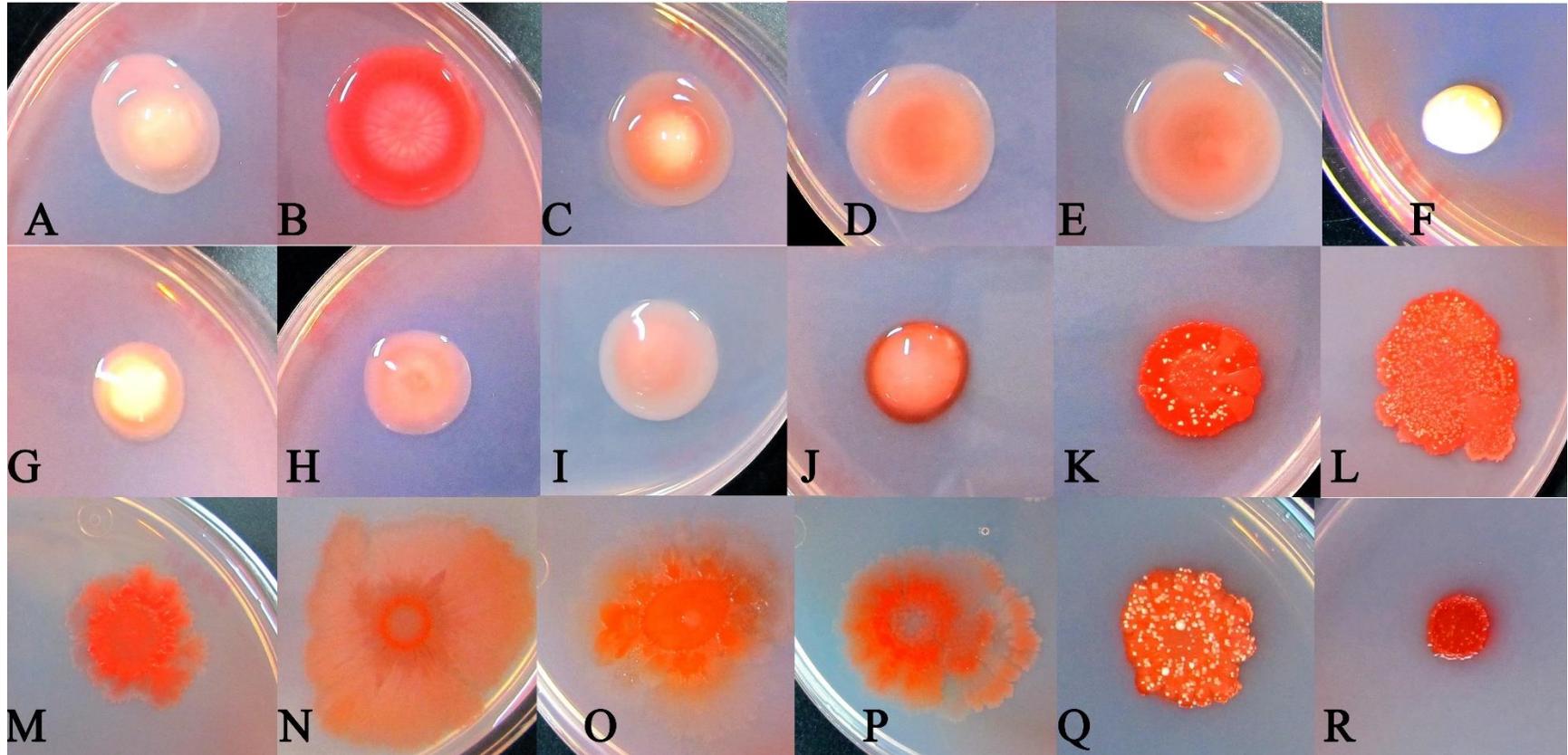


Figura 36. Prueba de producción de celulosa o polisacáricos con enlaces β -1,4, medio YMA con Rojo Congo. Entre paréntesis se muestra el género: M = *Mesorhizobium*, B = *Bacillus*, P = *Paenibacillus*, A = *Aneurinibacillus*. A. Control negativo (CSLC42N), B. Control positivo (CSLC23N), C. FCAP 16 (M), D. FCAP 09 (M), E. FCAP 08 (M), F. FCAP 21 (M), G. FCAP 29 (M), H. FCAP 34 (M), I. FCAP 37 (M), J. FCAP 40 (M), K. FSZ 07 (B), L. FSZ 13 (B), M. FSZ 10 (B), N. FSZ 16 (B), O. FSZ 20 (B), P. FSZ 28 (A), Q. FSZ 32 (B) y R. FSZ 40 (P).

Por otro lado, aparte de la producción de celulosa, también es importante la producción de celulasas, ya que está implicado en la entrada de las bacterias en el interior de la raíz. Para el análisis de la capacidad de los aislados de este estudio para producir celulasas, se utilizó medio YMA con una doble capa, teniendo la capa superior CMC (carboximetilcelulosa), donde si las cepas eran capaces de producir celulasas degradarían el CMC alrededor de la colonia. Al teñir la capa superior con Rojo Congo, la cual se une a los polisacáridos con enlaces β -1,4, si el CMC fue degradado (por la cepa) se observan zonas donde el Rojo Congo no puede teñir, mostrando cualitativamente la producción de celulosa.

Conforme a los resultados obtenidos, la mayoría de las cepas fueron capaces de producir celulasas (Figura 37). Entre las excepciones están las dos cepas identificadas como pertenecientes al género de *Domibacillus* (FSZ 02 y FSZ 06), también la única cepa de *Aneurinibacillus* (FSZ 28). Referente a las cepas del género *Mesorhizobium* las siguientes cepas no se observó producción de celulasas FCAP 24, FCAP 36, además de FSZ 50, FSZ 63, FSZ 64, FSZ 66 (éstas últimas cuatro cepas tenían un mismo perfil de RAPD), tampoco, FSZ 52 y FSZ 61 (ambas con mismo perfil de RAPD). Del mismo modo, no fueron capaces de producir celulasas las siguientes cepas de *Bacillus* FSZ 05, FSZ 07, FSZ 10, FSZ 13, FSZ 22, FSZ 26, FSZ 31, FSZ 32, FSZ 36, FSZ 37, FSZ 43 y FSZ 44, y la cepa FSZ 49 de *Paenibacillus*. Del grupo de las actinobacterias, las siguientes no fueron productoras de celulasas: FSZ 53 (*Sphaerisporangium*), ni FSZ 57 y FSZ 58 (ambas *Micromonospora*).

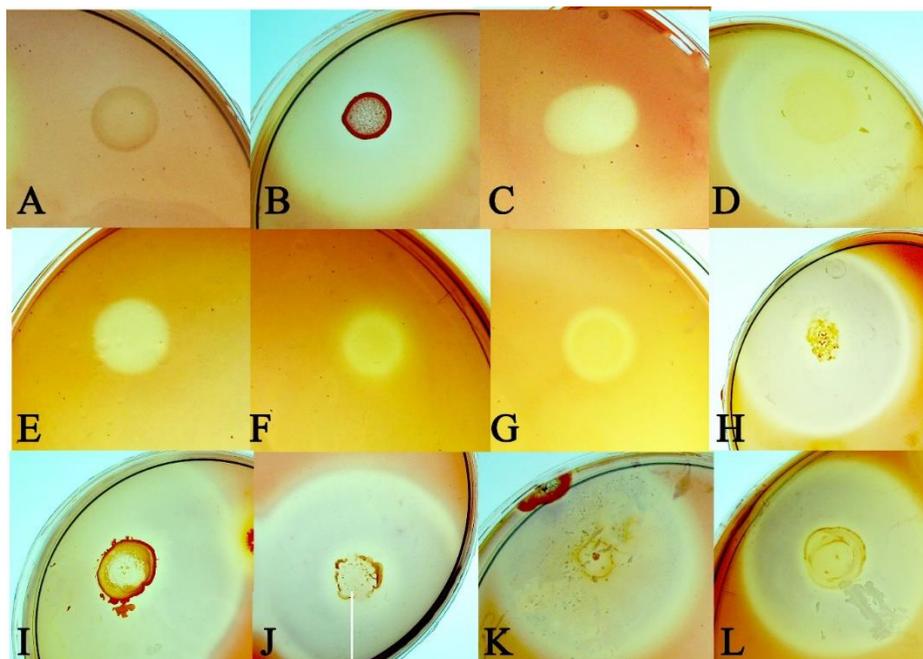


Figura 37. Prueba de producción de celulasas elulasa medio YMA con CMC y teñido con Rojo Congo. Entre paréntesis se muestra el género: M = *Mesorhizobium*, B = *Bacillus*. A. Control negativo (CSLC67N), B. Control positivo (CSLC94N), C. FCAP 06 (M), D. FCAP 28 (P), E. FCAP 20 (M), F. FCAP 29 (M), G. FCAP 34 (M), H. FSZ 12 (B), I. FSZ 27 (B), J. FSZ 29 (B), K. FSZ 61 (M) y L. FSZ 51 (M).

1.2. Producción de biofilms

Independientemente de la capacidad PGPR de algunos microorganismos, si éstos no pueden mantener una estrecha relación con el sistema radicular de las plantas, muchos de los beneficios que generen se perderán y/o no se aprovecharán al máximo por las plantas. Por consiguiente, la unión de las bacterias a las raíces de las plantas mediante la formación de biofilms resulta muy beneficiosa. Esta estructura permite el establecimiento de una comunidad microbiana en una superficie mediante un exopolímero que genera una matriz en la que se embeben las bacterias. Diversas investigaciones han mostrado como la celulosa es un componente crucial en dicha matriz (Robledo et al., 2012). Referente a los rizobios se ha confirmado que la celulosa es necesaria para un anclaje óptimo; por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii polimeriza la glucosa en microfibrillas de celulosa que sirven para anclarse a las raíces de *Trifolium repens*, planta hospedadora de esta bacteria (Robledo et al., 2012). En resumen, los biofilms bacterianos son una comunidad de células que se adhieren a la superficie del sistema radicular mediante una matriz extracelular (Donlan, 2002). Éste es un factor de resistencia con altos niveles de complejidad que ayuda a soportar factores abióticos y bióticos (Costerton et al. 1995; Passmore & Costerton, 2003).

Respecto a la capacidad de las cepas de este estudio para producir biofilms, y para simplificar todos los datos generados, nos centraremos en las cepas productoras de biofilms por género y su producción a las 24, 48 y 72 horas. A rasgos generales, más de la mitad de las cepas fueron productoras comparables con el control positivo (cepa formadora de biofilms) a las 24 horas. Sin embargo, hay que destacar que conforme pasaban los días, un mayor número de cepas se iba sumando a los productores de biofilms (Tabla 47). De forma general, a las 24 horas únicamente el 11% de las cepas produjeron un biofilm considerable (los cuales sobrepasaban una densidad óptica a 0,5 a 492nm), a las 48 horas un 31% y a las 72% un 66%. En otras palabras, observamos y confirmamos que conforme pasan los días la mayoría de las cepas forman y mantienen los biofilms, independientemente del género. En proporcionalidad a nuestros aislados, las cepas de *Micromonospora* mostraron el mayor número de cepas productoras de biofilm (83%). Muy cerca de éstas está *Mesorhizobium* donde ya el tercer día el 75% de las cepas aisladas producían biofilms. Cabe mencionar que visualmente las otras cepas mostraban biofilms si son comparadas con el control negativo (cepa no productora), aunque en menor medida que las cepas anteriormente mencionadas, simplemente se seleccionó el umbral de 0,5 (a 492nm) para evaluar como aumentaba el número de cepas capaces de producir biofilms.

Se ha demostrado que especies de *Mesorhizobium* son capaces de producir biofilms, de hecho, se ha estudiado el *quórum sensing* y su implicación en la formación de biopelículas (Wang et al., 2004). Un estudio realizado por Das y colaboradores (2017) encontró que el desarrollo de biofilms por parte de *Mesorhizobium ciceri*, junto con *Trichoderma viride* mejoró el desarrollo vegetal al facilitar la adquisición de amoníaco, la producción de ácido indolacético y la solubilización de fosfato además, de producir actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*.

Tabla 47. Porcentaje de cepas de cada uno de los géneros de este estudio que producían biofilms a los diferentes tiempos de medida. Densidad óptica igual o mayor a 0,5 a 492nm.

Género	Mayores productores a 24 hrs	Mayores productores a 48 hrs	Mayores productores a 72 hrs
<i>Mesorhizobium</i>	14%	39%	75%
<i>Bacillus</i>	9%	23%	59%
<i>Paenibacillus</i>	0%	40%	60%
<i>Domibacillus</i>	0%	0%	50%
<i>Aneurinibacillus</i> (1cepa)	0%	0%	100%
<i>Micromonospora</i>	17%	50%	83%
<i>Sphaerisporangium</i> (1cepa)	0%	0%	0%
Todos	11%	31%	66%

1.3. Producción de sideróforos

En muchas ocasiones los suelos poseen los nutrientes necesarios para las plantas y, sin embargo, se encuentran en formas no asimilables para las mismas. No obstante, algunas las rutas metabólicas bacterianas son capaces de transformar algunos elementos en formas más asequibles para la planta. En este sentido, las plantas, son incapaces de adquirir la forma de oxidada de hierro (Fe^{3+}), sin embargo, hay especies microbianas capaces de reducirlo (a Fe^{2+}), siendo esta forma de hierro asimilable por la planta. Esto es debido a que algunas bacterias son capaces de producir unas moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad y quelantes de hierro llamadas sideróforos (Holden & Bachman, 2015). La importancia del hierro recae en que es un elemento que se utiliza en la síntesis de ATP, precursor de ribonucleótidos y formación de los grupos heme (Verma et al. 2013).

Para analizar la capacidad de los aislados de este estudio para producir sideróforos, las colonias fueron crecidas en medio CAS-M9-Agar, donde la producción de sideróforos genera un halo anaranjado alrededor del crecimiento de la colonia.

Conforme a los resultados obtenidos encontramos unas pocas de las especies aisladas de nódulos de *Cicer arietinum* L. que fueron capaces de producir sideróforos (Figura 38). Específicamente, solo 8 cepas fueron productoras de sideróforos. De hecho, la mayoría eran del género *Mesorhizobium*. En este sentido las cepas de *Mesorhizobium* productoras de sideróforos fueron FCAP 04, FCAP 09, FCAP 21, FCAP 22, FCAP 29 y FCAP 38; mostrando estas últimas 4 un mismo perfil genético. Las otras dos fueron FSZ 28 (*Aneurinibacillus migulanus*) y FSZ 29 (*Bacillus licheniformis*). Cabe destacar que a las cepas productoras se les midió el halo generado y se proporcionó al tamaño de la colonia para hacer el cálculo de porcentaje de eficiencia de producción (Ramachandran et al., 2007), con el objetivo de cuantificar la producción de sideróforos. La cepa que presentó más

capacidad para producir sideróforos fue la cepa de *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28, con un 59,7% de porcentaje de eficiencia de producción. Por otro lado, las cepas de *Mesorhizobium* mayores productoras fueron: FCAP 29, FCAP 22 y FCAP 04 con 55,83%, 55,0% y 43,65% respectivamente.

No resulta raro que especies clasificadas como rizobios sean productores de sideróforos (Duhan et al., 1998; Garcia-Fraile et al., 2012; Flores-Félix et al., 2013). De igual forma, se han estudiado sideróforos en diversos estudios específicos de *Mesorhizobium*, mostrando la importancia de éstos para promover el crecimiento vegetal (Ahemad & Khan 2012).

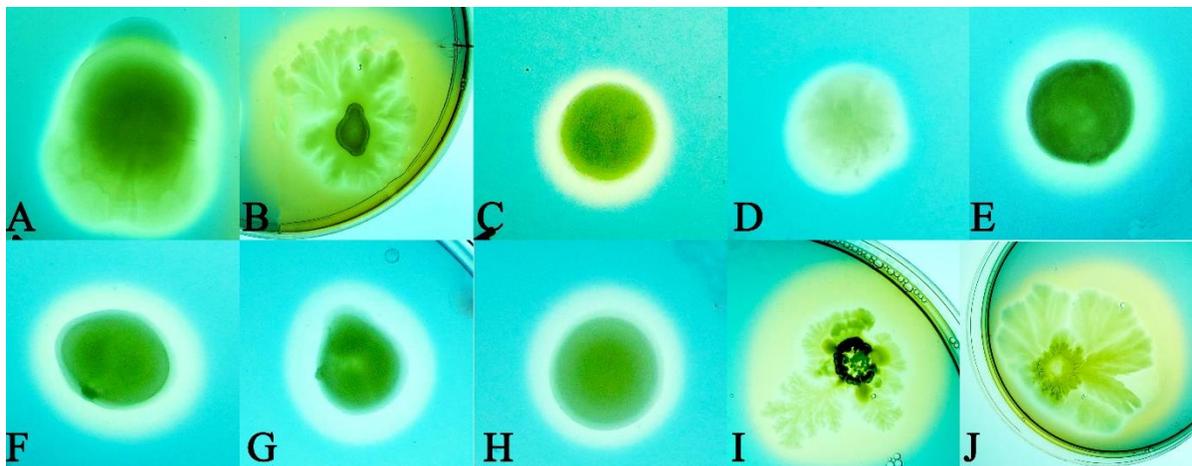


Figura 38. Prueba de Sideróforos en medio CAS-M9-Agar. Entre paréntesis se muestra el género: M = *Mesorhizobium*, A = *Aneurinibacillus*, B = *Bacillus*. A. Control negativo (CSLC01N), B. Control positivo (CSLC11N), C. FCAP 04 (M), D. FCAP 09 (M), E. FCAP 21 (M), F. FCAP 22 (M), G. FCAP 29 (M), H. FCAP 38 (M), I. FSZ 28 (A) y J. FSZ 29 (B).

1.4. Solubilización de fosfato

Otra de las características importantes en algunos microorganismos PGPR es su capacidad para solubilizar fosfatos. Para analizar el potencial de las cepas de este estudio para solubilizar fosfatos, se utilizó el medio de cultivo Pikovskaya suplementado con fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, compuesto de baja solubilidad en agua. Por lo tanto, de forma *in vitro* se puede determinar si las cepas aisladas en este estudio son capaces de solubilizar el fosfato tricálcico. De esta forma se puede probar que estas cepas son capaces de solubilizar al menos una de las formas insolubles del fósforo y transformarlo a formas disponibles para las plantas.

Conforme a lo observado (Figura 39), todas las cepas del género *Mesorhizobium* fueron capaces de solubilizar esta forma insoluble de fósforo, a excepción de la cepa FSZ 51. Por consiguiente, a nivel proporcional el 97% de las cepas de *Mesorhizobium* poseen este mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. Cabe mencionar que hubo cepas donde el cálculo de eficiencia en solubilización de fosfato determinó que su halo de solubilización sobrepasó o duplicó el equivalente al diámetro de la colonia como fueron: FCAP 04, FCAP

11, FCAP 21, FCAP 30, FCAP 34, FCAP 38, FSZ 52, FSZ 61, FSZ 64. De hecho, las mayores solubilizadoras de fosfato de todos los aislados fueron *Mesorhizobium* y dentro de este grupo las cepas FSZ 52 y FSZ 61 fueron las mayores productoras, ambas con el mismo perfil genético. Conforme a los *Bacillus* el 95% de las cepas fueron solubilizadoras de fosfato, además la única cepa de *Aneurinibacillus*, también fue positiva. De las cepas de *Paenibacillus*, 4 de las 5 fueron solubilizadoras de fosfato. Ninguna de las cepas bajo los géneros de *Domibacillus*, *Micromonospora* y *Sphaerisporangium* solubilizaron la forma de fosfato seleccionada.

Conforme a lo observado, se confirma que la mayoría de las cepas fueron solubilizadoras de fosfato y, por consiguiente, tienen potencial como organismos promotores del crecimiento vegetal. Cabe mencionar que las cepas que no lograron solubilizar el fosfato en las condiciones del ensayo, no significan que no lo hagan. Para algunos microorganismos ciertas formas de fosfato utilizadas en estos análisis *in vitro* no son las idóneas. Una alternativa para confirmar que son negativas para la solubilización de fosfato es utilizar una combinación de 2 o 3 metales unidos al átomo de fósforo (Bashan et al. 2013).

La importancia del fósforo recae en que en las plantas es un elemento limitante. Su carencia afecta división y desarrollo celular, transporte de energía, transducción de señales, de síntesis de macromoléculas, fotosíntesis y respiración celular, funciones imprescindibles para las plantas. Cuando este elemento se encuentra en cantidades bajas o no están biodisponibles puede ocasionar retraso de crecimiento de las plantas, hojas oscuras, inhibición de la floración, retraso en el desarrollo del sistema radicular, entre otros (Khan et al., 2014). Esta fuente proviene primordialmente de minerales primarios, secundarios y compuestos orgánicos. Además, algunos de los fosfatos aplicados en cultivos agrícolas pueden ser inmovilizados rápidamente, todas las formas antes mencionadas no están disponibles para la planta (Hardoim et al., 2012; Khan et al., 2014).

No resulta extraño que cepas de *Mesorhizobium* sean solubilizadoras de formas insolubles de fosforo, ya algunas investigaciones lo han mostrado (Ahmad et al., 2008; Verma et al., 2013), de hecho, Peix y colaboradores (2001) describe 2 cepas de *Mesorhizobium ciceri* y 6 cepas de *Mesorhizobium mediterraneum* cuya planta hospedadora es *Cicer arietinum* L. y aisladas de España fueron solubilizadoras de fosfato.

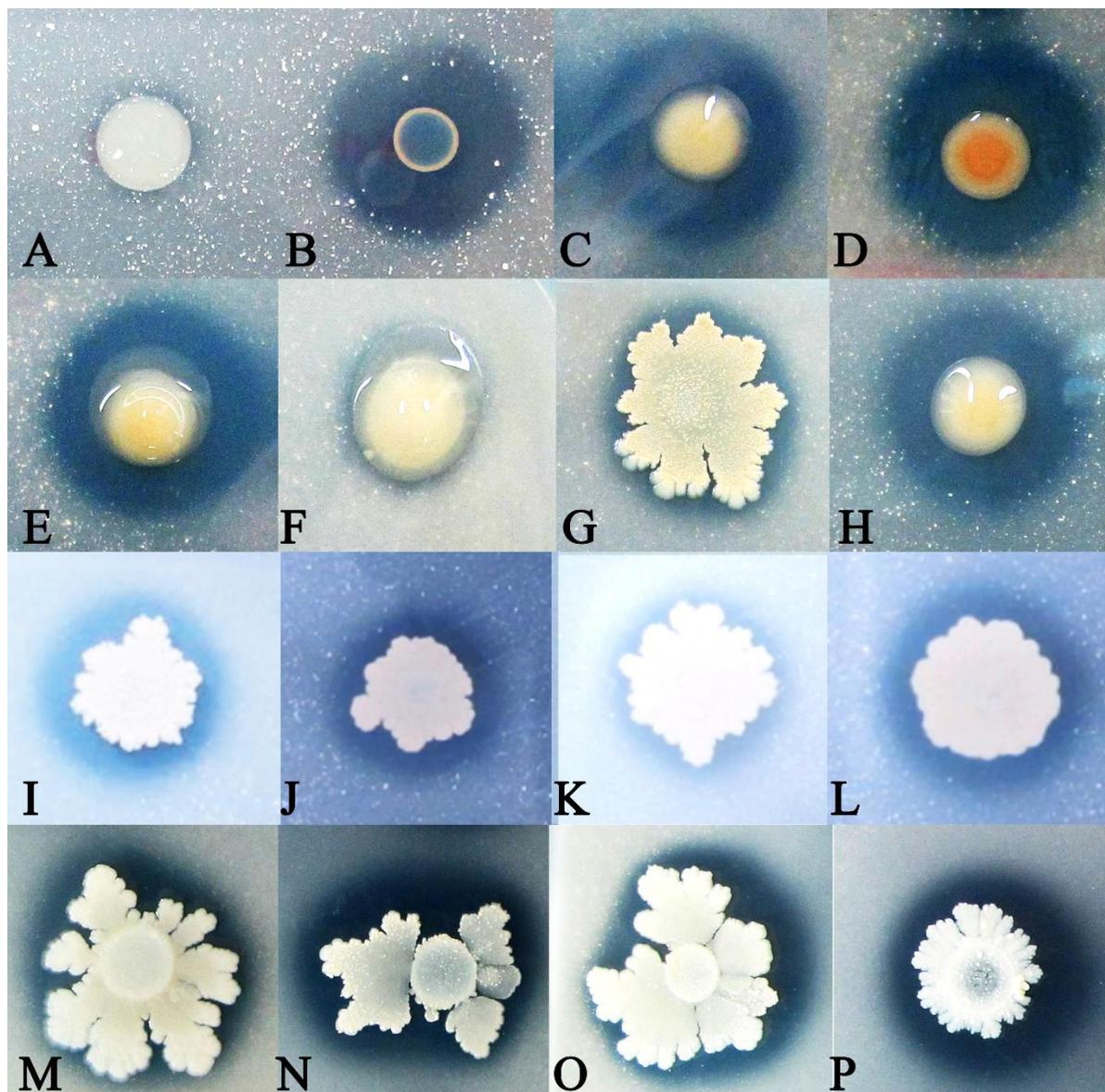


Figura 39. Prueba de Solubilización de Fosfato en medio Pikovskaya. Entre paréntesis se muestra el género: M = *Mesorhizobium*, B = *Bacillus*. A. Control negativo (CSLC36N), B. Control positivo (CSLC11N), C. FCAP 21 (M), D. FCAP 04 (M), E. FCAP 22 (M), F. FCAP 40 (M), G. FSZ 01 (B), H. FCAP 38 (M), I. FSZ 27 (B), J. FSZ 16 (B), K. FSZ 25 (B), L. FSZ 15 (B), M. FSZ 30 (B), N. FSZ 34 (B), O. FSZ 39 (B) y P. FSZ 43 (B).

1.5. Producción de Ácido Indol-3-acético (IAA)

Una de las características que podrían mostrar los microorganismos y destacar su potencial como promotores del crecimiento vegetal es la capacidad de producir fitoestimuladores o fitohormonas. Éstas actúan como mensajeros químicos y desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de las plantas, aunque se encuentren en concentraciones bajas (Rani & Goel, 2012).

Existen diferentes tipos de fitohormonas, y en este trabajo nos centraremos en un tipo de auxina conocida como Ácido Indol-3-acético (IAA por sus siglas en inglés). Ésta es una de las fitohormonas más estudiadas debido a su capacidad para promover el crecimiento vegetal, ya que fomenta la elongación celular, formación de tejidos vasculares, previene la senescencia, mejora la producción de raíces laterales y aumenta el volumen de las raíces (Hardoim et al., 2012). En este sentido, un mayor sistema radicular permite a la planta que pueda alcanzar una mayor área en el subsuelo y, por consiguiente, mayor oportunidad de alcanzar y adquirir nutrientes y agua (Spence et al., 2012), lo cual se traduciría en una planta más competitiva y que podría dar mayores rendimientos.

Una clave importante para identificar si nuestras cepas son capaces de producir esta fitohormona *in vitro* es la adición de Triptófano (Figura 9) en el medio de cultivo, ya que éste es un precursor del IAA, por tanto, el triptófano fue añadido al medio JMM. Una vez realizado el debido protocolo y añadiendo el agente Sarskovky se puede observar una coloración rosada es positivo a la producción, y a mayor intensidad mayor cantidad de ácido indol acético producido, como se muestra en la figura 40. De la totalidad de las cepas del estudio, el 55% fueron positivas a la producción de IAA. En igual proporción, el 55% de las cepas del género *Bacillus* producía esta fitohormona, siendo las cepas más productoras, tanto de este género como de la totalidad de los aislados: FSZ 07, FSZ 18, FSZ 22, FSZ 31, FSZ 32, FSZ 35 y FSZ 43. Las 2 cepas identificadas como pertenecientes al género *Domibacillus* también fueron productoras de IAA, en el caso de las 5 cepas de *Paenibacillus*, solo 3 fueron productoras y, en cambio, la cepa de *Aneurinibacillus* no produjo ninguna coloración indicativa de producción e IAA. Por su parte, de las 4 cepas de *Micromonospora*, 6 cepas produjeron IAA. Referente a las cepas de *Mesorhizobium*, el 53% de las cepas produjo IAA. Entre las cepas más productoras destacan FCAP 11, FCAP 15 y, principalmente, FCAP 25. Algunas de las cepas que mostraron una mayor producción de IAA se pueden observar en la figura 41.

Cabe destacar que bajas concentraciones de esta fitohormona en la planta podría retardar el crecimiento de la misma; no obstante, altas concentraciones de esta hormona podrían inhibir el desarrollo y crecimiento de raíces primarias (Duca et al. 2014). Por consiguiente, es importante evaluar la interacción de estas cepas directamente con las plantas bajo condiciones muy controladas a fin de determinar si la producción de IAA por parte de la bacteria afecta positiva o negativamente el desarrollo de la planta.

El IAA es considerado como una molécula de señalización en bacterias la cual tiene efectos directos en la fisiología bacteriana (Spaepen et al. 2007). Varios estudios muestran que esta

molécula es producida por diferentes géneros con potencial de biofertilizantes, por ejemplo, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter* o *Streptomyces* (Duca et al. 2014; García-Fraile et al. 2012). En relación con los géneros de las cepas de este estudio, también se ha reportado como potenciales productores de IAA algunos *Paenibacillus* (Acuña et al., 2011), algunas especies de *Bacillus*, como por ejemplo *B. amyloliquefaciens* (Idris et al., 2007; Shao et al., 2015), *B. subtilis* (Reetha et al., 2014) y *B. licheniformis* (Saharan & Verma, 2014) y *Micromonospora* (Martínez-Hidalgo et al., 2014). Otras investigaciones han confirmado que cepas de *Mesorhizobium* poseen la capacidad para producir IAA (Verma et al., 2013); además, se ha propuesto que en caso de cepas de *Mesorhizobium* no productoras de IAA, la coinoculación con algunas especies de *Pseudomonas* capaces de producirlo pueden incrementar el número de nódulos y la biomasa en garbanzo (Malik & Sindhu, 2011). Respecto a las cepas de *Domibacillus*, al ser un género recientemente descrito no se había investigado su potencial para producir IAA, por consiguiente, ésta sería la primera vez que se describe la capacidad de producción de esta molécula en este género.

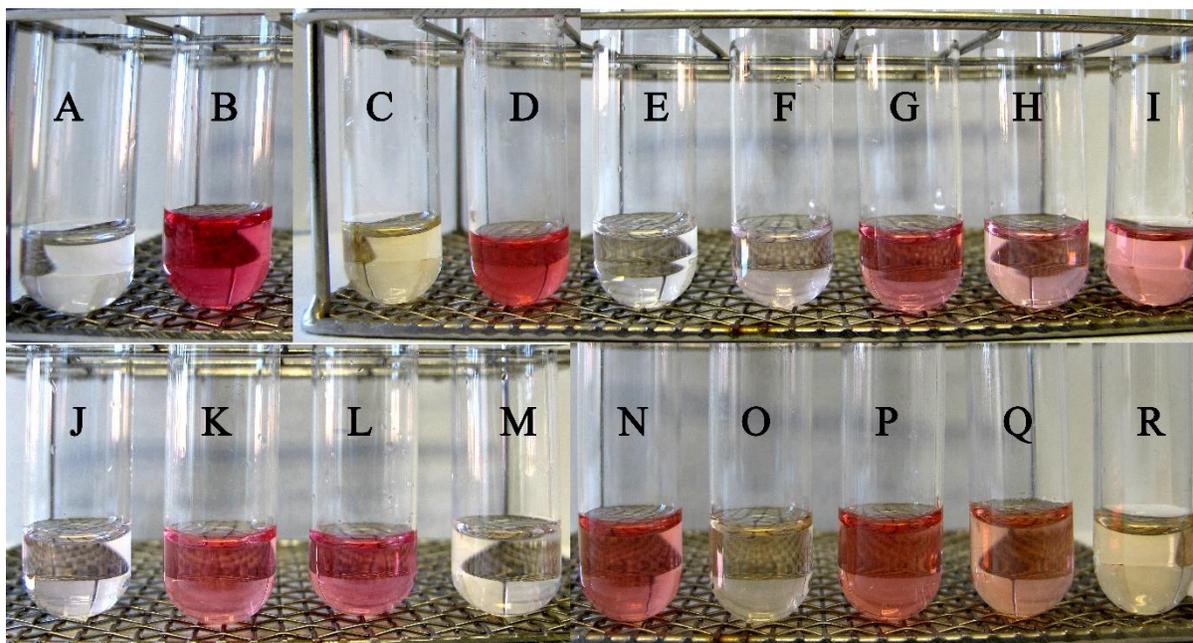


Figura 40. Prueba presuntiva de Producción de Ácido Indol-3-acético (IAA) en medio JMM (Tabla 26) y JMM modificado (Tabla 27). Entre paréntesis se muestra el género: M = *Mesorhizobium*, B = *Bacillus*; E–M medio JMM y N–R medio JMM modificado. A. Control negativo JMM (Sin inocular), B. Control positivo JMM (ATCC14480), C. Control negativo JMM modificado (Sin inocular), D. Control positivo JMM modificado (FSZ 27), E. FCAP 01 (M), F. FCAP 03 (M), G. FCAP 04 (M), H. FCAP 06 (M), I. FCAP 09 (M), J. FCAP 28 (P), K. FCAP 29 (M), L. FCAP 35 (M), M. FCAP 40 (M), N. FSZ 35 (B), O. FSZ 36 (B), P. FSZ 37 (B), Q. FSZ 43 (B) y R. FSZ 44 (B).

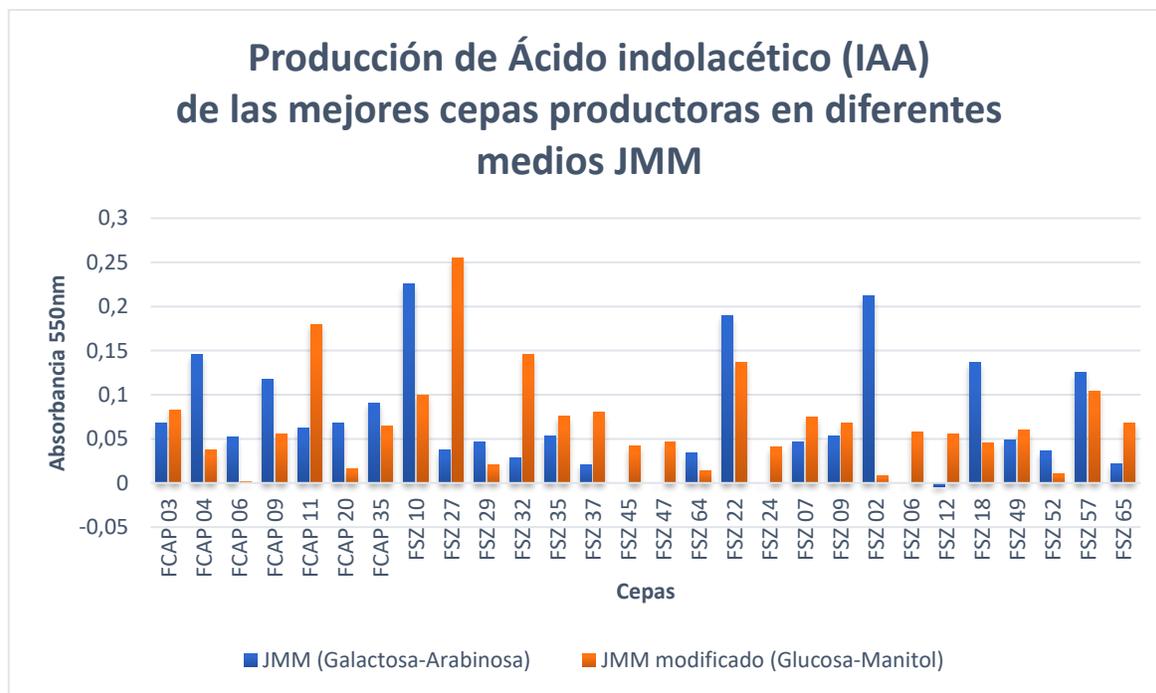


Figura 41. Muestra las mejores cepas productoras de Ácido Indol-3-acético (IAA) en medio JMM (Tabla 26) y JMM modificado (Tabla 27).

1.6. Producción de la enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminasa

El etileno es una hormona presente en las plantas superiores, cuya función es modular el crecimiento y desarrollo de las plantas. En otras palabras, en muchas de las etapas del proceso de desarrollo de las plantas está involucrado el etileno, incluida la nodulación en las leguminosas.

La síntesis de etileno se afecta con diversos factores entre los que se incluye: temperatura, nutrición, luz, niveles de otras hormonas, estrés biológico, entre otros. Si la planta muestra mayores niveles de estrés, los niveles de etileno aumentan. Como primera respuesta a un primer nivel de estrés, en la primera fase se produce una pequeña cantidad de etileno que es consumido por la ACC desaminasa, luego comienza la transcripción de los genes para proteínas protectoras de las plantas. Posteriormente, una segunda producción de etileno es activada luego de la producción de la ACC, y es esta segunda producción que se origina varios días después de la primera producción de etileno, la que de forma general es perjudicial para la planta, pues, es causante de senescencia, clorosis, abscisión de la hoja. Esta segunda producción capaz de exacerbar el estrés puede ser controlada de forma química o biológica (Glick, 2014).

Así, a parte de los diversos mecanismos PGPR que ya hemos mencionado, otro rasgo importante que podría ser clave para facilitar el crecimiento en las plantas es que la bacteria

posea la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa. Esta enzima es responsable de la escisión del precursor del etileno en la planta en amoniaco y α -cetobutirato. Por tanto, al disminuir los niveles de ACC en la planta por parte de la ACC α -cetobutirato bacteriana, se disminuyen los niveles etileno en la planta, mejorando la resistencia al estrés de ésta. El IAA (vegetal o bacteriano) puede estimular la síntesis de etileno en la planta (como otros factores de estrés biótico y/o abiótico), sin embargo, las bacterias promotoras de crecimiento con ACC desaminasa pueden reducir parte de ese etileno producido (Glick, 2014).

En los ensayos de producción de ACC desaminasa, encontramos que algunos de los microorganismos de este estudio fueron capaces de crecer en un medio definido (JMM) sin contenido de nitrógeno y con ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico, $C_4H_7NO_2$) (Figura 42). Las bacterias capaces de crecer en ese medio podrían tener la enzima ACC desaminasa y descomponer el ACC para poder utilizarlo como fuente de nitrógeno e inclusive de carbono, ya que como productos de la hidrólisis de esta molécula se obtienen amoniaco y α -cetobutirato (Klee et al., 1991). Sin embargo, no significa que todas ellas sean posean esta enzima, ya que si algunas de ellas eran capaces de adquirir nitrógeno atmosférico podrían crecer sin necesidad de degradar el ACC, en cambio, si no crecieron bajo estas condiciones (cabe mencionar que todas las 95 cepas crecieron en este medio cuando se le añadió NH_4NO_3), es muy probable que no posean la enzima ACC desaminasa. Como el ACC es la molécula precursora de etileno (Yang & Hoffman, 1984), por tanto, su degradación evitará los efectos adversos que una sobreproducción de esta hormona ocasiona (Saleem et al., 2007). Esta propiedad ha sido evaluada en diversos microorganismos con potencial PGPR, por ejemplo, *Pseudomonas* en trigo (Shaharouna et al., 2008), *Rhizobium* en plantas de pimiento y tomate (García-Fraile et al., 2012).

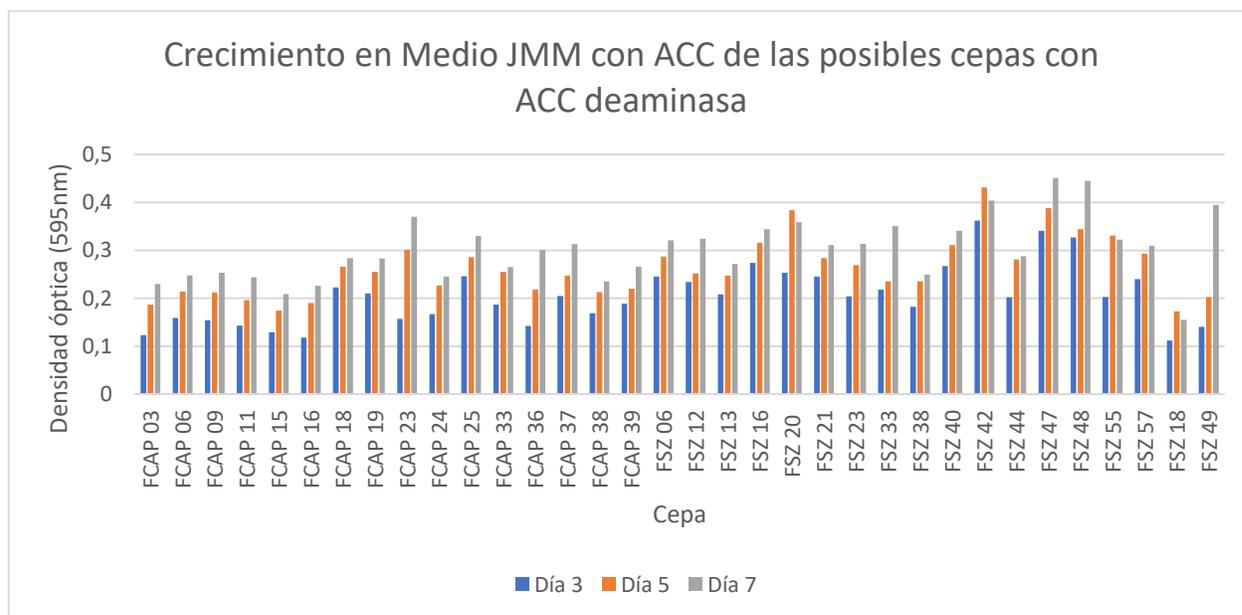


Figura 42. Crecimiento de las cepas de este estudio en medio JMM sin fuente de nitrógeno con ACC. Crecimiento microbiano medido a 595nm, a los 3, 5 y 7 días.

De hecho, las cepas de *Rhizobium* que poseen esta enzima son hasta un 40% más eficientes en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Ma et al., 2003, 2004; Glick, 2014). La actividad de esta enzima en rizobios es menor en comparación con las bacterias promotoras del crecimiento en vida libre. Los rizobios simbióticos específicos, su bajo nivel de actividad enzimática facilita la nodulación ya que es suficiente para disminuir de forma local los niveles de etileno en la zona de infección y nodulación. No se conoce si esta diferencia en actividad enzimática se debe a cantidad de enzimas o actividad catalítica específica (Glick, 2014). Una investigación realizada por Nascimento y colaboradores (2012^a) estudiaron la una cepa de *Mesorhizobium* transformada mediante el gen *acdS* (gen implicado en la síntesis de ACC desaminasa) a fin de evaluar su capacidad de aumentar el crecimiento de plantas de garbanzo, encontrando que aumentó en un 127% la capacidad de esta cepa para nodular garbanzo y promovió en un 125% el crecimiento de las plantas al ser comparada con la cepa salvaje. En otro trabajo realizado por Nascimento y colaboradores (2012^b), intentaron identificar en una colección de cepas de *Mesorhizobium* noduladores de garbanzo en Portugal la prevalencia del gen *acdS*, encontrando que algunas cepas tipo y todas las cepas que ellos aislaron de garbanzo poseían el gen de la ACC desaminasa. Sin embargo, no se detectó actividad ACC desaminasa bajo condiciones de vida libre. Además, ellos siguieron que este gen se adquirió de manera horizontal.

**Análisis del Potencial Simbiótico de cepas de
Mesorhizobium sobre plantas de *Cicer arietinum* L. en
condiciones controladas**

CAPÍTULO III

1. Análisis del crecimiento y desarrollo de cepas de *Mesorhizobium* sobre plantas de *Cicer arietinum* L.

Una vez conocido el potencial *in vitro* de todas las cepas para la producción de sideróforos, ácido indoleacético, ACC desaminasa, solubilización de fosfato, además de otros mecanismos que favorecían una mejor colonización en el sistema radicular como producción de celulosa (u otro polisacárido con enlaces β -1,4), biofilms y celulasas, resulta imprescindible un estudio de cómo el inocular las cepas bacterianas pueden fomentar el crecimiento y desarrollo directamente en las plantas. Por consiguiente, en un primer lugar, se inocularon exclusivamente las cepas de *Mesorhizobium* con un representante de cada uno de los perfiles RAPD. Lo que se pretendía era ver cómo se desarrollaban las plantas de *Cicer arietinum* L. primordialmente a un elemento limitante, como lo es el nitrógeno. Por consiguiente, las cepas de *Mesorhizobium* capaces de crear una buena relación simbiótica y que sean capaces de suplirle nitrógeno a las plantas de garbanzo, permitirán un mejor desarrollo de las plantas. Así pues, semillas previamente esterilizadas y pre-germinadas fueron cultivadas en vermiculita estéril y regadas con medio Fahraeus (tabla 32) estéril y sin ningún elemento que le proporcionara nitrógeno a la planta; por tanto, todo el nitrógeno requerido por la planta vendría de la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico.

1.1. Longitudes de las partes aéreas y radicales.

Tras inocular cada una de las cepas (20 plantas de garbanzo por cepa), se evaluó su desarrollo a los 45 días post-inoculación. Una de las principales características que se observa a primera vista es la longitud, tanto de la parte foliar como de la radicular. Para poder comparar los resultados se colocaron 2 controles sin inocular: el primero un control negativo que este contenía el mismo medio Fahraeus (tabla 32); en contraste, el control positivo consistía plantas regadas con Fahraeus suplementado con NH_4NO_3 a 5mM, molécula que sirve como fuente de nitrógeno para las plantas. La figura 43, muestra las plantas de garbanzo tras su inoculación con las distintas cepas en comparación con cada uno de los controles. En la misma se observa que el tamaño de las plantas con los inoculantes fue superior al control negativo, siendo en algunos casos comparable al del control con nitrógeno, e incluso, algunos con algunos inoculantes el tamaño obtenido de las plantas supera a las del control positivo.



Figura 43. Muestra representativa de las plantas de garbanzo obtenidas con cada uno de los tratamientos con respecto a sus controles.

Un mejor detalle del crecimiento de la parte foliar y radicular lo observamos la figura 44, donde se muestra la media junto con las barra de error estandar para cada uno de los tratamientos, con el fin de tener un mejor detalle del crecimiento longitudinal de las plantas. Para hacer una mejor comparativa exclusivamente respecto al control, las barras que muestran un asterisco significa que el tratamiento es significativamente superior al control negativo, dos asteriscos es que la cepa en esa característica es significativamente superior al control positivo y tres asterisco significa que la cepa (tratamiento) es significativamente superior a ambos controles, con $P < 0,05$. Muchas de las cepas mostraron similar al control negativo, sin embargo, un número considerable tuvieron una longitud inferior al control negativo, figura 44. Sin embargo, cuando observamos la figura 43 destaca la biomasa de las plantas inoculadas con las cepas bajo este estudio referente al control negativo, así pues, no es sólo longitud lo que demostrará un mejor crecimiento y desarrollo, ésta característica la abordaremos con más detalle en la sub-sección 1.3 de este capítulo. Entre las cepas que más longitud aérea mostraron fueron FCAP 03, FCAP 15, FSZ 52 y FCAP 16, siendo esta última la que mostró una mayor longitud, incluso fue significativamente superior al control positivo.

Referente a la longitud radicular muchas de las cepas mostraron un largo considerable, figura 45. De hecho, 12 de las 16 cepas mostraron una longitud mayor que el mismo control positivo. Intentando correlacionar los datos observado hasta ahora, algunas de estas cepas logramos detectar la presencia de la fitohormona Ácido indolacético (IAA), y como ya hemos mencionado es capaz de fomentar el desarrollo de las raíces y esto podría estar implicado en

dicho desarrollo. Esta mayor longitud podría representar que las plantas puedan profundizar más en el terreno y adquirir una mayor cantidad de nutrientes, que si un buen sistema radicular serían factores limitantes de algunos macro y micro elementos. Esta longitud radicular tiene que complementarse con los resultados del peso, la cual representaría la biomasa o volumen radicular, ésta la discutiremos más adelante.

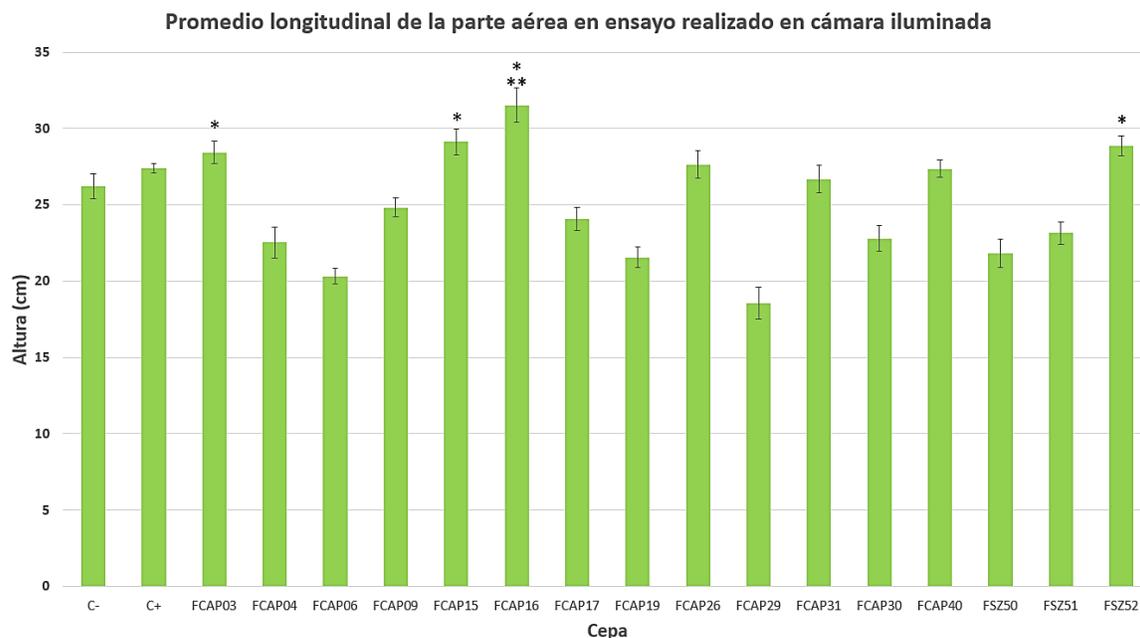


Figura 44. Logitud aerea de plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a P < 0,05.

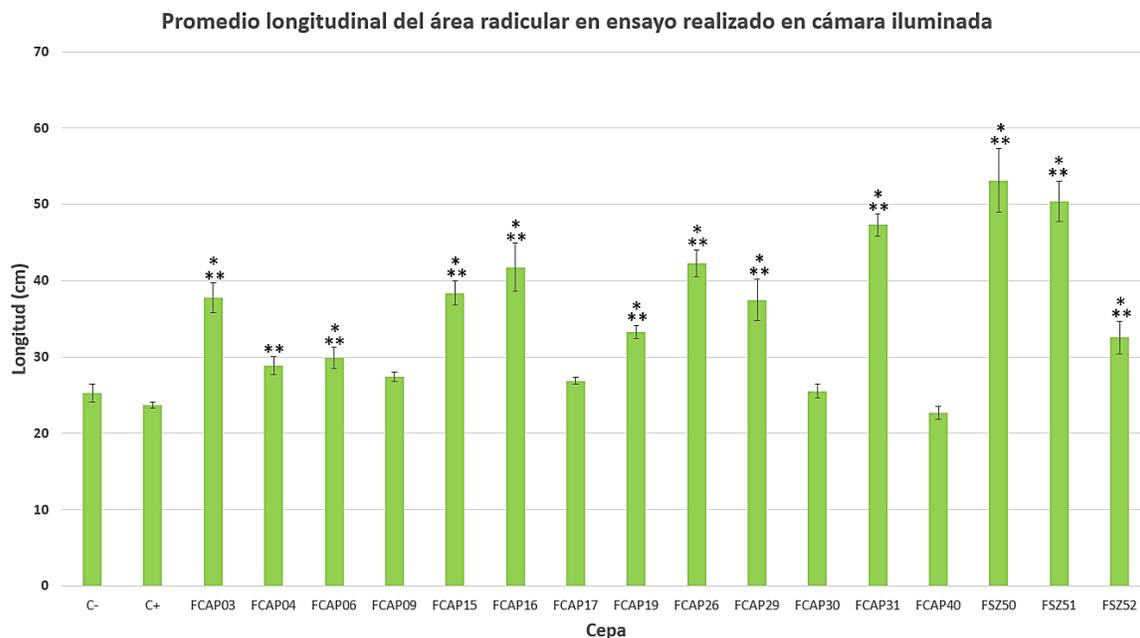


Figura 45. Logitud radicular de plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

1.2. Contenido de Clorofila

Otra característica importante que fue medible en las plantas inoculadas con las diversas cepas de *Mesorhizobium* fue el contenido de clorofila, mediante el equipo Konica Minolta® SPAD-505 Plus. Conforme a lo observado en la figura 46, las plantas inoculadas con 15 de las 16 cepas poseían un contenido en clorofila significativamente superior al de las plantas del control negativo. Además, a excepción de las plantas inoculadas con la cepa FCAP 04, el resto de las plantas no mostraron diferencias significativas respecto al control positivo en su contenido en clorofila, lo que significa que sin tener una fuente añadida de nitrógeno, éstas cepas lograron igualar a dicho control positivo. Los niveles altos de clorofila se pueden correlacionar con el estado nutricional de las plantas o cultivos, pues, una falta de nitrógeno en las plantas puede afectar su contenido de clorofila (Sainz-Rozas & Echeverría, 1998). Por lo tanto, se puede utilizar el contenido de clorofila para de forma indirecta detectar el contenido de nitrógeno en la planta (Novoa & Villagrán, 2002, Rodríguez-Mendoza et al. 1998, Sainz-Rozas & Echeverría, 1998), existiendo estudios en los que se demuestra esta alta correlación entre el contenido de clorofila y la cantidad de nitrógeno en la planta (Cruz-González et al., 2017). En resumen, podemos determinar que nuestras cepas son capaces y están adquiriendo el nitrógeno atmosférico mediante la relación simbiótica con nuestros inoculantes.

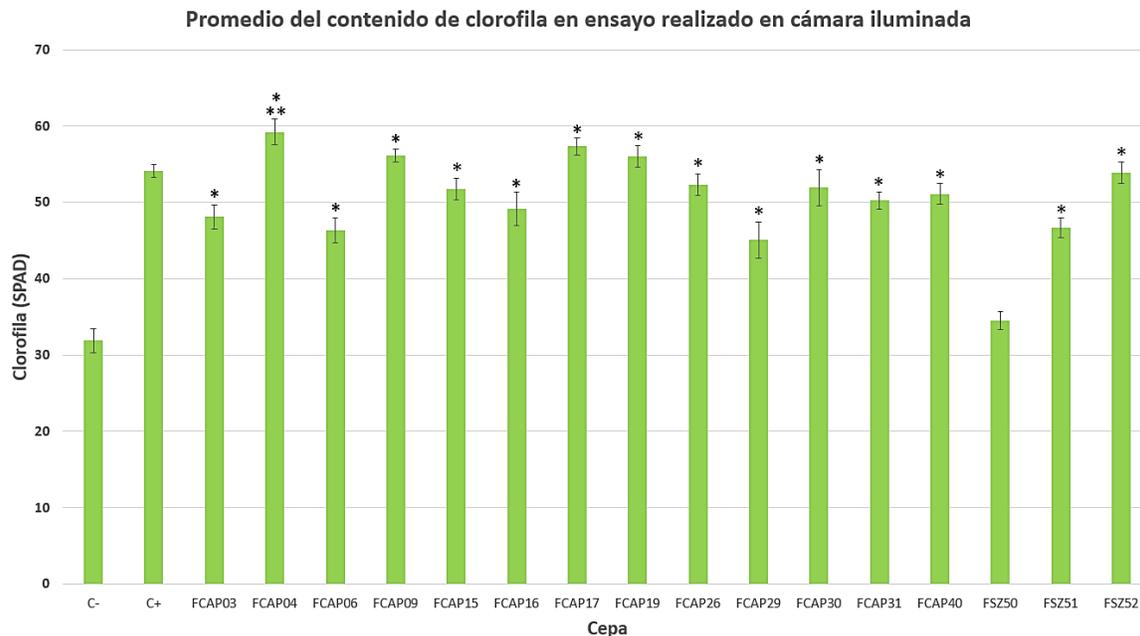


Figura 46. Contenido de clorofila en plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

1.3. Pesos de las partes aéreas y radiculares

Los datos de longitudes que ya hemos mostrado se tienen que complementar con el peso, lo que nos va a mostrar de cierta forma la abundancia o volumen que tenían las plantas. En este sentido, si la planta es alta pero muy delgada con pocas ramificaciones su producción podría ser menor que una planta un poco más pequeña, pero con más ramificaciones. Recordemos que sólo 4 cepas mostraron una longitud significativamente mayor al control negativo, y únicamente una superó el control nitrogenado. Ahora bien, si tenemos en cuenta los pesos frescos de las partes aéreas, 10 cepas fueron significativamente superiores al control negativo e igualaron al control positivo (Figura 47). Para tener una medida más certera del peso, lo ideal es medir el peso seco, de esta forma se pueden eliminar el factor de exceso de humedad de algunas de las plantas, mostrando el valor de la biomasa real. En este sentido, la figura 48 muestra que, excepto las plantas inoculadas con 2 cepas (FCAP 6 y FCAP 29), las demás sobrepasaron el control sin fertilizante. En otras palabras, el nitrógeno proporcionado exclusivamente por la relación simbiótica con la mayor parte de las cepas de *Mesorhizobium* de este estudio es suficiente para igualar al tratamiento nitrogenado en cuanto a la capacidad para producir biomasa en la planta.

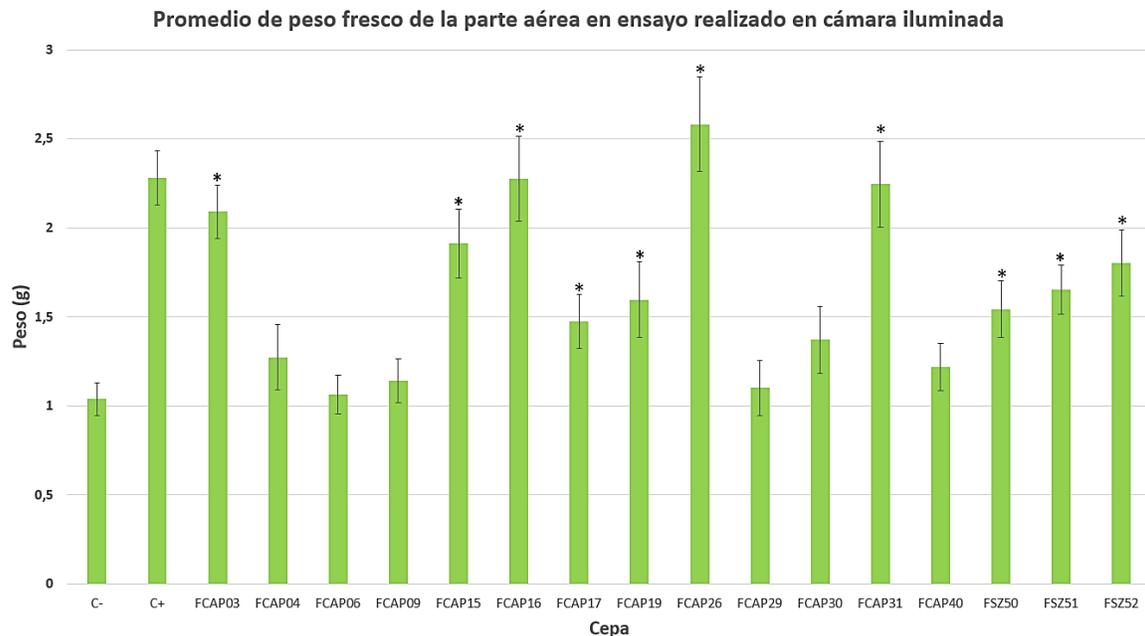


Figura 47. Peso fresco aéreo de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

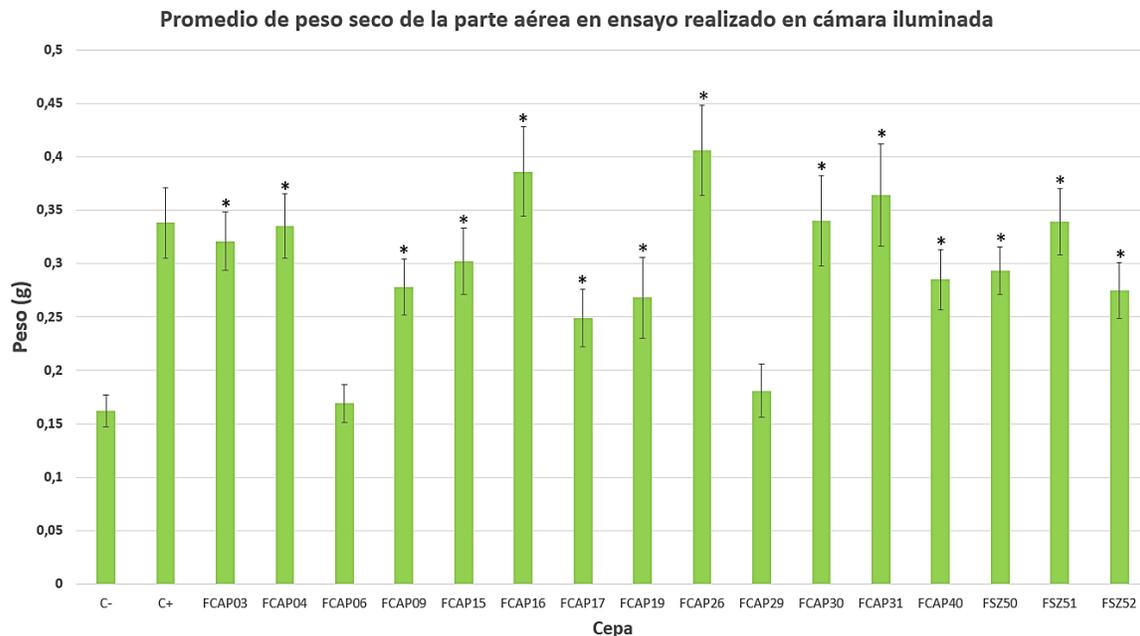


Figura 48. Peso seco aéreo de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

Referente a la logitud radicular como ya mencionamos (figura 45), las plantas inoculadas con 12 de las 16 cepas de *Mesorhizobium* mostraron una longitud mayor que inclusive el mismo control nitrogenado. Sin embargo, como hemos dicho, aparte de la longitud, igual de importante o más lo es la biomasa. En este sentido, varias cepas fueron capaces de generar un sistema radicular mayor que el control negativo, inclusive, más que el mismo control nitrogenado. Conforme a lo determinado en el peso húmedo radicular (Figura 49), observamos que las plantas inoculadas con la mayoría de las cepas mostraron una mayor peso radicular. Sin embargo, si nos centremos en los pesos radiculares secos (Figura 50), que nos darán una muestra más fiable de la biomasa, en este caso la tendencia se mantiene, de hecho las plantas inoculadas con 7 de las cepas sobrepasaron significativamente el control nitrogenado. El sistema radicular es el que tiene ese contacto directo con nuestras cepas y, por lo tanto, se muestra la interacción de las cepas inoculadas con las plantas está fomentando el crecimiento radicular, lo cual se puede traducir a una mejor adquisición de nutrientes y agua y tener como consecuencia un mejor crecimiento y desarrollo total de la planta.

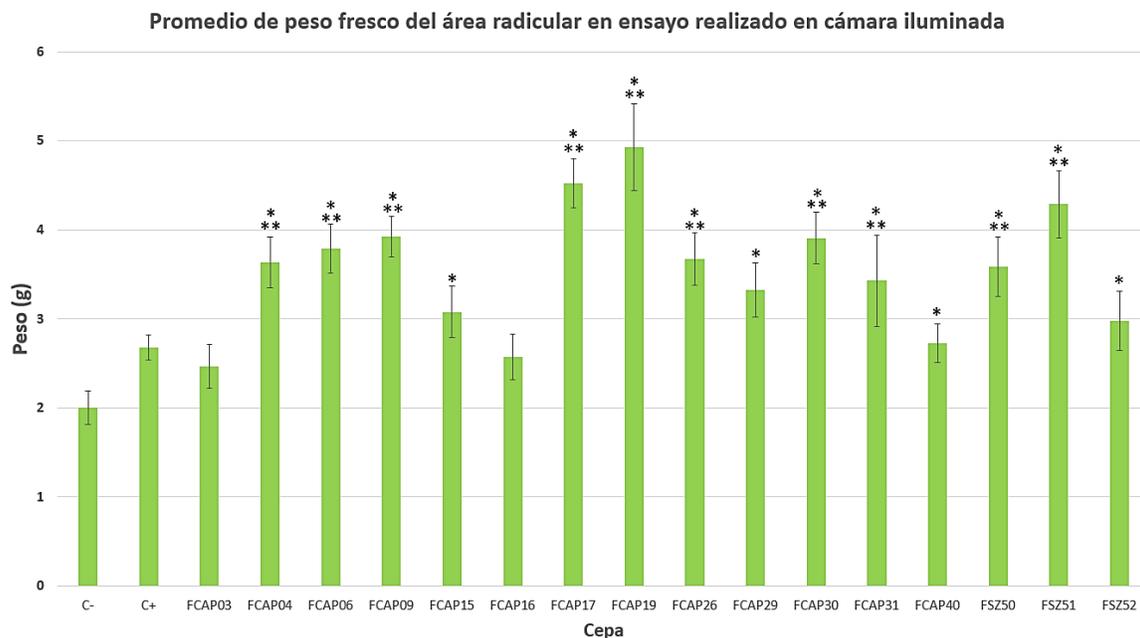


Figura 49. Peso fresco radicular de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

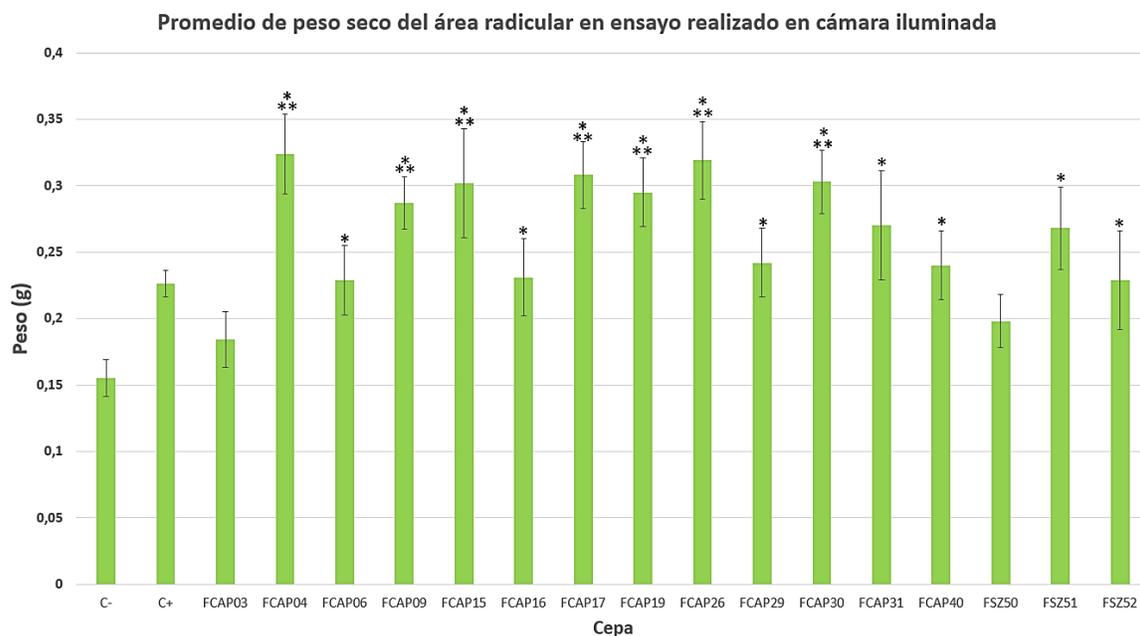


Figura 50. Peso seco radicular de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Barras con * son significativas respecto al control negativo, ** son significativas respecto al control positivo y *** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

2. Evaluación de los nódulos desarrollado en las plantas de *Cicer arietinum* L.

2.1. Cuantificación de número de nódulos de las diversas cepas de *Mesorhizobium*

Como hemos mencionado el N₂ no es asequible para las plantas y son los microorganismos los que lo pueden adquirir ese nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos como nitratos o amoníaco. La carencia de este elemento restringe el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ferguson et al., 2010; Oldroyd et al., 2011), esto lo observamos con los tratamientos del control negativo en las plantas de garbanzo, donde al no añadirle ninguna fuente de nitrógeno y no ser inoculado con ninguna cepa de *Mesorhizobium* carecieron de dicho elemento, lo que afectó su crecimiento y desarrollo. De forma general, estas cepas de *Mesorhizobium* invaden las raíces de las plantas de garbanzo y posteriormente forman unas estructuras llamadas nódulos, y es aquí donde se fija el nitrógeno atmosférico, transformándose en formas asimilables por las plantas. Por consiguiente, evaluaremos si nuestras cepas fueron capaces de inducir la formación de nódulos en las plantas de garbanzo.

Conforme a lo observado en la Figura 51, comparamos la cantidad de nódulos producidos entre las cepas. Cabe destacar que la cepa FCAP 26, la cual fue la cepa que mayor cantidad de nódulos produjo, con una media de 60,2 nódulos, significativamente superior a la segunda cepa en número de nódulos inducidos. Las siguientes cepas en cantidad fueron FCAP 16 y FCAP 03 con 44,9 y 43,7 nódulos, respectivamente. Las siguientes cepas produjeron entre 35 y 40 nódulos por planta como media: FCAP 04, FCAP 09, FCAP 15 y FCAP 40. Entre las cepas inoculadas en las plantas de *Cicer arietinum* L. que desarrollaron una menor cantidad de nódulos están FSZ 52, FCAP 31 y FCAP 50.

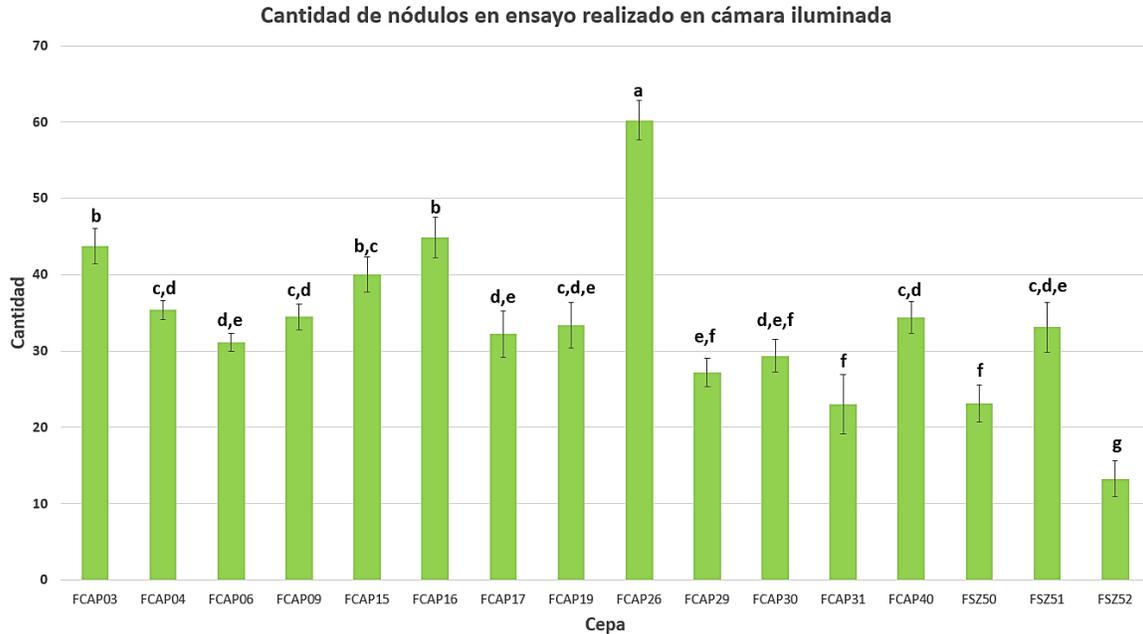


Figura 51. Número de nódulos de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium*. Diferencia en letras representa diferencias significativas a $P < 0,05$.

2.2. Análisis histológico de los nódulos de las cepas de *Mesorhizobium*

A veces la cantidad de nódulos no lo define el desarrollo de la planta, sino la calidad del nódulo. Puede haber cepas capaces de comenzar y desarrollar nódulos y, sin embargo, en éstos podrían ser ineficientes en la fijación de nitrógeno atmosférico (Cruz-González et al., 2017). Así, en este estudio se analizó en primer lugar la coloración de los nódulos inducidos en las plantas de garbanzo por cada una de estas cepas. Coloraciones rosadas, son características de los nódulos en buen estado y posiblemente activos en la fijación de nitrógeno. Esto se debe a la leghemoglobina la cual es una enzima encargada de la secuestro de oxígeno, ya que el complejo de nitrogenasas, enzimas que llevan a cabo la fijación de nitrógeno, son inhibidas por la presencia de oxígeno. Así, secuestrando el oxígeno se evita la inactivación de las nitrogenasas (Udvardi & Poole, 2013; Ott et al., 2005).

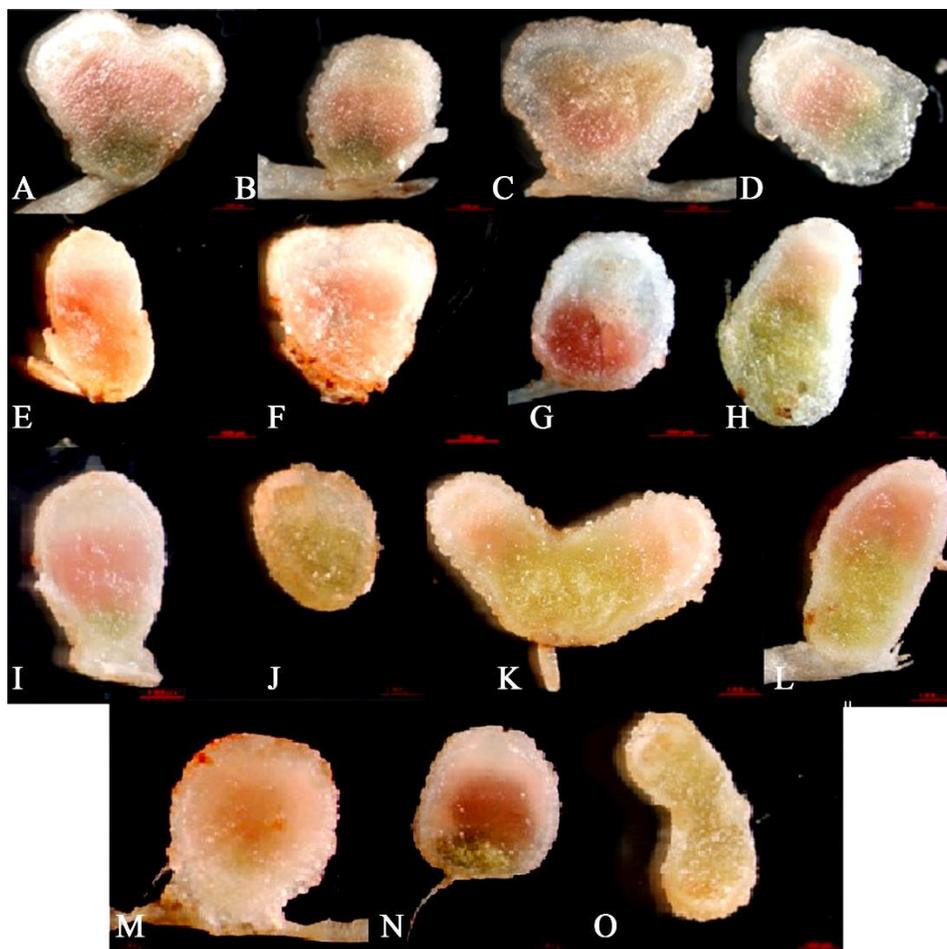


Figura 52. Nódulos de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculadas con diversas cepas de *Mesorhizobium* y visualizamo mediante estereoscopio. A. FCAP 03, B. FCAP 16, C. FCAP 15, D. FCAP 26, E. FCAP 06, F. FCAP 17, G. FCAP 19, H. FCAP 29, I. FCAP 04, J. FCAP 09, K. FCAP 30, L. FCAP 31, M. FSZ 50, N. FSZ 51 y FSZ 52.

Otro factor importante es el conocer a nivel histológico las características de los diferentes grupos de células que componen el nódulo. En el caso de los garbanzos, los nódulos formados se clasifican como nódulos indeterminados (Kantar et al., 2007). Esto significa que las diversas zonas se pueden identificar fácilmente, como se muestra en la Figura 53a. Cada zona tiene su propia función: en primer lugar está la zona meristemática (Figura 53b señalado con una flecha) cuya función es la producción de nuevas células diferenciadas, directamente bajo la zona meristemática destaca un área amplia conocida como zona de invasión (Figura 53b), es en esta área donde llegan los rizobios a través de canales de infección-la Figura 54 muestra diversas imágenes en detalle de ese proceso de invasión y como los microorganismos se van adentrando a la célula-, bajo la zona de invasión se encuentra la zona de fijación, lugar donde se fija el nitrógeno atmosférico (Figura 53c). Por último, se encuentra una zona de senescencia donde se degrada las células vegetales y bacterianas (Figura 53c) (Udvardi & Poole, 2013).

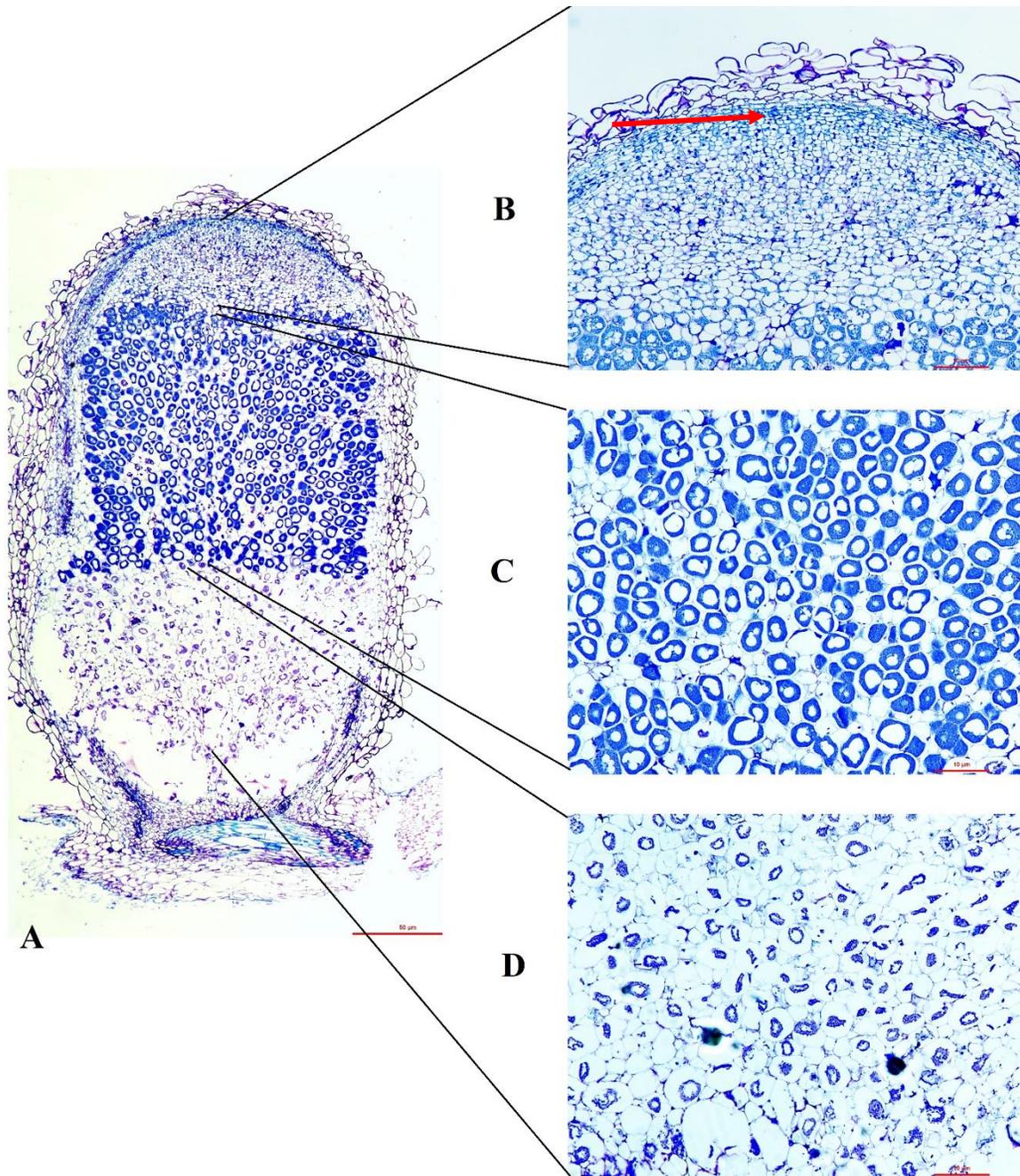


Figura 53. Diversas partes de un nódulo de la cepa FSZ 52. A. estructura completa del nódulo, B. Zona meristemática y zona de infección, C. Zona de fijación de nitrógeno, D. Zona de senescencia. Barra en la figura 53 A representa 50μm y en 53 B-C 10μm.

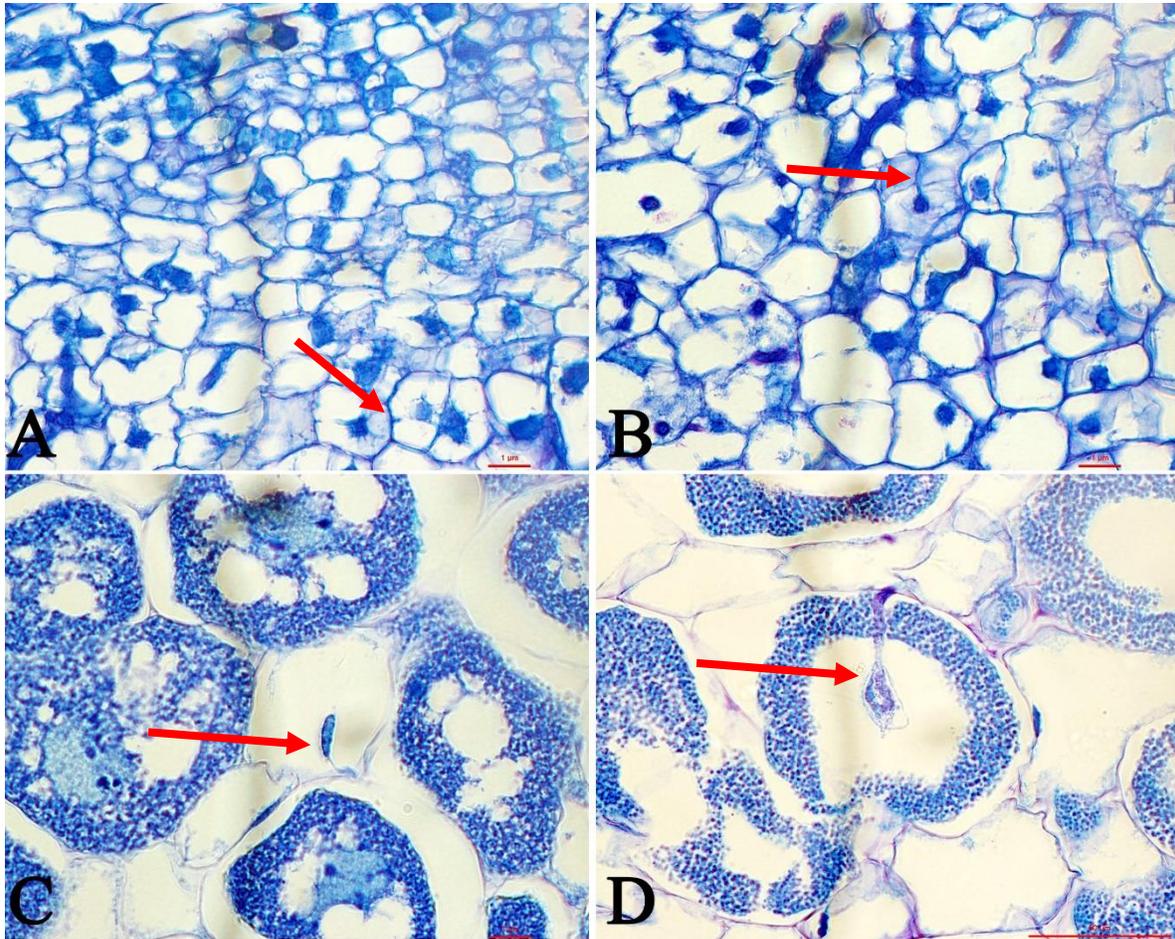


Figura 54. Diversas células en el proceso de infección A y B canales de infección adentrándose a la célula. C y D Llegada de los microorganismos al interior de la célula. A y C perteneciente a las cepas FSZ 51 y B y C cepa FCAP 31.

Conforme a lo observado en los diversos nódulos de las diferentes cepas inoculadas de *Mesorhizobium* y mediante cortes histológicos de 2-3 μ m (Figura 55) confirmamos que todas las cepas fueron capaces de nodular y de manera efectiva. Todos los nódulos mostraron una zona de fijación la cual abarcaba más del 50% de la totalidad de los nódulos. Esta zona de fijación destaca por el azul un poco más intenso en comparación con el resto del nódulo, debido al azul de toluidina que teñía más a las bacterias. Estas bacterias se denominan bacteroides, son las encargadas de la fijación de nitrógeno, además que mantienen una continua división celular, mantenido por un poco más de tiempo que en esa célula vegetal se continúe fijando nitrógeno. La eficiencia en el proceso de fijación de nitrógeno estará determinada por el número de de células nodulares invadidas (Robledo et al., 2011).

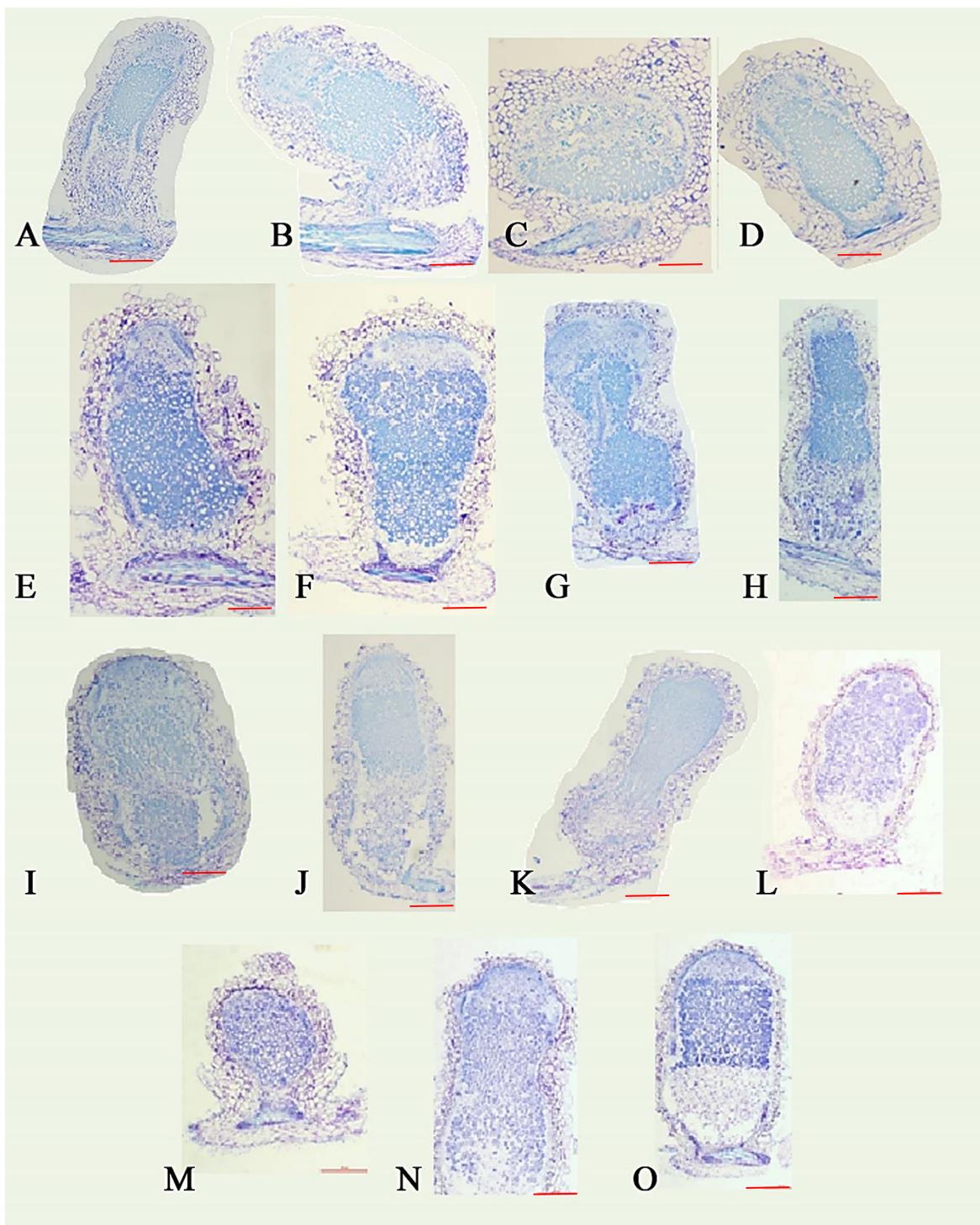


Figura 55. Nódulos de las plantas de *Cicer arietinum* L. inoculada con diversas cepas de *Mesorhizobium* y con un grosor de 2-3 μ m y teñidos con azul de toluidina y visualizados mediante microscopía de luz. A. FCAP 03, B. FCAP 16, C. FCAP 15, D. FCAP 26, E. FCAP 06, F. FCAP 17, G. FCAP 19, H. FCAP 29, I. FCAP 04, J. FCAP 09, K. FCAP 30, L. FCAP 31, M. FSZ 50, N. FSZ 51 y FSZ 52.

Conforme a lo observado en los diferentes árboles filogenéticos, donde nuestras cepas están en diversos clados unos distantes de otros para los diversos genes estudiados (16S rRNA, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *atpD* y la concatenación de los genes *recA* y *glnII*), encontramos que estas 16 cepas su gen *nodC* poseían el biovar *ciceri*. Ahora bien, con los resultados obtenidos confirmamos que todas las cepas de forma independiente son capaces de nodular las plantas de *Cicer arietinum* L. Por tanto, se demuestra la capacidad de las cepas de nodular las plantas de garbanzo tanto con los datos genotípicos ya vistos y ahora con los fenotípicos, a pasar del distanciamiento filogenético entre ellas. Por lo tanto, se demuestra una posible transferencia horizontal de genes. Esto ya se había propuesto por Rivas y colaboradores (2007) para las plantas de garbanzo en la transferencia lateral de genes en las poblaciones de rizobios indígenas tanto de Portugal como España.

3. Ensayo de campo con cepas seleccionadas

3.1. Identificación y resumen de las cepas más competentes

Conforme a los datos determinados hasta el momento, nos propondremos a resumir las mejores cepas según los resultados obtenidos hasta el momento, con el fin de utilizarla en otra serie de estudios más profundos. Las principales cepas de *Mesorhizobium* fueron la FCAP 04 y FCAP 26. En el caso de la FCAP 04, esta cepa destaca por ser la que más contenido de clorofila mostró, incluso fue la única cepa que logró sobrepasar al control nitrogenado. Recordemos que la cantidad de clorofila sirve de indicador indirecto de la fijación de nitrógeno y por consiguiente, el contenido de nitrógeno. Además, esta cepa fue una de las que obtuvo una mayor biomasa radicular. Referente a las pruebas PGPR, ésta fue productora de celulosa, celulasa, sideróforos e IAA, además fue solubilizadora de fosfato.

La otra cepa que destacó fue como ya se mencionó, FCAP 26. La misma mostró el mayor número de nódulos, siendo significativamente superior a todas las demás cepas. Además, fue una de las cepas con mayor biomasa radicular y también aérea. Esta cepa fue capaz de producir celulosa, celulasa, IAA y solubilizadora de fosfato. Tanto la cepa FCAP 04 y FCAP 26 se utilizarán para otros ensayos. Cabe mencionar y destacar otras cepas también podrían ser buenos prospectos para el desarrollo de biofertilizantes como FCAP 31, FSZ 51, FCAP 03, FCAP 17 y FCAP 16.

3.2. Estudio de producción en campo

Conforme a lo ya identificado en las diversas pruebas realizadas hasta ahora se procedió a realizar un ensayo en campo con las cepas FCAP 04 y FCAP 26. Dicho ensayo nos mostrará el comportamiento de las cepas en condiciones agrícolas reales, con especial énfasis en la producción de grano de garbanzo. Este ensayo fue realizado en la localidad de Tardáguila, Salamanca (figura 56), específicamente en una zona donde ya se cultivaba garbanzo y por

consiguiente se entiende que se han establecido ya comunidades microbianas capaces de interactuar con estas plantas.

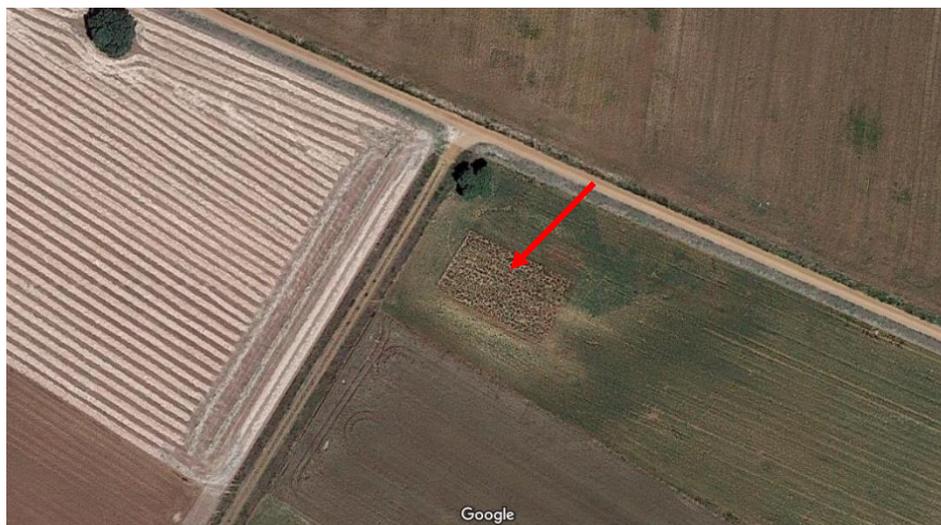


Figura 56. Zona del cultivo de *Cicer arietinum* L. en el ensayo de campo realizado en la zona de Tardáguila, Salamanca (España). La flecha en rojo muestra específicamente la zona donde están cultivadas las plantas. Imagen obtenida de Google maps.

Analizando la producción de garbanzo a nivel de campo, nuestros resultados demuestran que se ha aumentado la producción respecto al control. Los tratamientos fueron un control sin inocular -tal cual como se realiza este cultivo en el campo de forma habitual- y la inoculación, por separado, de las mejores cepas identificadas en este estudio: FCAP 04 y FCAP 26.

En primer lugar, respecto a la cantidad de vainas producidas y el peso de éstas, como observamos en la Figura 57, la cantidad de vainas producidas por las plantas inoculadas con las cepas FCAP 26 y FCAP 04 fue considerablemente superior al control. En este sentido, la cepa FCAP 26 produjo una media de 33 vainas, mientras que la cepa FCAP 04 produjo unas 37 vainas y, en contraste, el control produjo una media de sólo 15 vainas. Por consiguiente, la inoculación de estas cepas prácticamente duplicó la producción de vainas en este ensayo. Cabe mencionar que existen diferencias significativas entre los inóculos utilizados, pues, la cepa FCAP 04 produjo una mayor cantidad de vainas.

Referente al peso de las vainas (Figura 58), observamos que las plantas que recibieron los tratamientos con las cepas de *Mesorhizobium* obtuvieron un mayor peso por planta, ya que éstas tenían una mayor cantidad de vainas, (control con $15 \pm 1,0$, FCAP 26 con $33,1 \pm 1,1$ y FCAP 04 con $37,4 \pm 2,0$). Referente al peso de cada vaina entre los tres tratamientos, no se muestran diferencias considerables entre estas, mostrando una media de 0,37g, 0,39g y 0,37g; para el control, FCAP 26 y FCAP 04, respectivamente.

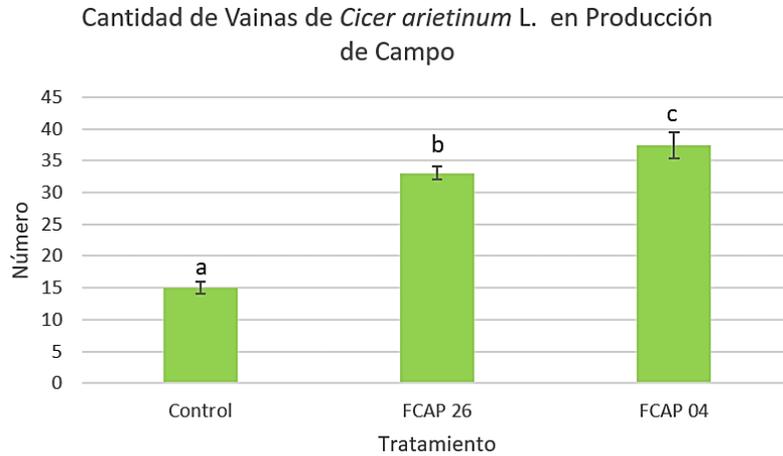


Figura 57. Cantidad de vainas producidas por cada planta de garbanzo en los ensayos de campo.

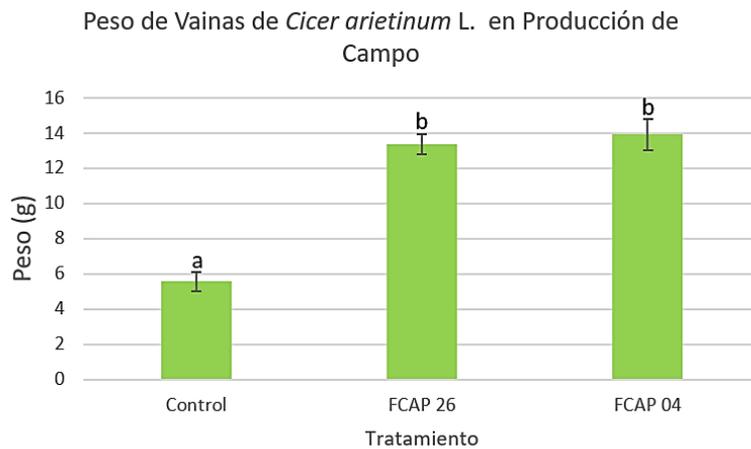


Figura 58. Media de los pesos de las vainas producidas por cada planta de garbanzo en los ensayos de campo.

Ahora bien, analizando la producción de grano (Figura 59) obviamente se observa la misma tendencia que en el número de vainas. Por lo tanto, al tener las plantas del control un menor número vainas, producirán un menor número de semillas. En contraste, ambos inóculos presentaron un mayor número de semillas. Las medias de éstas fueron: 19 semillas para el control, 36 semillas para FCAP 26 y 42 semillas para FCAP 04. Así, al inocular las plantas de garbanzo con la cepa FCAP 26 la producción se incrementó un 47%, mientras que la cepa FCAP 04 produjo un aumento de un 54%, ambos respecto al control. Referente al peso de semillas por planta, se confirma que la inoculación de ambas cepas produce un mayor peso del grano por planta (Figura 60). Ahora bien, conforme al peso medio de cada semilla por tratamiento obtuvimos lo siguiente: en el caso del control, el peso medio de cada semilla fue de 0,23g, en contraste, para los tratamientos inoculados fueron 0,27g,

independientemente de la cepa inoculada. En resumen, la inoculación en campo de las cepas que resultaron ser mejores en los ensayos *in vitro*, logró generar un aumento considerable en la cantidad de semillas de aproximadamente un 50% y, además, el peso por semilla fue levemente superior al control, (Figura 61).

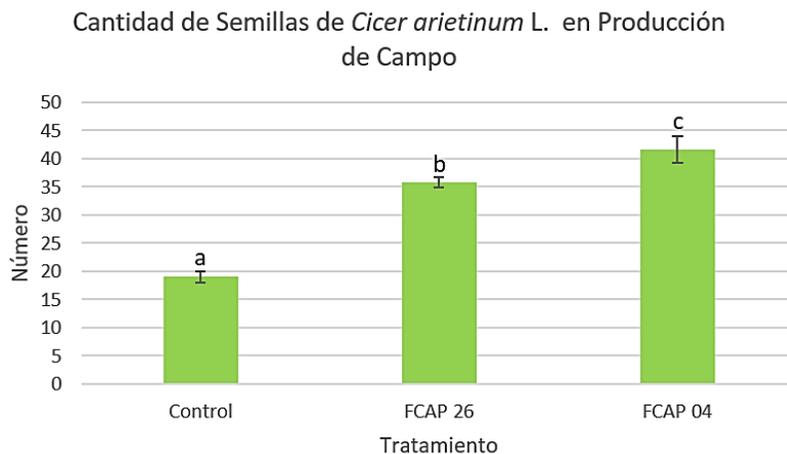


Figura 59. Media de la cantidad de producidas por cada planta de garbanzo en los ensayos de campo.

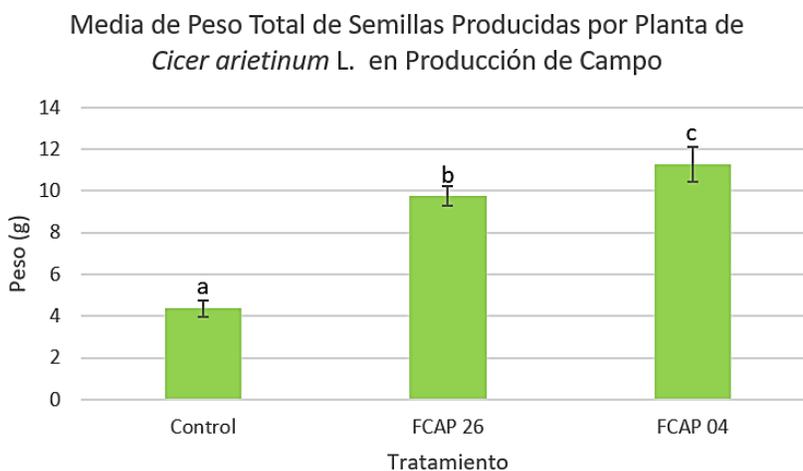


Figura 60. Media del peso total de las semillas producidas por cada planta de garbanzo en los ensayos de campo.

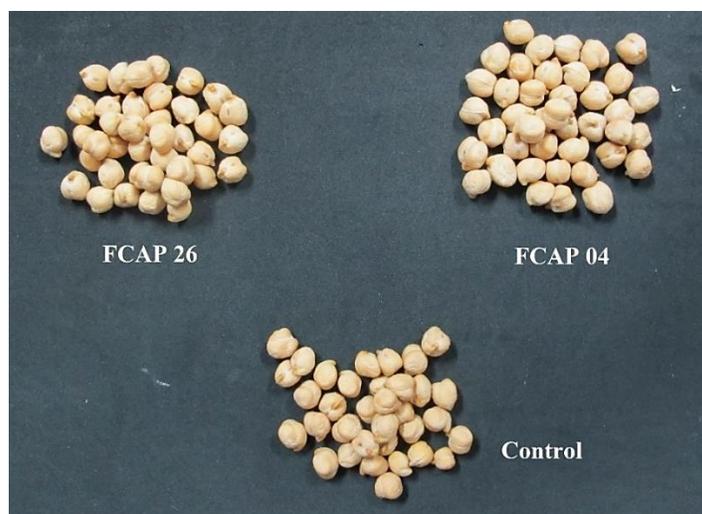


Figura 61. Granos de garbanzos recolectados en el ensayo de campo.

Ahora bien, si analizamos algunos de los elementos nutricionales importantes en el grano de garbanzo, observamos que las cantidades de algunos de éstos fueron significativamente superiores respecto al control. En este sentido, los contenidos en nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, manganeso, sodio y azufre no mostraron diferencias respecto al control. En cambio, las plantas obtenidas con inoculantes mostraron un mayor contenido de carbono, hierro y magnesio. Posiblemente, esto se deba a lo que se ha observado en ensayos anteriores, al poseer una parte aérea más desarrollada puede transformar más CO_2 en fuentes orgánicas de carbono (Carvajal et al., 2014). Además, el poseer un sistema radicular con mayor biomasa puede mejorar la adquisición de algunos elementos presentes en el suelo. Independientemente de que algunos elementos no mostraran significancia superior al control, al menos no fueron significativamente inferiores y, además, se logró aumentar la cantidad de grano por planta.

Tabla 48. Contenido de elementos presentes en los granos de garbanzos cosechados en el ensayo de campo.

Elemento	Control	FCAP 04	FCAP 26
Carbono (g/100g)	43,173±0,009 ^a	43,343±0,009 ^b	43,303±0,01 ^c
Nitrógeno (g/100g)	3,403±0,152 ^a	3,587±0,009 ^a	3,577±0,003 ^a
Fósforo (g/100g)	3,37±0,006 ^a	3,38±0,006 ^a	3,367±0,003 ^a
Potasio (g/100g)	0,912±0,04 ^a	0,981±0,06 ^a	0,962±0,08 ^a
Calcio (g/100g)	0,106±0,003 ^a	0,098±0,02 ^a	0,1±0,006 ^a
Hierro (mg/kg)	38,064±0,003 ^a	42,731±0,012 ^b	41,935±0,007 ^c
Magnesio (g/100g)	0,098±0,004 ^a	0,107±0,004 ^b	0,103±0,007 ^c
Manganeso (mg/kg)	25,354±0,29 ^a	25,449±0,17 ^a	25,533±0,09 ^a
Sodio (g/100g)	0,002±3,512E-4 ^a	0,002±4,933E-4 ^a	0,002±4,410E-4 ^a
Azufre (g/100g)	0,168±0,004 ^a	0,175±0,002 ^a	0,166±0,003 ^a
Zinc(mg/kg)	21,880±0,015 ^a	24,783±0,003 ^a	23,848±0,016 ^a

Evaluación de colonización de las mejores cepas de *Mesorhizobium* y co-inoculaciones con *Bacillus* y su efecto en las plantas de garbanzo en rotación con trigo bajo condiciones de invernadero

CAPÍTULO IV

1. Evaluación de la colonización del sistema radicular en cámara iluminada

1.1. Colonización de las cepas transformadas de *Mesorhizobium* en garbanzo.

Uno de los factores más importantes para conocer el potencial de los microorganismos como potenciadores del crecimiento vegetal es que posean una buena relación con el sistema radicular de la planta. En otras palabras, aunque los microorganismos son capaces de potenciar el crecimiento microbiano, si éstos no son capaces de interactuar con la rizosfera, ese potencial no se aprovecha al máximo ya que esos factores que fomentan el crecimiento vegetal se pierden en el suelo y no son aprovechados por las plantas. Conforme a los resultados que ya hemos mostrado, muchas de las cepas fueron capaces de producir celulosa u otro polisacárido con enlaces β -1,4. Además, algunas fueron capaces producir biofilms *in vitro*. Ahora bien, habrá que confirmar si estos microorganismos son capaces de interactuar y colonizar el sistema radicular de la planta. Para realizar este estudio se procedió a transformar las cepas seleccionadas de *Mesorhizobium*, FCAP 04 y FCAP 26.

Estas cepas de *Mesorhizobium* fueron transformadas genéticamente para la expresión de la proteína roja fluorescente (RFP) e inoculadas en la raíz de las plantas de garbanzo, donde se observó que las mismas fueron capaces de colonizar la superficie radicular de estas plantas, como se muestra en la Figura 62. Conforme a lo observado de forma periódica, independientemente de la cepa, se observa que con el pasar de los días un mayor número de células bacterianas son visualizadas (Figura 62); 6 días post-inoculación (dpi) A-D, versus 9 dpi E-H y 13dpi I-L. Cabe añadir que conforme pasaban los días, un mayor número de algunas características a lo largo del sistema radicular se podía observar de forma más frecuente. Por ejemplo, al observar la colonización a los 6 días se apreciaban muchas células bacterianas a lo largo de las diferentes partes de la raíz de forma independiente. Sin embargo, ya a los 9 días, al evaluar el tejido radicular era más frecuente observar sobre las raíces principales agregados bacterianos, confirmándose directamente en la raíz indicios de posible formación de biofilms, pues, ambas cepas mostraron crear de forma *in vitro* biofilm en placas de PVC. Posteriormente, ya a los 13dpi era más común observar una gran cantidad de bacterias en las zonas adyacentes a los pelos radiculares. Referente a la colonización, ninguna de las cepas FCAP 04 ni FCAP 26 destacó una sobre la otra.

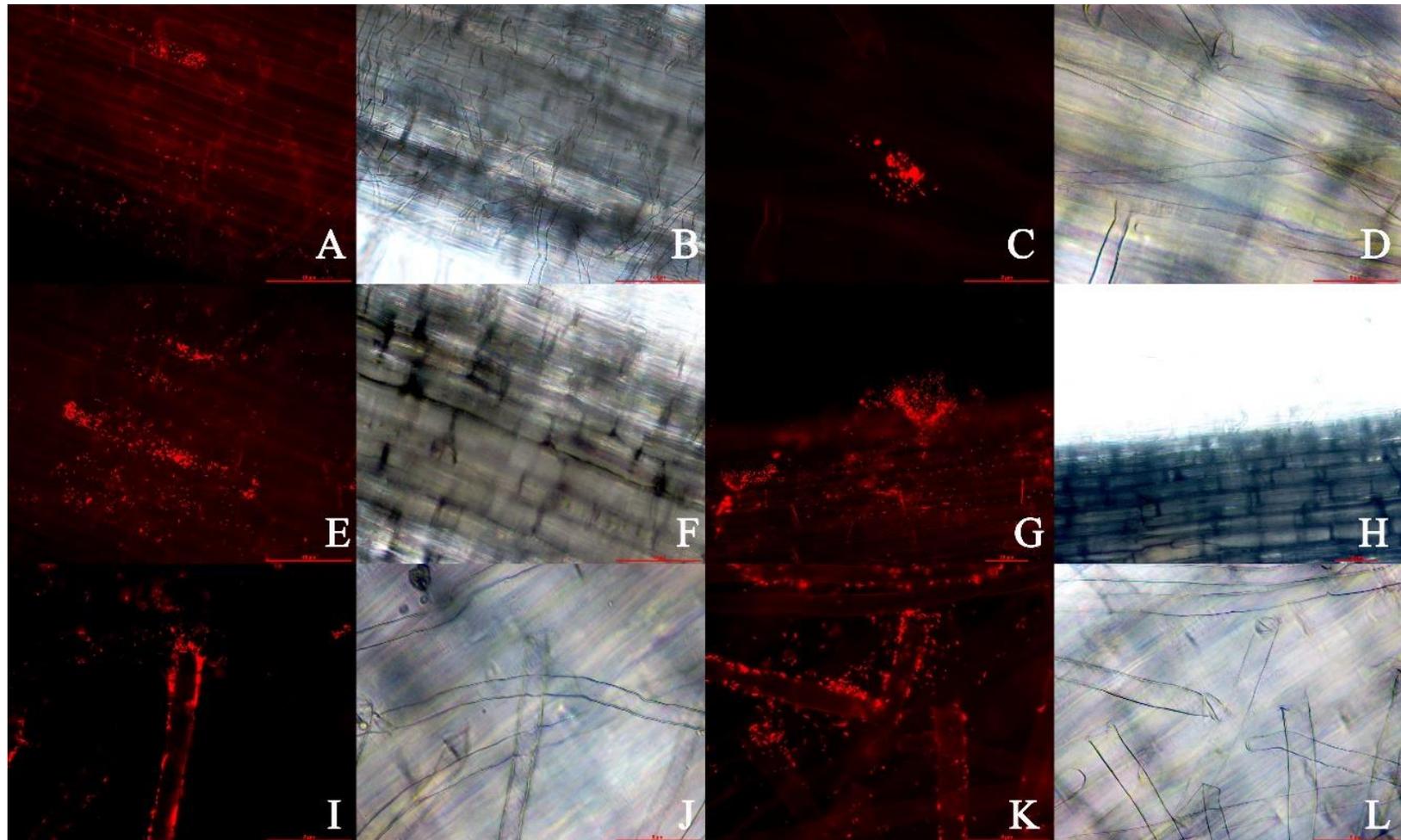


Figura 62. Colonización de las cepas de *Mesorhizobium* sp en raíces de garbanzo. A los 6 días post-inoculación: A, B, C, D; a los 9 días post-inoculación: E, F, G, H; y a los 13 días post-inoculación: I, J, K, L. A-B, C-D, E-F, G-H, I-J y K-L representan la misma imagen mostrada mediante microscopía de fluorescencia y de luz visible, respectivamente. Las micrografías correspondientes a la cepa FCAP 04 son A, B, E, F, I y J. Las micrografías correspondientes a la cepa FCAP 26 son C, D, G, H, K y L.

1.2. Colonización de las cepas transformadas de *Mesorhizobium* en trigo

No resulta de extrañar que cepas de *Mesorhizobium* sp. aisladas de garbanzo sean capaces de colonizar el área radicular de garbanzo. Sin embargo, como ya se ha mencionado, en muchas veces los agricultores rotan los cultivos de leguminosas con cereales. Por lo tanto, en este estudio se evaluó la capacidad de las cepas *Mesorhizobium* FCAP 04 y *Mesorhizobium* FCAP 26 de colonizar la raíz de plántulas de trigo.

Analizando la Figura 63 observamos que ambas cepas fueron capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas de trigo. Desde los 6 días ya se observaba la presencia considerable de bacterias en prácticamente todas las áreas del sistema radicular de esta planta. Cabe destacar que en los pelos radiculares se acumulaba con el pasar de los días una gran cantidad de unidades bacterianas (Figura 63 I-L). . Ambas cepas presentaban una capacidad similar de colonización de las raíces de trigo.

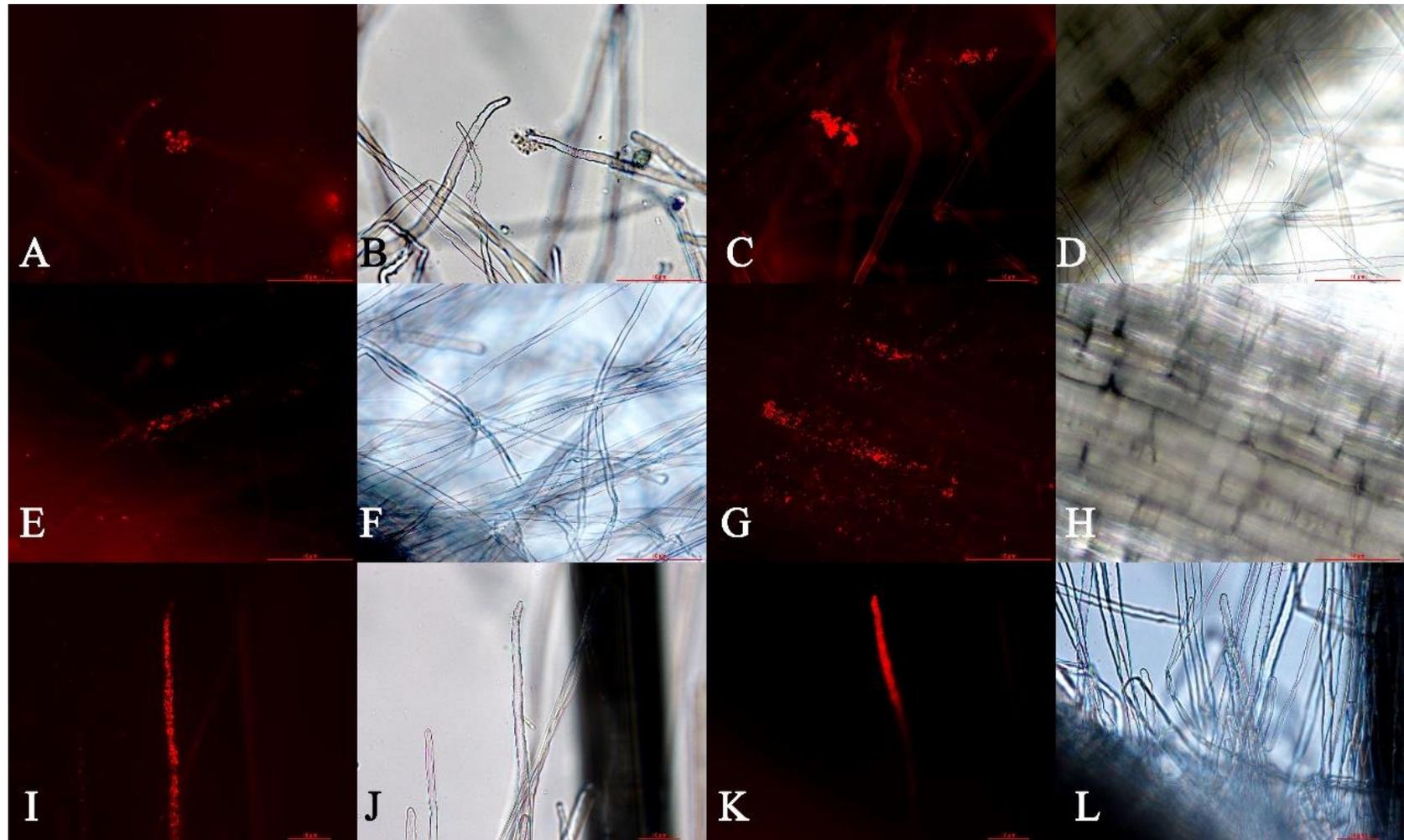


Figura 63. Colonización de las cepas de *Mesorhizobium* sp en raíces de trigo. A los 6 días post-inoculación: A, B, C, D; a los 9 días post-inoculación: E, F, G, H; y a los 13 días post-inoculación: I, J, K, L. A-B, C-D, E-F, G-H, I-J y K-L son la misma imagen mostrada mediante microscopía de fluorescencia y de luz, respectivamente. Las micrografías correspondientes a la cepa FCAP 04 son A, B, E, F, I y J. Las micrografías correspondientes a la cepa FCAP 26 son C, D, G, H, K y L.

1.3. Colonización de *Mesorhizobium* coinoculadas con *Bacillus* en garbanzo y trigo

Además de las cepas de *Mesorhizobium*, otras cepas de este estudio identificadas como otros géneros mostraron una buena capacidad como PGPR *in vitro*. Por lo tanto, se realizó una co-inoculación de las cepas de *Mesorhizobium* con las cepas *Bacillus* FSZ 43 y *Bacillus* FSZ 47.

En el caso de cepa FSZ 43, destacó por ser una de las mejores cepas de la totalidad de los 95 endófitos aislados en producción de celulosa y IAA. Además, fue uno de los mayores solubilizadores de fosfato dentro de las cepas del género *Bacillus*.

Por otra parte, la cepa FSZ 47 fue positiva en producción de celulasacelulosa, solubilización de fosfato y producción de IAA.

Al analizar la capacidad de colonización de las cepas de *Mesorhizobium* sp (FCAP 04 o FCAP 26) en las diversas combinaciones con *Bacillus* sp (FSZ 43 o FSZ 47) en del sistema radicular de garbanzo, se observó una buena capacidad de colonización.

En la Figura 64 se aprecia, al observarse las células bacterianas emitiendo la fluorescencia roja, la colonización de manera eficiente de las cepas de *Mesorhizobium* FCAP 04 (Figura 64A, 64C) y FCAP 26 (Figura 64E, 64G). De igual forma se observa fluorescencia verde al marcar las células de *Bacillus* por inmunohistoquímica (FSZ 43 o FSZ 47). Cabe mencionar que al inocular la cepa de *Mesorhizobium* FCAP 26 con el *Bacillus* FSZ 47 se observó una mayor cantidad de agregados celulares de *Mesorhizobium* mostrando un mayor número de biofilms. Al inocular las cepas de *Bacillus* sola, FSZ 43 (Figura 64I) o FSZ 47 (Figura 64J), las mismas son también capaces de colonizar el sistema radicular el sistema radicular de *Cicer arietinum* L de forma independiente.

En resumen, no se observa una interacción antagónica entre las cepas con buen potencial PGPR y ambas son capaces de colonizarla tanto de forma independiente como juntas. Por lo tanto, al ambas poseer un buen potencial PGPR *in vitro* y de colonizar la rizosfera se podría aprovechar su potencial para fomentar el crecimiento en garbanzo.

Similar a lo descrito en el párrafo anterior para garbanzo fue lo observado en trigo. Entre las cepas seleccionadas de *Mesorhizobium* sp. y *Bacillus* sp. no se observó antagonismo. En otras palabras, las diferentes combinaciones de las cepas entre ambas especies lograron colonizar el sistema radicular de las plantas de trigo, como se observa en la Figura 65.

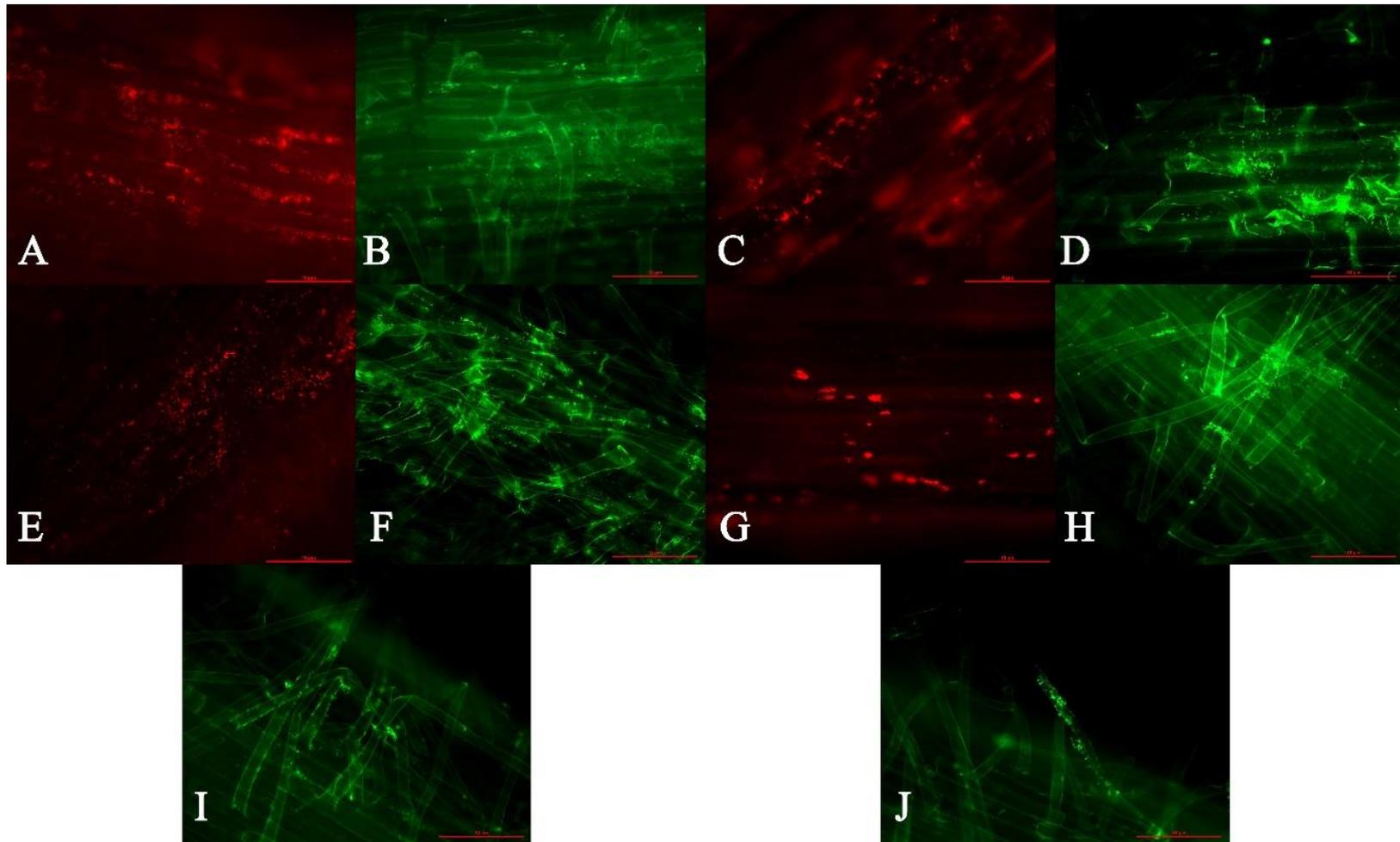


Figura 64. Colonización del sistema radicular de garbanzo, mediante co-inoculaciones de *Mesorhizobium* sp. FCAP 04 o FCAP 26 (transformadas mediante RGF) y *Bacillus* sp. FSZ 47 o FSZ 43 (marcada mediante inmunofluorescencia). A y B FCAP 04 + FSZ 43; C y D FCAP 04 + FSZ 47; E y F FCAP 26 + FSZ 43; G y H FCAP 26 + FSZ 47; I FSZ 43; J FSZ 47.

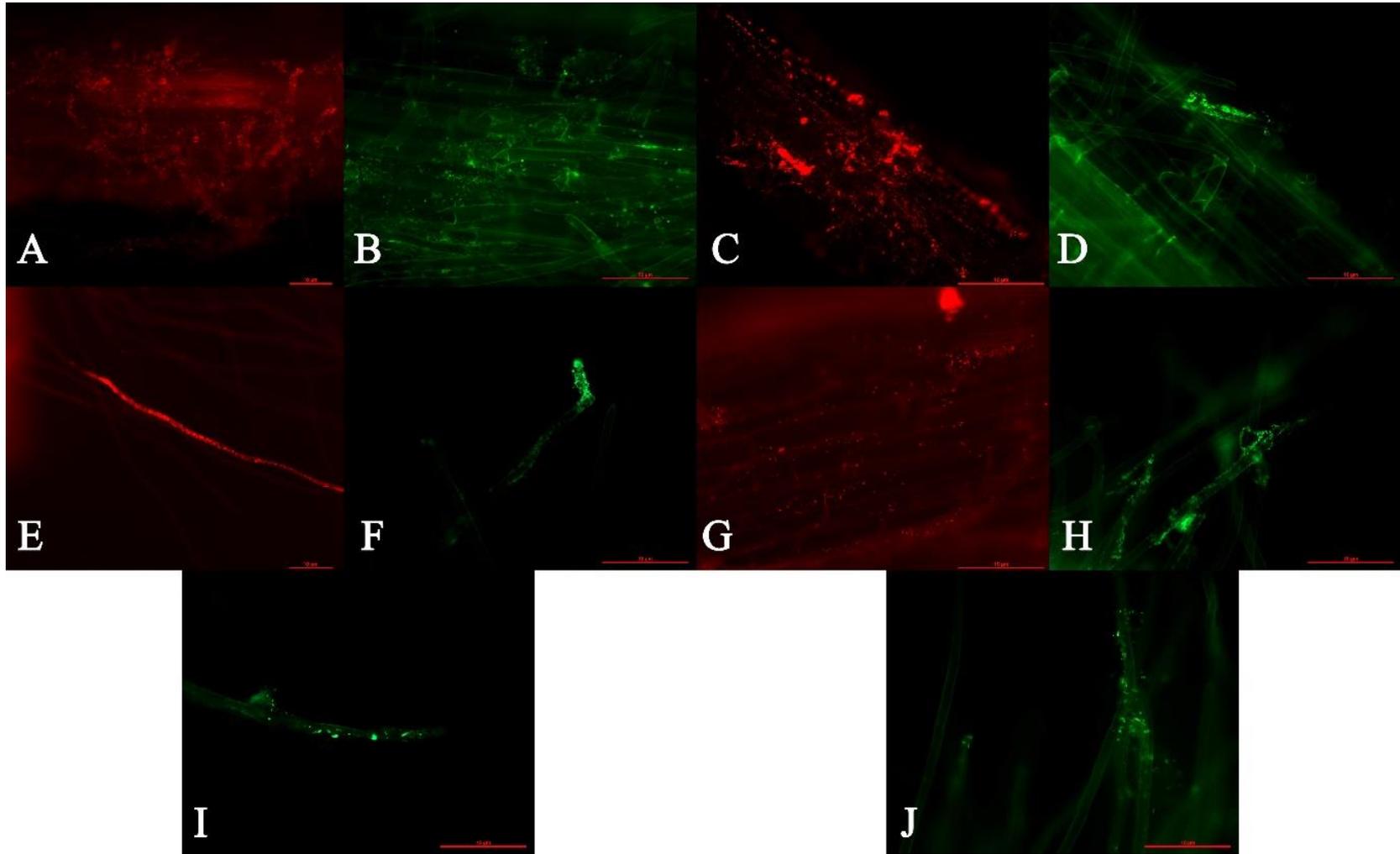


Figura 65. Colonización del sistema radicular del trigo, mediante co-inoculaciones de *Mesorhizobium* sp. FCAP 04 o FCAP 26 (transformadas mediante RGF) y *Bacillus* sp. FSZ 47 o FSZ 43 (marcada mediante inmunofluorescencia). A y B FCAP 04 + FSZ 43; C y D FCAP 04 + FSZ 47; E y F FCAP 26 + FSZ 43; G y H FCAP 26 + FSZ 47; I FSZ 43; J FSZ 47.

2. Ensayo de Invernadero con co-inoculaciones.

2.1. Crecimiento y desarrollo de las plantas de garbanzo con las diferentes inoculaciones.

Una vez identificado el potencial PGPR de algunas de las cepas y confirmar su capacidad de colonización del sistema radicular, tanto en plantas de garbanzo como trigo, se procedió a realizar un ensayo de promoción del crecimiento vegetal en invernadero. Dicho ensayo consistió en cultivar plantas de garbanzo en macetas y cuando éstas llegaron a producción se cosecharon y se procedió a cultivar plantas de trigo en esas macetas hasta llegar también a la producción del grano. A diferencia de los ensayos realizados en cámara iluminada, donde el objetivo principal era evaluar si las diferentes cepas de *Mesorhizobium* eran capaces fijar nitrógeno de forma simbiótica con garbanzo utilizando vermiculita estéril, en esta ocasión el sustrato no estaba estéril. Además de inocular las 2 mejores cepas de *Mesorhizobium* (FCAP 04 y FCAP 26), también se probó la efectividad con las dos cepas de *Bacillus* (FSZ 43 y FSZ 47) que mostraron buen potencial PGPR.

En primer lugar, evaluaremos el crecimiento alcanzado por las plantas de garbanzo. Analizando la Figura 66 observamos la media de la longitud de las plantas de garbanzo, donde destaca el tratamiento de la cepa FCAP 26 inoculada junto a la FSZ 47, así como la co-inoculación de las cepas FCAP 26 + FSZ 43 y la cepa FSZ 43 sola. Estos tres tratamientos produjeron plantas de garbanzos con longitudes significativamente mayores respecto a los demás tratamientos.

Cabe mencionar que la altura no necesariamente refleja la biomasa de las plantas. En este sentido, para poder cuantificar la biomasa aérea en otros experimentos, procedimos a la recolección y secado de la misma pero, como estas plantas se querían llevar a producción de grano, esto no fue posible, ya que al recolectar el grano una gran parte de las hojas se pierden ya que la planta está seca. No obstante, la Figura 67 muestra algunos de los tratamientos una vez ya han generado las vainas y aun las plantas no se han secado para visualizar la biomasa aérea. En esta imagen se aprecia la diferencia entre el control negativo y los demás tratamientos.

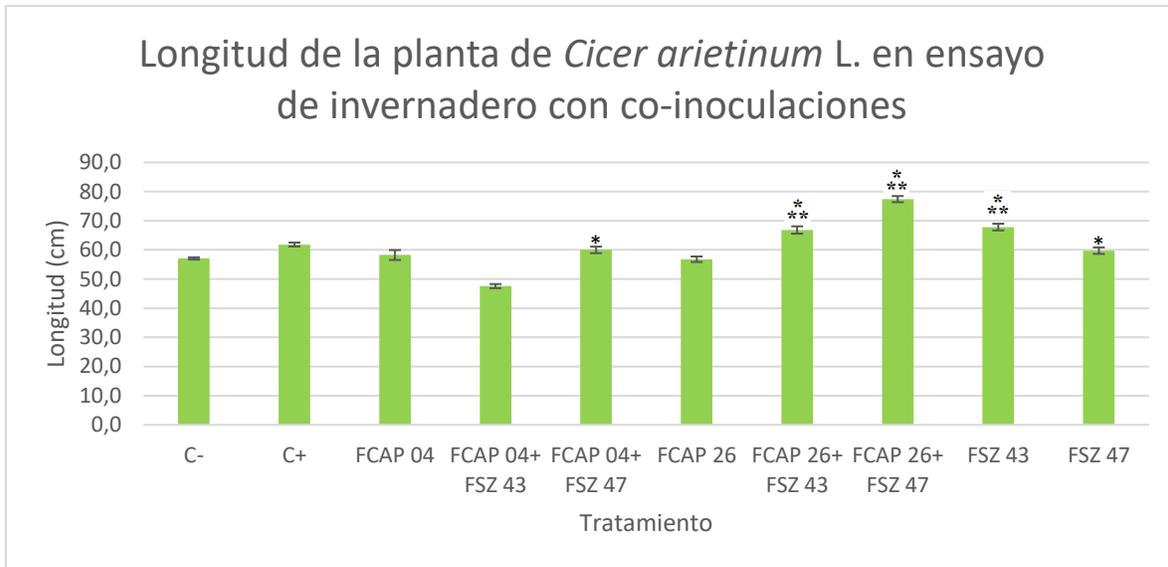


Figura 66. Media en longitud en plantas de garbanzo alcanzado a los 3 meses con diferentes inoculaciones y co-inoculaciones. Barras con * son significativas respecto al control negativo, y ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

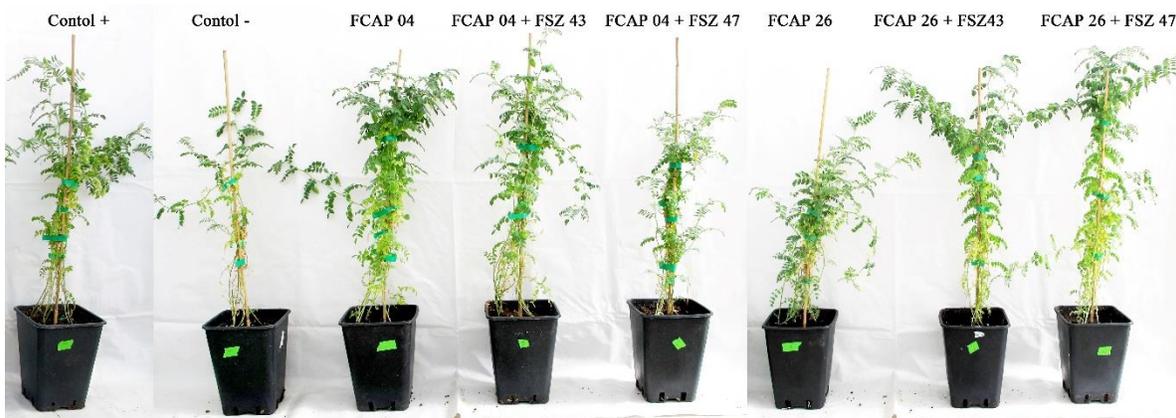


Figura 67. Plantas de *Cicer arietinum* L. en invernadero con diversas inoculaciones y co-inoculaciones.

Referente al contenido de clorofila (Figura 68), las plantas con mayor contenido de esta sustancia en sus hojas fueron las inoculadas con los tratamientos FCAP 24, FCAP 26 + FSZ 43 y FCAP 26 + FSZ 47.

Ahora bien, lo más destacable de esta parte del ensayo era evaluar la cantidad de granos producidos por planta de garbanzo. En este sentido, se observaron diferencias sustanciales entre los tratamientos (Figura 69). El más destacable de todos lo mostró la co-inoculación de la cepa FCAP 26 de *Mesorhizobium* y la FSZ 47 de *Bacillus*. Dicho tratamiento mostró una media de 14 garbanzos por planta. Los otros tratamientos que más garbanzos produjeron fueron FCAP 26 + FSZ 43, FCAP 04 con 7 y 6 garbanzos respectivamente, en contraste el

control positivo tuvo 6. Recapitulando, analizando los resultados de los mayores productores de grano vemos con notable diferencia la co-inoculación FCAP 26 + FSZ 47 sobre todos los tratamientos. Por consiguiente, se puede determinar la efectividad de esta combinación para fomentar la producción del grano de garbanzo.

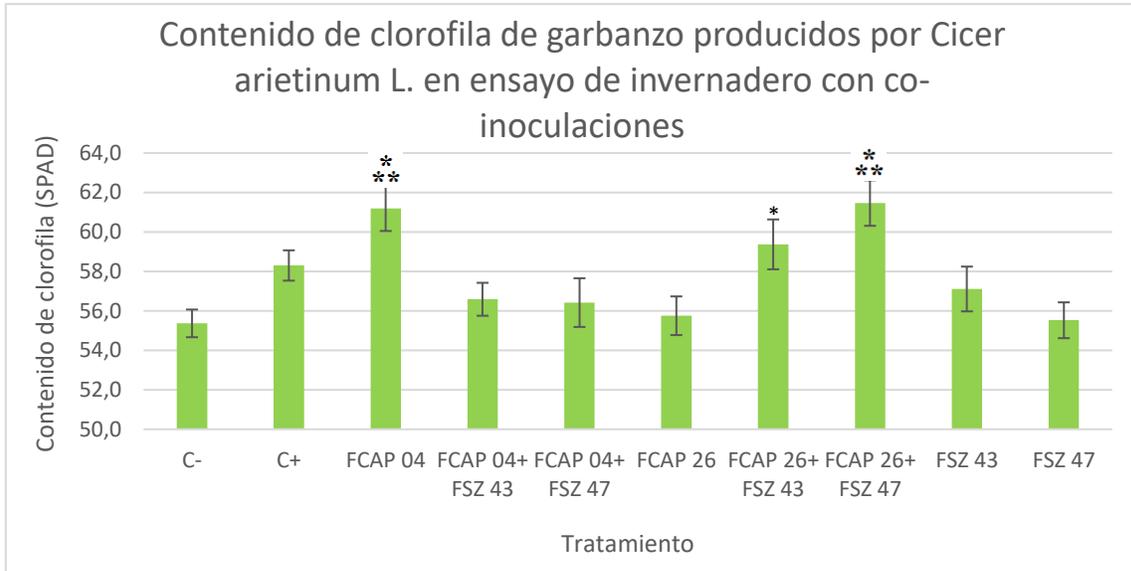


Figura 68. Contenido en clorofila en plantas de garbanzo con diferentes inoculaciones y co-inoculaciones. Barras con * son significativas respecto al control negativo y ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

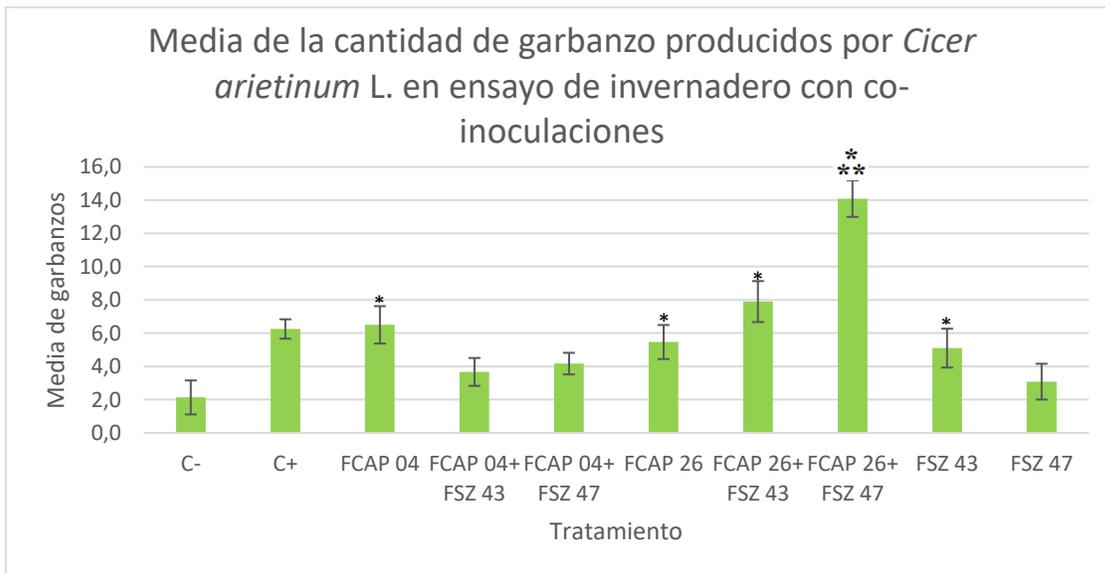


Figura 69. Media de granos de garbanzo por planta con diferentes inoculaciones y co-inoculaciones. Barras con * son significativas respecto al control negativo y ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

2.2. Desarrollo y producción de las plantas de trigo con las diferentes inoculaciones.

Una vez recolectados los granos de garbanzo, se procedió a sacar la planta de la maceta, dejando únicamente el sistema radicular en el suelo y algunas de las hojas se fueron desprendiéndose de la planta de garbanzo mientras ésta se secaba. Posteriormente las semillas pregerminadas de trigo fueron sembradas en ese suelo a fin de evaluar su producción. Respecto a la longitud de las plantas, (Figuras 70 y 71), no se observaron diferencias significativas respecto a los controles ni entre las diversas inoculaciones y co-inoculaciones. De igual forma, tampoco se muestran diferencias significativas entre los tratamientos respecto al número de granos de trigo (Figura 72). Existe la posibilidad de que en una sola rotación no se acumularan los suficientes elementos para generar una diferencia significativa que se reflejara físicamente en las plantas inoculadas con dichas cepas. También, otra posible explicación es que al realizarse este ensayo en invernadero y las plantas al estar cultivadas en macetas y llevarlas hasta la fase final de producción encontraran todos los mínimos nutrientes que necesitasen y por tanto se igualaron las plantas. Muchos estudios realizados bajo diversas condiciones, relacionados con la rotación de garbanzo con trigo en condiciones de campo tienden a ser estudios que toman varios años. Por ejemplo, existen estudios donde este tipo de trabajo referente a la rotación de garbanzo-trigo han tardado entre 2 y 6 años (Hemmat et al., 2004; López-Bellido et al., 2001; Fu, 2000; López-Bellido & López-Bellido, 2001; Aslam et al., 2003; Danga et al., 2010). Por consiguiente, sería necesario realizar un mayor número de rotaciones a fin de identificar si las inoculaciones de estas cepas son capaces de comenzar a bioacumular ciertos elementos en el suelo hasta alcanzar cantidades considerables que se reflejen principalmente en la producción de granos de trigo.

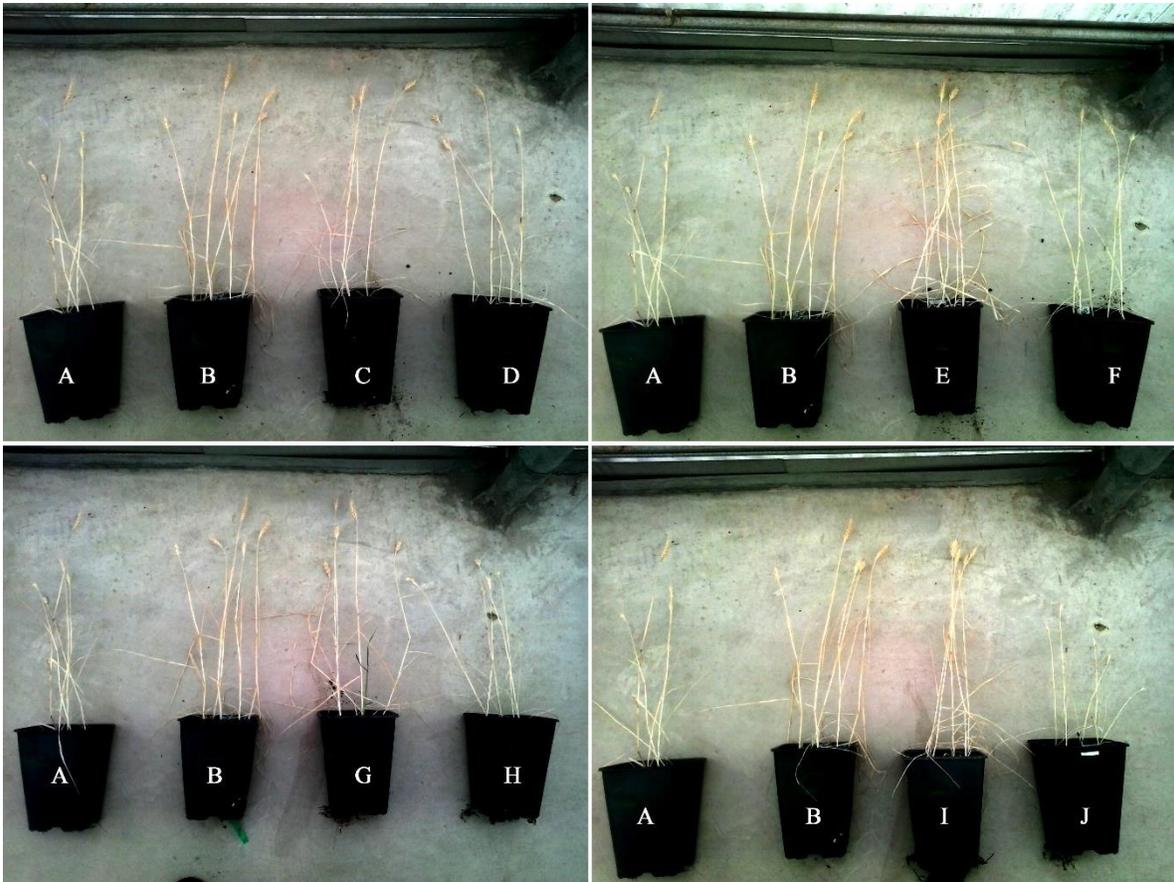


Figura 70. Plantas de *Triticum aestivum* L. en invernadero con diversas inoculaciones y coinoculaciones. A. Control negativo, B. Control positivo, C. FCAP 04, D. FCAP 26, E. FCAP 04 + FSZ 43, F. FCAP 04 + FSZ 47, G. FCAP 26 + FSZ 43, H. FCAP 26 + FSZ 47, I. FSZ 43 y J. FSZ 47.

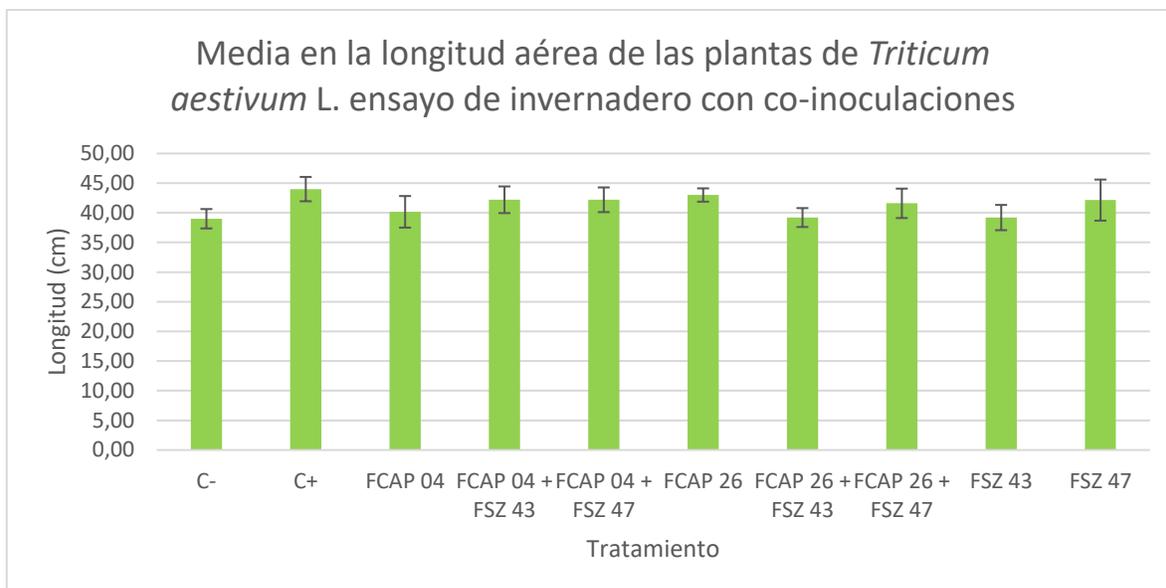


Figura 71. Media en longitud en plantas de trigo alcanzado al momento de la cosecha con diferentes inoculaciones y co-inoculaciones.

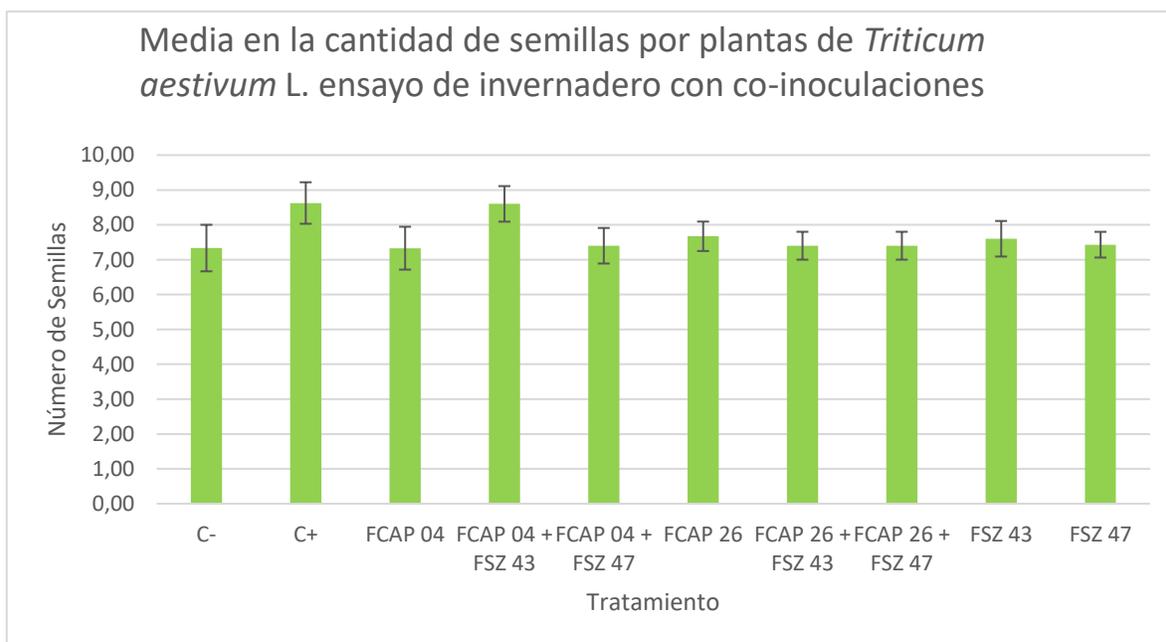


Figura 72. Media en cantidad de granos de trigo por planta cosechada con diferentes inoculaciones y co-inoculaciones.

2.3. Análisis nutricional de producción de granos de garbanzo y trigo que fueron rotados.

Para concluir con el estudio del efecto sobre las plantas con los distintos inoculantes del estudio, se se procedió a determinar el contenido nutricional de algunos elementos importantes de los granos de garbanzo. A pesar de que no se hubieran visto diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control en las plantas de trigo ni en su producción al ser rotadas con garbanzo, también los granos de trigo se sometieron a este análisis con el objetivo de observar si se puede determinar algún cambio en el contenido de nutricional, con las diferentes co-inoculaciones.

En primer lugar, comencemos analizando el contenido de algunos elementos de los granos de garbanzo. Conforme a lo observado en la tabla 49, no se observó diferencias significativas en el contenido de carbono, nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y azufre respecto a los controles. Ahora bien, referente al contenido de fósforo, se observó un incremento en la cantidad de este elemento en todos los inoculantes junto con el control positivo (el cual contenía este elemento en su formulación), respecto al control sin inocular y sin fertilizante. Como ya se ha mencionado, todas las cepas empleadas en estos ensayos eran capaces de solubilizar fosfatos y, como también se ha comentado, existen en el suelo varias formas de fosfato de las cuales algunas son formas no disponibles para las plantas (Hardoim et al., 2012; Khan et al., 2014). Por tanto, es posible que en este caso el fosfato insoluble del suelo haya sido inmovilizado por las cepas inoculadas, lo que puede reflejarse en su contenido en los granos de garbanzo superior al de los controles sin inocular.

Además del fósforo, hubo otros elementos que aumentaron su contenido en comparación de con el control negativo. En primer lugar, tenemos el contenido de hierro, el cual, en el caso de compararlo con el control negativo, fue significativamente superior con todos los inoculantes, incluso tres de las co-inoculaciones, FCAP 04, FCAP 26 + FSZ 43 y FSZ 43, igualaron la cantidad de hierro en grano de garbanzo al control positivo.

Para el manganeso también se observaron diferencias entre los distintos tratamientos. En este caso, los siguientes co-inoculantes que aumentaron de forma significativa el contenido en este elemento químico fueron FCAP 04, FCAP 04 + FSZ 43, FCAP 04 + FSZ 47, FCAP 26 + FSZ 43, FSZ 43 y FSZ 47.

Referente al contenido de zinc, éste también aumentó significativamente con los inoculantes junto con el control positivo, en comparación con el control negativo. En este elemento destacaron las cepas FCAP 04, FSZ 43 y FSZ 47.

Se ha realizado un estudio en garbanzo donde se ha analizado la interacción entre el hierro y manganeso, donde puede afectar sus aplicaciones en suelo calcáreo, pues la aplicación de fuentes inorgánicas de hierro no es efectiva en este tipo de suelo y el añadir la forma quelato de hierro puede reducir el rendimiento de los cultivos por la disminución de la disponibilidad de ciertos nutrientes, incluido el manganeso. El añadir Fe o Mn puede también interferir en la absorción de otros elementos por parte de la planta, como cobre y zinc. En resumen, la alteración por la adición de algunos elementos externo puede alterar o interferir

en otros elementos (Ghasemi-Fasaei et al., 2005). Por lo tanto, si estamos identificando un aumento de algunos de estos elementos en este trabajo, favoreciendo el contenido nutricional del grano de garbanzo sin afectar a otro, ya que ninguno fue inferior al control negativo, se puede determinar la eficacia de algunas de estas cepas en las plantas de garbanzo.

Con relación a la composición nutricional de los granos de trigo, hubo ciertos elementos que no mostraron diferencias entre los inóculos y los controles, tal fue el caso del potasio, calcio, magnesio, sodio y azufre. En contraste, existen otros elementos en los cuales sí se observaron diferencias significativas, principalmente al ser comparadas con el control negativo.

Por ejemplo, los gramos de trigo que mostraron un mayor contenido de carbono fueron principalmente los de los inóculos FCAP 04 y FCAP 04 + FSZ 47, en los cuales incluso se superó la cantidad de los granos del control fertilizado. Cabe añadir que los siguientes tratamientos igualaron el control fertilizado: FCAP 04 + FSZ 43, FSZ 43 y FCAP 26 + FSZ 43.

También se identificaron diferencias en el contenido de nitrógeno acumulado en relación con el control negativo, principalmente en los granos de las plantas inoculadas con las cepas FCAP 26 + FSZ 43.

Asimismo, se observó un incremento significativo en la cantidad de fósforo, donde todos los tratamientos exceptuando la inoculación FSZ 47 mostraron mayores valores que el control sin inoculación.

En el caso del hierro, los siguientes inoculantes fueron mejores que ambos controles utilizados; FCAP 04, FCAP 04 + FSZ 47, FCAP 26 y FSZ 43.

Para el manganeso las mejores cepas fueron FCAP 04, FCAP 04 + FSZ 47, FCAP 26, FCAP 26 + FSZ 47 y FSZ 43.

Por último, prácticamente todos los inóculos bioacumularon un contenido mayor de Zn en los granos de trigo respecto al control negativo, siendo FCAP 04, FCAP 04 + FSZ 47, FCAP 26, FCAP 26 + FSZ 43, FSZ 43 y principalmente la co-inoculación FCAP 26 + FSZ 47.

En resumen, a pesar de que en esta primera rotación no se observaron diferencias significativas en la cantidad de semillas producidas conforme a los diferentes tratamientos, algunos elementos sí mostraron un aumento significativo al inocularlos con algunas de nuestras cepas.

Tabla 49. Contenido de elementos presentes en los granos de garbanzos cosechados en el ensayo de invernadero.

Tratamiento	C (g/100g)	N (g/100g)	P (g/100g)	K (g/100g)	Ca (g/100g)	Fe (mg/kg)	Mg (g/100g)	Mn (mg/kg)	Na (g/100g)	S (g/100g)	Zn (mg/kg)
Control Negativo	43,74±0,2a	3,24±0,7a	0,33±0,01 2a	0,98±0,26 9a	0,07±0,02 a	51,5±2,12a	0,11±0,015a	23,7±0,6b	0,005±0,002a	0,16±0,2a	27,76±1,261a
Control Positivo	43,57±0,3a	3,32±0,6a	0,4±0,03b	1,11±0,2a	0,07±0,02 a	73,27±5,54 b	0,13±0,012a	19,68±2,15a	0,009±0,002b	0,21±0,2a	39,19±2,015c
FCAP 04	43,81±0,9a	3,25±0,64 a	0,39±0,02 b	1,12±0,22 3a	0,07±0,01 a	68,91±5,05 6b	0,13±0,007a	25,11±0,15c	0,009±0,002b	0,21±0,2a	39,31±3,102c
FCAP 04 + FSZ 43	43,67±0,3a	3,49±0,4a	0,39±0,03 b	1,12±0,21a	0,08±0,02 a	63,81±6,02c	0,13±0,006a	22,77±1,02b	0,007±0,002a ,b	0,18±0,03a	35,09±3,257b
FCAP 04 + FSZ 47	43,60±0,18 a	3,81±0,6a	0,38±0,01 b	1,16±0,21 2a	0,09±0,04 a	57,83±6,31c	0,13±0,012a	24,06±1,071b ,c	0,005±0,002a	0,17±0,2a	36,88±2,525b
FCAP 26	43,59±0,7a	3,76±0,65 a	0,41±0,03 b	1,24±0,27a	0,06±0,05 a	61,85±4,06 4c	0,12±0,003a	21,16±0,058a	0,006±0,001a ,b	0,18±0,11a	35,31±3,026b
FCAP 26 + FSZ 43	43,62±0,26 a	3,51±0,42 a	0,39±0,03 b	1,15±0,32 7a	0,08±0,03 a	68,26±5,22 b	0,14±0,015a ,b	23,86±0,5b	0,006±0,002a ,b	0,21±0,2a	37,39±2,438b ,c
FCAP 26 + FSZ 47	43,51±0,9a	3,34±0,5a	0,38±0,01 b	1,04±0,26 4a	0,07±0,02 a	62,80±5,46 1c	0,12±0,006a	21,06±0,071a	0,005±0,002a	0,19±0,12 3a	33,68±4,025b
FSZ 43	43,57±0,7a	2,95±0,9a	0,39±0,03 b	1,14±0,23 2a	0,08±0,03 a	77,52±1,29 8d	0,13±0,007a	25,21±0,046c	0,008±0,003a ,b	0,21±0,2a	41,60±2,188c
FSZ 47	43,57±0,6a	3,29±0,79 a	0,38±0,02 b	1,2±0,212a	0,07±0,01 a	68,56±5,17 7b	0,13±0,012a	24,19±1,04b, c	0,005±0,002a	0,18±0,2a	39,6±2,582c

Tabla 50. Contenido de elementos presentes en los granos de trigo cosechados en el ensayo de invernadero precedidos por plantas de *Cicer arietinum* L. (garbanzo).

Tratamiento	C (g/100g)	N (g/100g)	P (g/100g)	K (g/100g)	Ca (g/100g)	Fe (mg/kg)	Mg (g/100g)	Mn (mg/kg)	Na (g/100g)	S (g/100g)	Zn (mg/kg)
Control Negativo	40,2±0,02a	2,2±0,03a	0,33±0,003a	0,53±0,04a	0,02±0,001a	35,03±1,56a	0,13±0,02a	22,41±1,48a	0,002±0,001a	0,11±0,01a	19,2±3,02a
Control Positivo	40,69±0,13c	2,25±0,04a,b	0,38±0,01b	0,53±0,03a	0,02±0,003a	34,46±2,35a	0,15±0,03a	34,86±3,1c,d	0,001±3,333E-4a	0,12±0,005a	32,47±2,06c
FCAP 04	41,2±0,03d	2,25±0,07a,b	0,4±0,03b	0,557±0,032a	0,02±0,006a	39,25±2,06b	0,16±0,02a	37,45±2,17d	0,001±3,333E-4a	0,12±0,006a	31,9±3,07b,c
FCAP 04 + FSZ 43	40,88±0,03c	2,31±0,11a,b,c	0,37±0,01b	0,557±0,027a	0,02±0,001a	32,9±2,05a	0,15±0,01a	26,21±2,12a,b	0,001±3,333E-4a	0,12±0,006a	25,15±4,09a,b
FCAP 04 + FSZ 47	41,12±0,06d	2,3±0,06a,b	0,41±0,02b	0,547±0,028a	0,023±0,003a	38,73±1,32b	0,15±0,02a	32,71±1,16c	0,001±3,333E-4a	0,12±0,006a	28,43±7,15b,c
FCAP 26	40,40±0,06b	2,26±0,08a,b	0,38±0,03b	0,56±0,017a	0,02±0,001a	41,53±1,77b	0,15±0,02a	35,56±3,23c,d	0,002±0,001a	0,12±0,002a	31,41±4,02b,c
FCAP 26 + FSZ 43	40,59±0,06b,c	2,3±0,04b	0,393±0,01b	0,57±0,04a	0,02±0,003a	37,12±2,06a,b	0,14±0,01a	29,05±1,13b	0,002±0,001a	0,123±0,005a	30,25±1,02b,c
FCAP 26 + FSZ 47	40,48±0,14b	2,24±0,04a,b	0,397±0,02b	0,587±0,03a	0,02±0,0003a	36,57±2,39a,b	0,15±0,02a	39,4±2,28d	0,001±0,001a	0,120,004a	34,69±4,1c
FSZ 43	40,81±0,16c	2,27±0,04a,b	0,40±0,02b	0,59±0,027a	0,02±0,003a	38,16±1,09b	0,18±0,06a	34,63±3,07c,d	0,001±0,001a	0,123±0,005a	33,48±4,025b,c
FSZ 47	40,18±0,04a	2,29±0,1a,b	0,337±0,07a	0,57±0,02a	0,02±0,003a	34,03±2,1a	0,14±0,02a	25,3±1,22a	0,001±3,333E-4a	0,12±0,003a	26,71±3,08b

2.4. Evaluación de los elementos presentes en el suelo durante la rotación

Una vez conocidos los cambios generados al inocular algunas de las cepas sobre el contenido de algunos elementos en los granos de garbanzo y trigo, resulta importante conocer lo que sucede en el suelo. Aunque no se observaron diferencias significativas en la cantidad de granos de trigo, es interesante conocer cómo se pueden ir acumulando algunos elementos en el suelo conforme se van cosechando y rotando algunos de los cultivos. Por lo tanto, se realizó un análisis del contenido en carbono y nitrógeno, comparando el suelo original, el suelo tras extraer las plantas de garbanzo y, finalmente, del suelo al extraer el trigo, comparando las cantidades de los suelos con diferentes tratamientos. Estudios de campo realizados por Aslam y colaboradores (2003) determinaron que en un periodo de 5 años de investigación el garbanzo en rotación con el trigo aumentó un 30% el contenido de carbono y un 38% el contenido de nitrógeno en el suelo. En nuestro caso, el periodo de investigación fue muy inferior, sin embargo, con un análisis de suelo sí podremos determinar que ha ocurrido en una sola rotación y pudimos observar que tanto carbono como nitrógeno aumentaron al finalizar el primer ciclo de rotación.

En primer lugar, el contenido de carbono, se muestra en la Figura 73. En la misma se observa 19,65g de carbono por cada 100 gramos de suelo original, antes de iniciar los ensayos (barra verde). Este contenido de carbono disminuyó de forma significativa al inocular con los diferentes inóculos y el control con fertilizante, al finalizar el cultivo de garbanzo (barras azules). Esto muestra la demanda que requiere el cultivo referente a la cantidad de carbono que necesita mientras se desarrolla. No obstante, una vez se recolectaron los granos y se retiraron las partes aéreas de las plantas, en el suelo quedaron los remanentes de las raíces y demás residuos de las hojas que se iban cayendo mientras se desarrollaban las plantas de *Cicer arietinum* L. Así, al finalizar el cultivo de trigo, y habiéndose descompuesto ya los remanentes de garbanzo, el contenido de carbono aumentó, como se observa Figura 73 (barras anaranjadas). Así pues, no sólo se recupera el contenido de carbono utilizado por las plantas de trigo, sino que se supera la cantidad original detectada en el suelo. Estos resultados fueron independientes del tratamiento, aunque destaca la inoculación con FCAP 26 + FSZ 47 con 40,79g por cada 100g de muestra de suelo, prácticamente duplicando el contenido de suelo original. Se observa que se ha acumulado un contenido significativo de carbono, incluso, destaca sobre ambos controles el contenido de este elemento, pudiéndose deber al carbono generado de la biomasa bacteriana de los inóculos y su efectiva colonización del nicho radicular de las plantas.

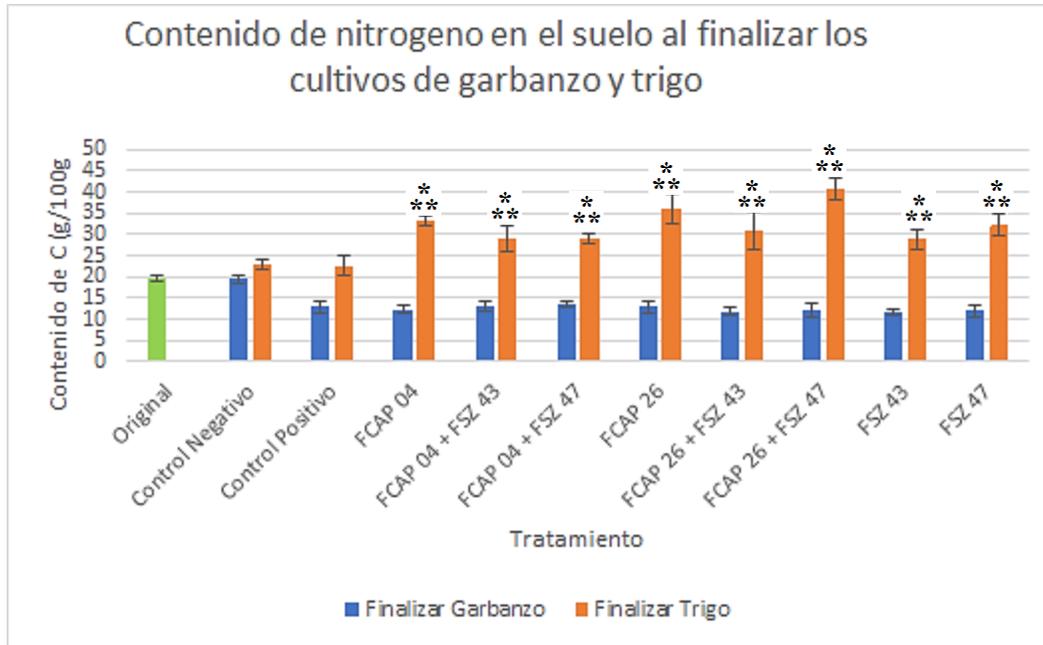


Figura 73. Muestra el contenido de Carbono dejado en el suelo según fueron retirándose los ensayos de invernadero para los diferentes tratamientos. Barras con ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

Referente al contenido de nitrógeno ocurrió algo similar a lo explicado para el carbono. (Figura 74). En un primer lugar, según el cultivo de garbanzo consumió el contenido inicial del nitrógeno presente en el suelo, no obstante, tras la cosecha y la descomposición de los remanentes del cultivo de garbanzo se comenzó a hacer disponible ese contenido de nitrógeno presente en los tejidos de la planta. En este caso, al igual que el contenido de carbono destaca el tratamiento con la co-inoculaciones FCAP 26 + FSZ 47, donde se cuantificó como cantidad inicial de nitrógeno en el suelo 0,653g en contraste con dicha co-inoculación con 1,693g (ambos por cada 100g de suelo analizado). Prácticamente este tratamiento aumentó en un 159,3% el contenido de nitrógeno. No obstante, recordemos que fue este tratamiento uno de los que generó mayor longitud aérea (Figura 68), además de ser el que produjo mayor número de granos de garbanzo garbanzo (Figura 69).

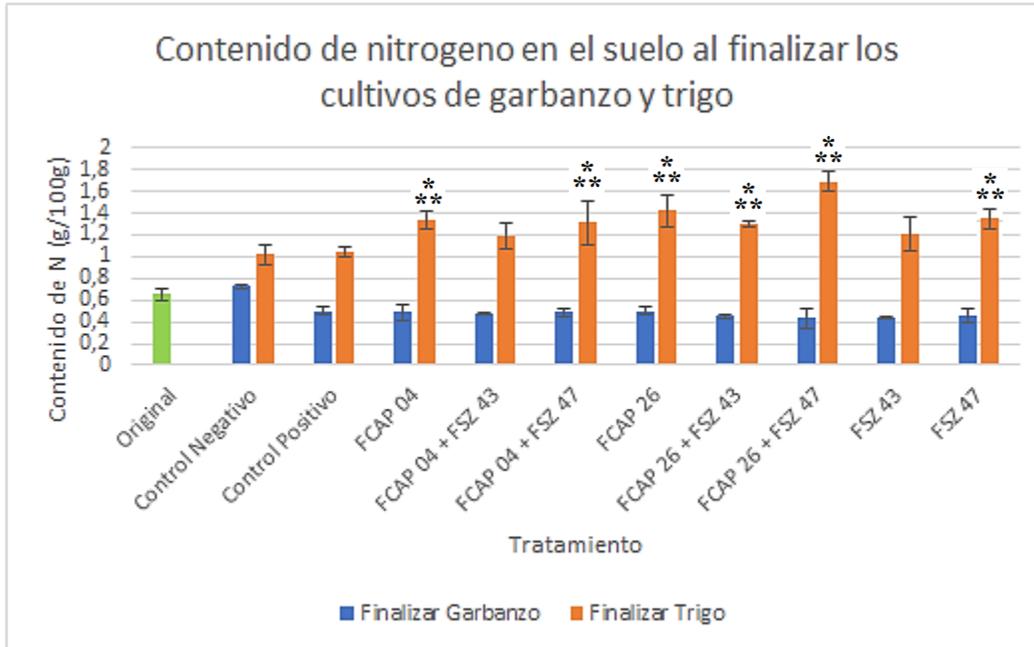


Figura 74. Muestra el contenido de Nitrógeno dejado en el suelo según fueron retirándose los ensayos de invernadero para los diferentes tratamientos. Barras con ** son significativamente superiores respecto a ambos controles, a $P < 0,05$.

Por tanto, aunque en una primera rotación no se logró aumentar el número de granos de trigo con ninguno de los tratamientos, sí podemos determinar que desde ese primer ciclo de rotación se puede observar la acumulación de carbono y nitrógeno en el suelo con los inoculantes incorporados, probablemente debido a que una planta más sana y con mayor biomasa, como las generadas con algunos de los tratamientos en las plantas de garbanzo, significa mayor fotosíntesis y, por tanto, mayor fijación de carbono y, una interacción idónea rizobio-leguminosa hará que la planta posea mayor cantidad de nitrógeno que, al descomponerse parte de la planta quedan biodisponibles en el suelo.

**Análisis de estreses bióticos y abióticos sobre cepas
seleccionadas**

CAPÍTULO V

1. Análisis del potencial efecto biocontrolador de endófitos aislados de nódulo de garbanzo contra hongos que afectan al cultivo del garbanzo.

1.1. Recolección e identificación de las cepas fúngicas

Conforme se realizaron los ensayos con plantas de este estudio, en algunas de las semillas no se desarrolló la plántula debido al crecimiento de hongos sobre las mismas. Por lo tanto, estos hongos fueron aislados con el objetivo de observar si algunos de los 95 endófitos de nódulos de garbanzo eran capaces de inhibir su crecimiento.

Así pues, de los granos infectados de garbanzo se tomaron muestras de estos hongos, aislándose 2 cepas, las cuales se denominaron HCA 2 y HCA 3, y se identificaron en base a la secuencia de su ITS como pertenecientes al género *Fusarium*. En el caso de la cepa HCA 2 la secuencia de la región del ITS permitió su identificación como *F. annulatum*, mientras que HCA 3 se identificó como *F. circinatum*. Además, se trabajó con una tercera cepa del género *Fusarium* presente en la colección de microorganismos del laboratorio. Estas tres cepas de *Fusarium* se muestran en la Figura 75.

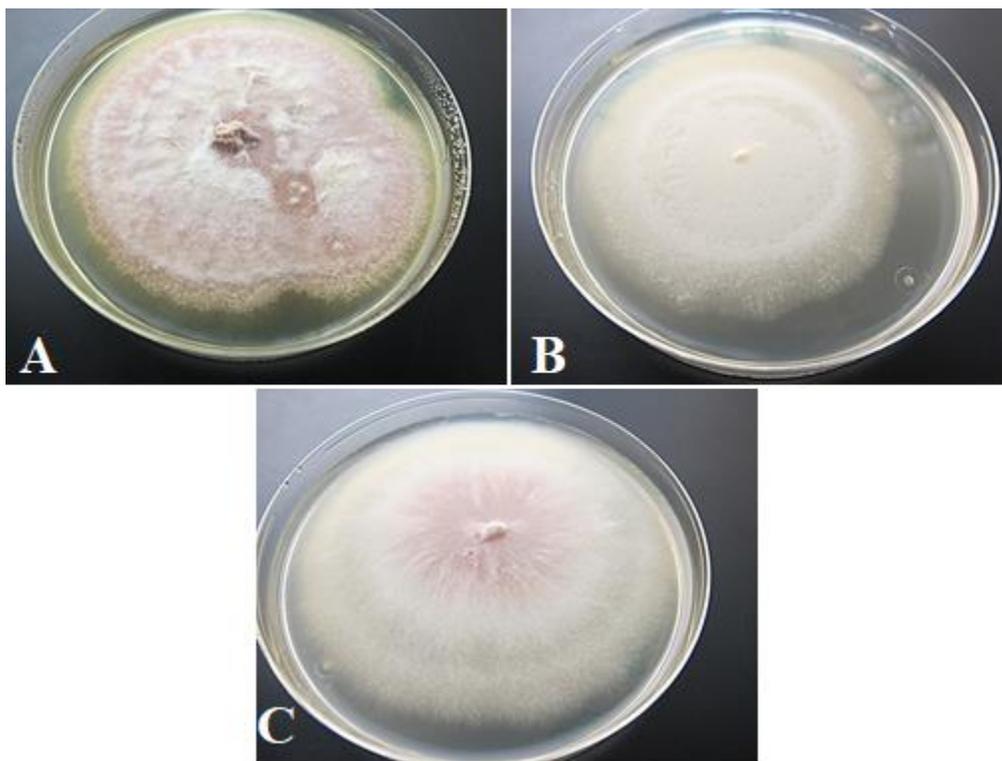


Figura 75. Hongos utilizados en este estudio A. *Fusarium annulatum*, B. *F. circinatum* y C. *Fusarium* sp.

1.2. Identificación de endófitos de garbanzo con capacidad antifúngica

Con el objetivo de hacer una primera búsqueda entre las 95 cepas con potencial de producción de antifúngicos, se procedió a enfrentar cada una de ellas a los hongos mencionados en la subsección anterior. Conforme a lo observado, varias cepas mostraron algún tipo de interacción antagonica contra estos hongos. Entre estas cepas, aquellas que produjeron una mayor inhibición de los hongos fueron FSZ 16, FSZ 24, FSZ 46, FSZ 47 y FSZ 28. A excepción de la cepa FSZ 28, la cual pertenece a la especie *Aneurinibacillus migulanus*, las otras 4 cepas pertenecían a la misma especie, *Bacillus halotolerans*.

En el caso de las 4 cepas de *Bacillus halotolerans*, al confrontarlas con los hongos tuvieron un comportamiento similar. Por ejemplo, a los 12 días el crecimiento del hongo no presentaba una forma radial, pues, según se acerca a línea de la bacteria, se tiende a linealizar su crecimiento. Otra característica general observada es que el micelio aéreo disminuía según se acercaba a la zona de interacción. Sin embargo, pasados los 12 días, continuaba acercándose a estas 4 cepas, no manteniéndose ese efecto antagonista, probablemente por la generación de alguna resistencia a la inhibición producida por las bacterias.

Por otro lado, la cepa *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 mostró una diferencia muy marcada en comparación a las 4 cepas de *Bacillus halotolerans*, pues aparentaba tener una mejor eficacia al inhibir estos hongos. Incluso, pasados los 30 días el efecto inhibitorio se mantenía, como se observa en la Figura 76, razón por la cual nos centraremos en esta cepa.

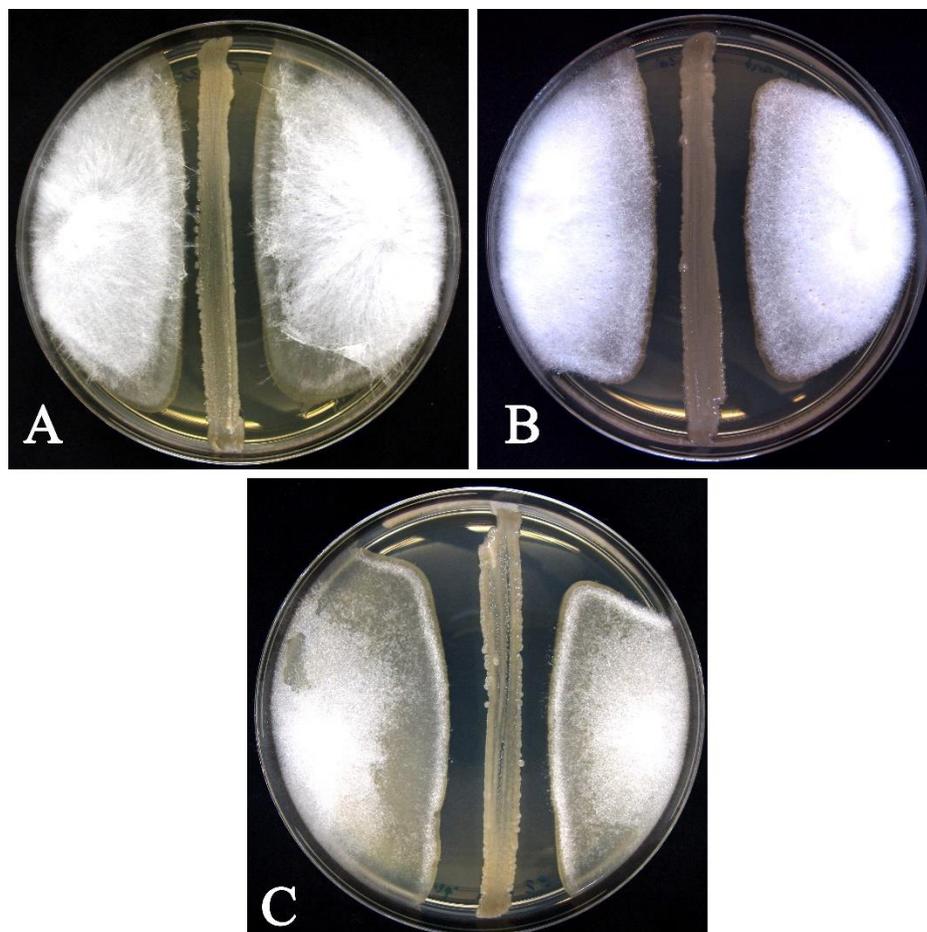


Figura 76. Efecto antagónico entre la cepa FSZ 28 y: A. *Fusarium annulatum*, B. *F. circinatum* y C. *Fusarium* sp. a los 30 días.

Aneurinibacillus migulanus se ha utilizado como agente de control biológico contra enfermedades de plantas. Esto se debe a su capacidad para producir gramicina S (Alenezi et al., 2017). De hecho, se ha probado en plantas de pino para tratar una infección causada por el hongo *Dothistroma septosporum*, encontrándose que las plantas tratadas con *Aneurinibacillus migulanus* (cepa Nagano) sufrían de forma menos severa la enfermedad (Alenezi et al., 2016). En ese mismo estudio se comparó otra cepa de *Aneurinibacillus migulanus* (NCTC 7096) donde no tuvo el mismo efecto (Alenezi et al., 2016). La gramicidina S es un decapeptido cíclico que se ha utilizado desde 1944 contra una gran cantidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, virus, hongos y patógenos eucariotas unicelulares (Berditsch et al., 2007); entre su modo de acción está la perturbación la bicapa lipídica (Mogi et al., 2008). Sin embargo, no se han encontrado en la literatura estudios sobre el empleo de este microorganismo como agente de biocontrol en garbanzo.

1.3. Ensayos en Invernadero

Las bacterias presentes en el sistema radicular pueden fomentar la salud de la planta. Sin embargo, hay organismos que pueden ocasionar patogénesis en las plantas que también pueden ser transmitidos por el suelo. Algunos microorganismos pueden actuar como biofertilizantes o bioestimuladores e incluso algunos microorganismos pueden emplearse para el control biológico de posibles fitopatógenos. Entre los mecanismos con los que los agentes de biocontrol combaten a microorganismos fitopatógenos están: competencia por los nutrientes o por nichos o secreción de moléculas bioactivas (antibióticos, exoenzimas, entre otros) (Patel & Saraf, 2017).

Por tanto, ya hemos mostrado que algunos de los microorganismos pueden fomentar el crecimiento y desarrollo de las plantas de garbanzo, ahora bien, si a eso le añadimos la capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos de la planta, podríamos aumentar aún más los rendimientos de este cultivo. Centrándonos en el cultivo de garbanzo, esta planta es frecuentemente afectada por el hongo *Fusarium oxysporum* sp. *ciceris*. Esta enfermedad limita la producción de garbanzo en diversos países del mundo. Este hongo posee una larga supervivencia en el suelo y se han encontrado 8 variantes patogénicas. Entre los factores que se utilizan para evitar la contaminación de los cultivos está el utilizar semillas certificadas libres de este patógeno, suelos de cultivos libres de este patógeno, fungicidas, e incluso el uso de agentes de control biológico (Jiménez-Díaz et al., 2015).

En nuestro estudio hemos encontrado unas semillas contaminadas con otras especies de *Fusarium* que no permitieron que se desarrollaran las plántulas de garbanzo. Además, tenemos una cepa bacteriana aislada del interior de nódulos de garbanzo, *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28, que inhibe *in vitro* a estas cepas de *Fusarium*. Por tanto, nos planteamos investigar los efectos sobre el desarrollo de la planta de garbanzo de la inoculación de esta cepa en plántulas infectadas con estos hongos junto con el mejor tratamiento observado en las co-inoculaciones de invernadero FCAP 26 + FSZ 47.

Antes de realizar este ensayo resultaba imprescindible identificar que *Aneurinibacillus migulanus* no inhibiera a la cepa *Mesorhizobium* sp. FCAP 26, ni a la cepa *Bacillus halotolerans* FSZ 47, pues como ya se mencionó, *A. migulanus* puede inhibir a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Sin embargo, no se produjo ninguna interacción alelopática entre estas cepas (Figura 77).

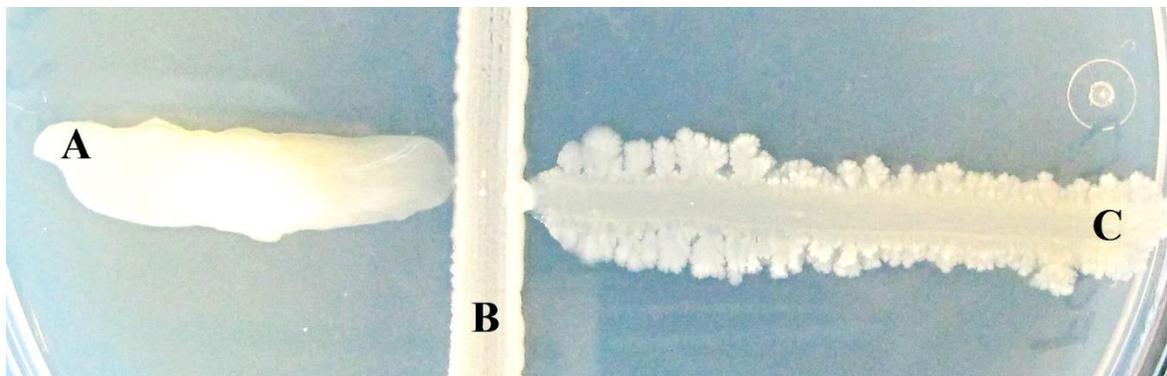


Figura 77. Interacción de la cepa *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 con las cepas del consorcio de PGPR que mejor funcionó en los ensayos de invernadero. A. *Mesorhizobium* sp. FCAP 26; B. *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28; C. *Bacillus halotolerans* FSZ 47

Ahora bien, es importante identificar cómo se comportan las plantas en presencia de los hongos fitopatógenos cuando se inoculan con este consorcio bacteriano. Así, se cultivaron plantas sin ninguna inoculación fúngica y bacteriana (marcada en marrón en las Figuras 78-82), plantas controles con cada uno de los hongos por separado (HCA 2 en amarillo, HCA3 verde y *Fusarium* sp. azul) y los tratamientos con la cepa *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 y el mejor tratamiento de las co-inoculaciones en garbanzo (FCAP 26 + FSZ 47).

Referente a la longitud aérea y peso aéreo seco (Figuras 78-79), como es de esperar el control sin ninguna inoculación de *Fusarium* mostró los mejores resultados, así pues la presencia del hongo afecta adversamente al crecimiento y desarrollo de las plantas de *Cicer arietinum* L., pues, como muestran los resultados del capítulo IV, este control fue significativamente inferior respecto al tratamiento con las cepas FCAP 26 (*Mesorhizobium* sp) + FSZ 47 (*Bacillus halotolerans*).

Entre los resultados a destacar, respecto a la longitud de la parte aérea, las plantas inoculadas con la cepa fúngica HCA 3 (*F. circinatum*) presentaron un crecimiento significativamente menor al de las plantas inoculadas con este mismo hongo y las cepas bacterianas (Figura 78). Referente a la longitud del sistema radicular (Figura 80), la inoculación de todas las cepas mostró una mayor longitud, sin embargo, estos tratamientos no mostraron diferencias significativas referentes al peso seco radicular respecto a su control (Figura 81). Para el contenido de clorofila se observa que las inoculaciones de todas las cepas ofrecieron diferencias significativas respecto al control inoculado con el hongo (Figura 82). En cuanto al número de nódulos, sólo se observó la presencia de estos en los tratamientos inoculados con la cepa *Mesorhizobium* sp. FCAP 26, no observándose diferencias significativas entre los diferentes inoculantes fúngicos.

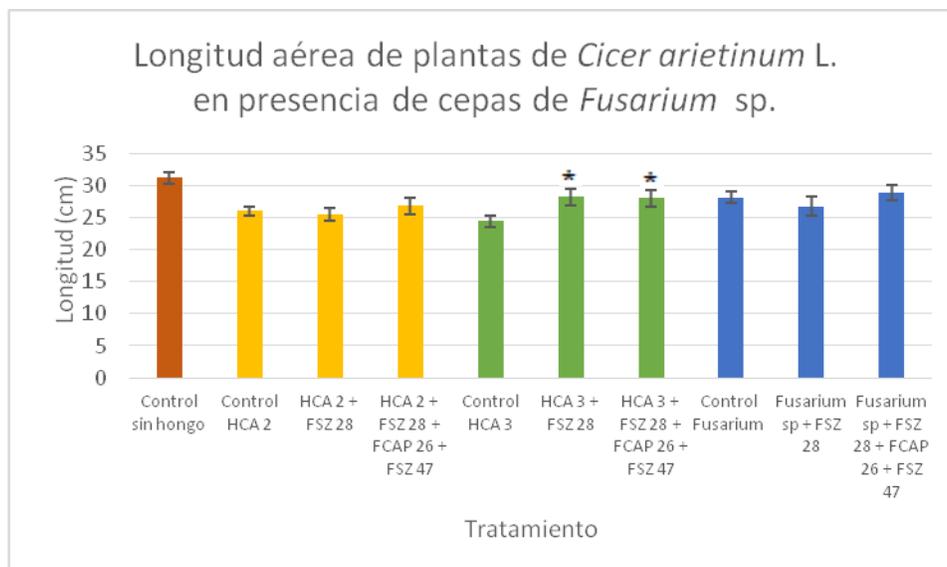


Figura 78. Longitud aérea en plantas de garbanzo al ser inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* y tratadas con diferentes inoculaciones bacterianas aisladas como endófitos de garbanzo. Barras con * significa que son significativas respecto a su control.

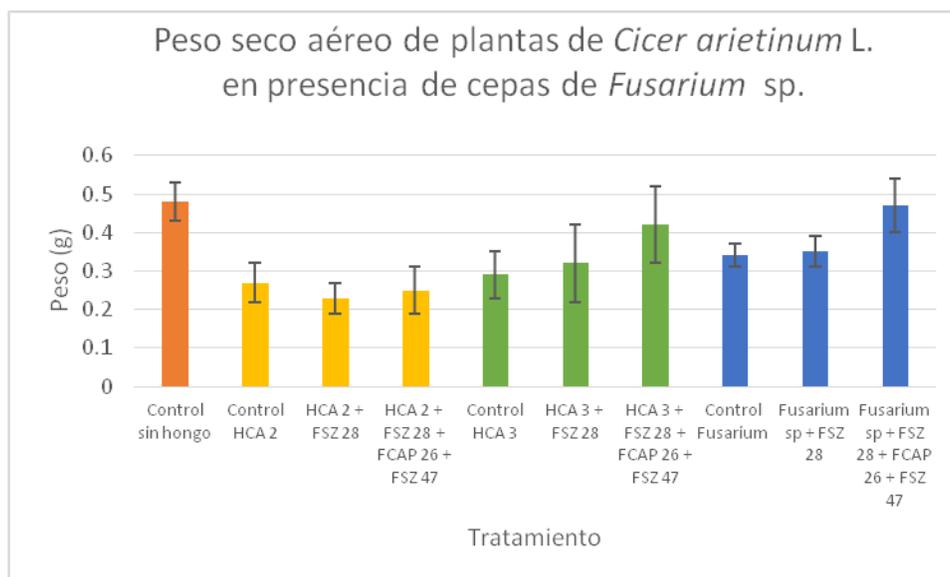


Figura 79. Peso aéreo seco en plantas de garbanzo al ser inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* y tratadas con diferentes inoculaciones bacterianas aisladas como endófitos de garbanzo.

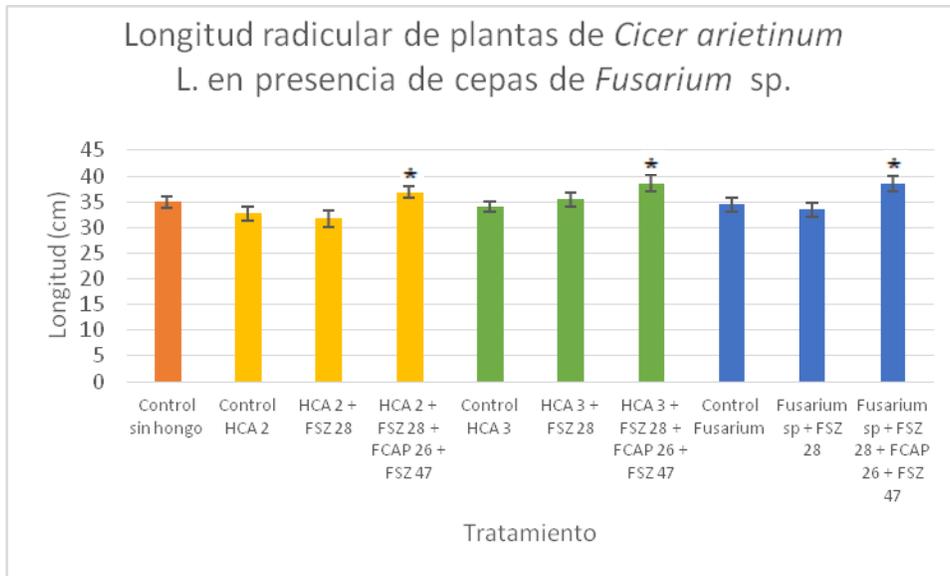


Figura 80. Longitud radicular en plantas de garbanzo al ser inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* y tratadas con diferentes inoculaciones bacterianas aisladas como endófitos de garbanzo. Barras con * significa que son significativas respecto a su control.

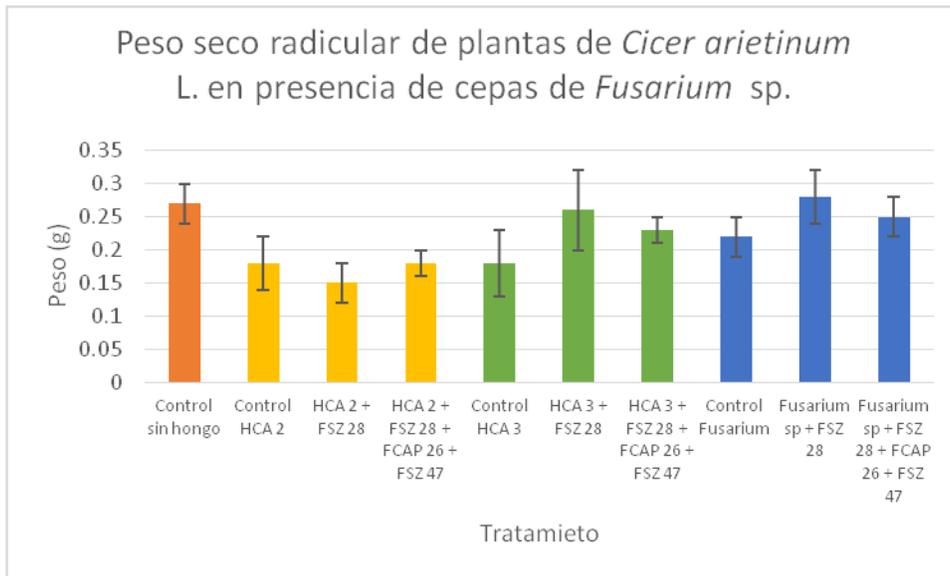


Figura 81. Peso seco radicular en plantas de garbanzo al ser inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* y tratadas con diferentes inoculaciones bacterianas aisladas como endófitos de garbanzo.

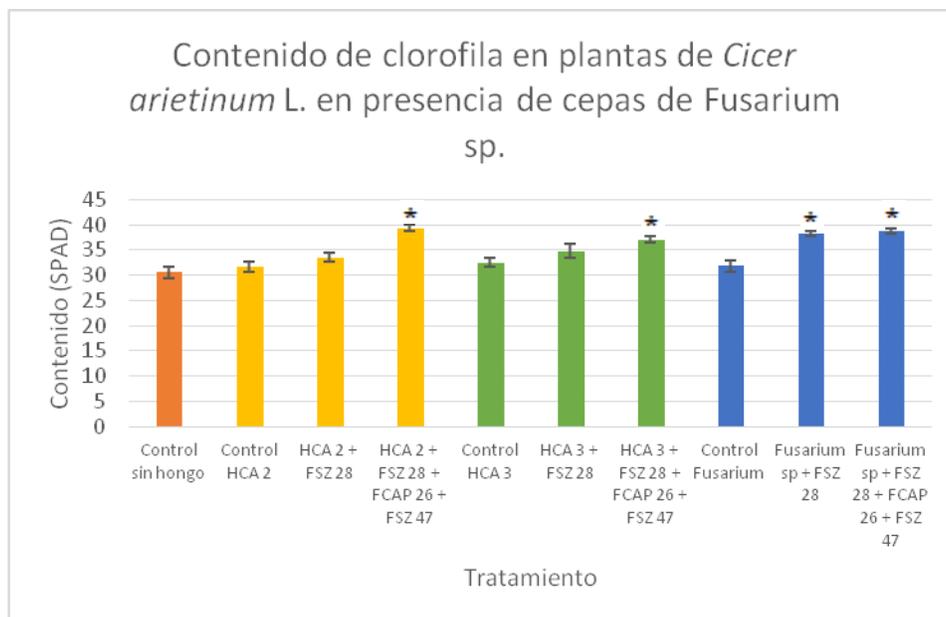


Figura 82. Contenido de clorofila en plantas de garbanzo al ser inoculadas con diferentes especies de *Fusarium* y tratadas con diferentes inoculaciones bacterianas aisladas como endófitos de garbanzo. Barras con * significa que son significativas respecto a su control.

Ahora bien, como mencionamos en un principio, estos hongos (HCA 2 y HCA 3) fueron aislados de semillas de garbanzo que se contaminaron de forma fortuita en algunos de los ensayos y no permitieron que las plántulas se desarrollaran. Así pues, se pretendió evaluar el porcentaje de plantas desarrolladas. De un total de 36 semillas pregerminadas inoculadas con una suspensión de esporas de cada hongo, se obtuvieron diferencias sustanciales entre los distintos tratamientos en el número de plantas que se desarrollaron. En primer lugar, el porcentaje de plantas desarrolladas sin ninguna inoculación fue de un 94,4%. En el caso de los tratamientos con el hongo HCA 2 el control sin ningún otro inoculante tuvo un 69,4% de plantas desarrolladas, en comparación con los inoculantes los cuales fueron: FSZ 28 un 88,8% y para FSZ 28 + FCAP 26 + FSZ 47 un 91,7%. Respecto a los tratamientos con el hongo HCA 3 se obtuvo un 61,1%, 88,8% y 88,8% para el control con HCA 3, FSZ 28 y FSZ 28 + FCAP 26 + FSZ 47, respectivamente. Por último, en relación a la cepa de *Fusarium* sp. proveniente de una colección del laboratorio (no relacionada con el garbanzo), los porcentajes de germinación de las plantas fueron de 80,6%, 88,8% y 91,7% para el control con esta cepa de *Fusarium*, FSZ 28 y FSZ 28 + FCAP 26 + FSZ 47, respectivamente. En la Figura 83 se muestran algunas de las semillas donde el hongo acaparó toda su superficie y no se logró desarrollar la planta.

En resumen, estas cepas fúngicas afectan adversamente al desarrollo de las plantas de garbanzo en los primeros estadios post-germinación, una vez desarrollada la planta su efecto es menor. Además, la inoculación de las cepas de *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 de forma independiente o mejor aún, en combinación con las cepas de *Mesorhizobium*

sp. FCAP 26 y *Bacillus halotolerans* FSZ 47, puede mejorar el porcentaje de supervivencia de plántulas de garbanzo atacadas por hongos del género *Fusarium*.



Figura 83. Ejemplos donde se puede observar que algunas plantas no se desarrollaron por la presencia de los hongos: A. HCA 2, B. HCA 3 y C. *Fusarium* sp.

2. Tolerancia y rizorremediación en presencia de metales

2.1. Selección de plantas y tolerancia de la cepa FCAP 26 a diferentes metales

Las actividades antropogénicas han propiciado que aumenten las emisiones contaminantes en diversos ambientes, afectándolos de manera adversa. Algunos de los contaminantes que más problemas causan a la hora lidiar con ello son los metales pesados. Así pues, éstos constituyen uno de los grupos más contaminantes y son ampliamente estudiados debido a los problemas de salud que estos pueden causar, además de su persistencia en el ambiente (Kumar et al., 2017). Entre los metales pesados más peligrosos para la salud humana destacan el plomo, el cadmio y el mercurio.

Algunos de los efectos adversos que puede presentar el cadmio son efectos pulmonares agudos, daño renal, debilitamiento óseo (Staessen et al., 1999; Alfven et al., 2000; Nordberg et al., 2002). En el caso del mercurio también ocasiona daño pulmonar, daño renal, aunque destacan más los efectos neurológicos y psicológicos (Lindh et al., 2002). Referente al plomo, los efectos en el ser humano son encefalopatías, irritabilidad, dolor abdominal, entre otros síntomas relacionados con el sistema nervioso y, en los niños, interfiere en el ámbito cognitivo (Steenland, 2000). La exposición al aluminio puede tener efectos variables, siendo los más peligrosos la inhalación de polvos o vapores que contengan este metal, ya que afecta al sistema nervioso (Aronson & Woo, 1981). El zinc sirve de cofactor para una gran cantidad de enzimas (Rink & Gabriel, 2000), por consiguiente, es un elemento esencial a nivel biológico, sin embargo, un exceso de este metal puede causar tos, dolor de estómago y fatiga, además se recomienda que no sea inhalado (Bhowmik et al., 2010). En el caso del cobre, la inhalación ocasiona irritación en las vías respiratorias, por ingesta causa náuseas, vómitos, diarrea, incluso puede dañar los riñones y el hígado (Valko et al., 2005).

Ahora bien, referente al efecto de algunos metales en las plantas, éstos son imprescindibles, por ejemplo, Fe, Cu y Zn son micronutrientes esenciales (Wintz et al., 2002). Sin embargo, una absorción superior a la necesaria puede causar efectos tóxicos en la planta (Monni et al., 2000; Blaylock & Huang 2000). Algunos de los síntomas por la presencia de algunos metales pueden afectar el desarrollo de las plantas, como la permeabilidad de la membrana (plomo), marchitamiento de las hojas (cadmio y zinc), daño radicular (mercurio), imbibición de los cultivos (arsénico), efectos en pigmentos foliares (manganeso y zinc) (Rodríguez et al., 2006; Intawongse et Dean, 2006; Pal & Nandi, 1990; Iannacone & Alvarino, 2005; Carbonell et al., 1995; Casierra-Posada & Poveda, 2005).

Algunas especies de plantas pueden ser capaces de acumular y tolerar algunos metales más que otras, pudiendo ser utilizadas como agentes biorremediadores. La utilización de plantas para remediar algún contaminante se conoce como fitorremediación (Salt et al., 1998). De hecho, la fitorremediación se puede subdividir en otros subgrupos como fitoextracción (Kumar et al., 1995), fitodegradación (Burken & Schnoor, 1997), rizofiltración (Dushenkov et al., 1995), fitoestabilización (Vangronsveld et al., 1995; Smith & Bradshaw, 1972) y fitovolatilización (Burken & Schnoor, 1999; Bañuelos et al., 1997).

No obstante, también destaca una forma conocida como rizorremediación, la cual propone una estrategia donde se inoculan microorganismos en las plantas para que éstas se beneficien y/o ayuden a la degradación de los contaminantes en el entorno rizosférico (Radwan et al., 1995).

Así pues, conociendo el potencial de algunas de nuestras cepas identificadas en este trabajo como promotores del crecimiento vegetal, se estudió cómo pueden ayudar en la rizorremediación de metales pesados. En este sentido, se analizó la tolerancia de la cepa FCAP 26 (*Merorhizobium*) a algunos metales y cómo esta bacteria favorece la posible biorremediación de dichos metales. Cabe añadir que, además de inocular esta cepa, también se trabajó con la inoculación de micorrizas comerciales, pues éstas pueden también fomentar el crecimiento de las plantas y se han documentado la utilización de micorrizas con fines de rizorremediación (Mani & Kumar, 2014; Miransari, 2017). Las micorrizas incluyendo algunas del filo *Glomeromycota* (Schüßler & Walker, 2010), están asociadas con el 80% de las especies vegetales, ayudando al desarrollo de esas plantas, teniendo como beneficios una mejor capacidad de captación de agua y nutrientes, así como una mayor protección contra patógenos, entre otros (Smith et al., 2011; Nell et al., 2010).

Para los ensayos en planta, se escogieron algunas especies capaces de al menos tolerar algunos de los metales. Así pues, se seleccionaron leguminosas capaces de desarrollarse en presencia de metales. Por un lado, se eligió *Erophaca baetica* L., planta que se puede encontrar en la cuenca del río Tinto, donde existen elevadas concentraciones de hierro además de zinc, arsénico, cobre y plomo (Rufo L. & de la Fuente, V., 2010). Por otro lado, se seleccionó *Astragalus pelecinus* L., ya que plantas de este género aparecen comúnmente en entornos de vertederos de residuos urbanos, donde frecuentemente existen diversos residuos metálicos (Pastor & Hernández, 2002).

Por otro lado, se evaluó la tolerancia máxima a algunos metales de la cepa FCAP 26. Respecto al aluminio (AlCl_3), se observó que su máxima tolerancia fue a una concentración de 2mM, para el cobre (CuSO_4) 800 μM , mercurio (HgCl_2) 100 μM , para el plomo (PbCl_2) 15mM y para el zinc (ZnSO_4) 100 μM . En el caso de cadmio (CdCl_2) esta cepa no logró tolerar la concentración mínima establecida de 100 μM , razón por la cual no se siguió trabajando con este metal.

2.2. Ensayos *in vitro* de resistencia a metales

2.2.1. Desarrollo de las de plantas en presencia de metales

Una vez conocido la concentración mínima a la cual nuestra cepa tolera los diferentes metales, resulta imprescindible desarrollar un ensayo donde podamos observar de forma *in vitro* el desarrollo de las plántulas de *Erophaca baetica* L. y *Astragalus pelecinus* L. con el objetivo primordial de identificar si las plantas con las inoculaciones pueden soportar las concentraciones de estos metales. Además, si la inoculación de esta cepa junto con una

mezcla comercial de micorrizas puede colonizar de forma efectiva dichas plantas con esos metales.

Así pues, como observamos en la Figura 84, observamos las plántulas de *Erophaca baetica* L. inoculadas con *Mesorhizobium* sp. FCAP 26, donde podemos determinar que la concentración de cobre utilizada, la cual podía soportar la cepa FCAP 26, afecta adversamente a esta especie de planta. De igual forma se observa que el mercurio tiende a perturbar el crecimiento de esta planta. Referente a la inoculación conjunta de la cepa FCAP 26 con las micorrizas comerciales observamos que sucede algo similar a lo descrito anteriormente, las plantas bajo la presencia de mercurio y cobre a las concentraciones determinadas se ven afectadas, aunque el efecto del mercurio en este caso se ve más marcado, Figura 85.

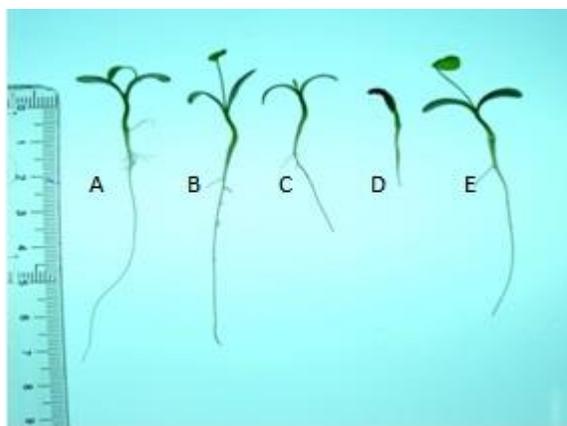


Figura 84. Comparativa de plantas de *Erophaca baetica* L. inoculadas con la cepa FCAP 26 bajo la presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Cu y E: i Pb (6pdi)

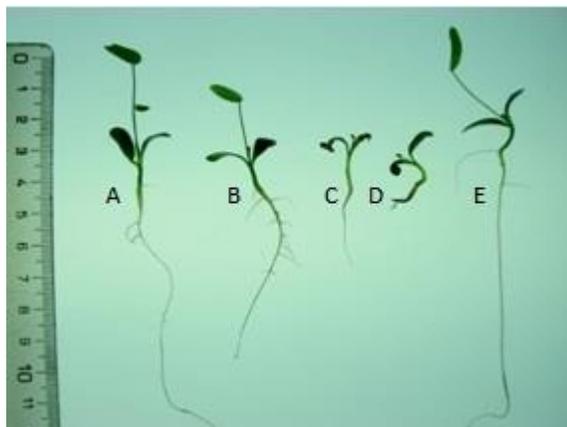


Figura 85. Comparativa de plantas de *Erophaca baetica* L. inoculadas con la cepa FCAP 26 y micorrizas comerciales bajo la presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Cu y E: Pb (6pdi)

Referente a la planta *Astragalus pelecinus* L. observamos a los 6 días post-inoculación con la cepa FCAP 26 que las plantas en presencia de aluminio, zinc y plomo presentan un desarrollo radicular normal, mientras que en presencia mercurio y plomo tendía a rezagar más las plantas afectando su crecimiento (Figura 86). Ahora bien, respecto a las inoculaciones de micorrizas con FCAP 26 se toleró mejor los metales exceptuando el cobre, que fue la plántula menos desarrollada. Incluso la adición de las micorrizas produjo que se perdiera la testa más rápido, favoreciendo su crecimiento. Cabe mencionar que pasado los 12 dpi las plantas de ambas especies en presencia de mercurio comenzaban a tornarse de una coloración marrón.



Figura 86. Comparativa de plantas de *Astragalus pelecinus* L. inoculadas con la cepa FCAP 26 bajo la presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Cu y E: Pb (6pdi).

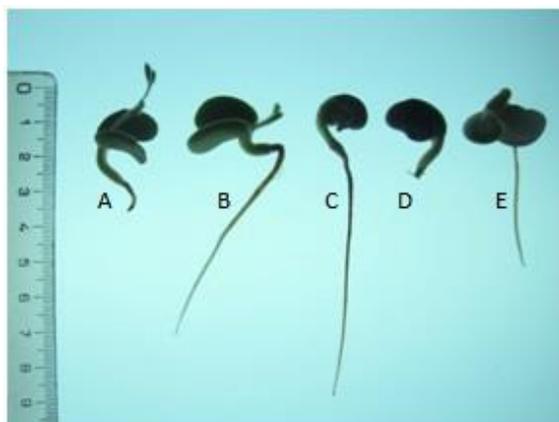


Figura 87. Comparativa de plantas de *Astragalus pelecinus* L. inoculadas con la cepa FCAP 26 y micorrizas bajo la presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Cu y E: Pb (6pdi).

2.2.2. Ensayo de colonización en el sistema radicular

Ahora bien, los resultados antes expuestos nos ofrecen una forma cualitativa y orientativa de ver la tolerancia de las plantas inoculadas bajo la presencia de algunos metales. Por tanto, ahora es importante ver si se logra observar una colonización del sistema radicular en las plantas bajo la presencia de estos metales. Así pues, conforme se observan las Figuras 88-93 se aprecia la colonización de la cepa sobre el sistema radicular de ambas plantas en presencia o ausencia de micorrizas. Detallando los resultados observados la inoculación de la cepa FCAP 26 en plantas de *Erophaca baetica*, ésta fue capaz de colonizar el sistema radicular en presencia de: Al, Zn, Hg y Pb (Figura 88). La colonización de la cepa FCAP 26 no se afectó bajo la presencia de las micorrizas (Figura 89-90). Sin embargo, para el caso del Cu no se observó ninguna colonización. En el caso de las plantas de *Astragalus pelecinus* L. también la cepa FCAP 26 fue capaz de colonizar las raíces (Figura 91), inclusive en presencia de micorrizas (Figura 92-93). De igual forma no se observó colonización en presencia de cobre. Referente al mercurio, la colonización fue sumamente inferior en *Astragalus pelecinus* L.

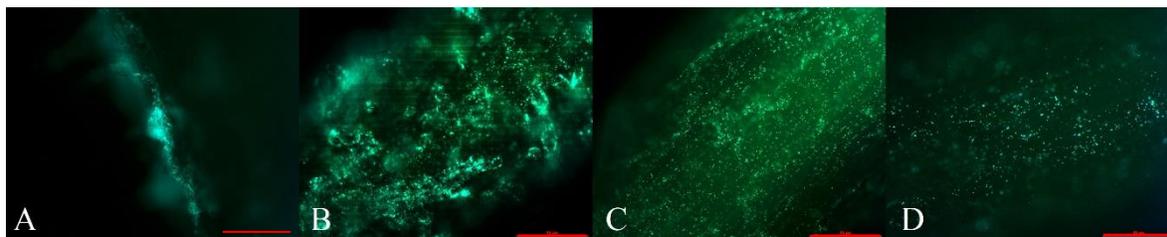


Figura 88. Colonización de raíces de *Erophaca baetica* L. por la cepa FCAP 26 en presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Pb.

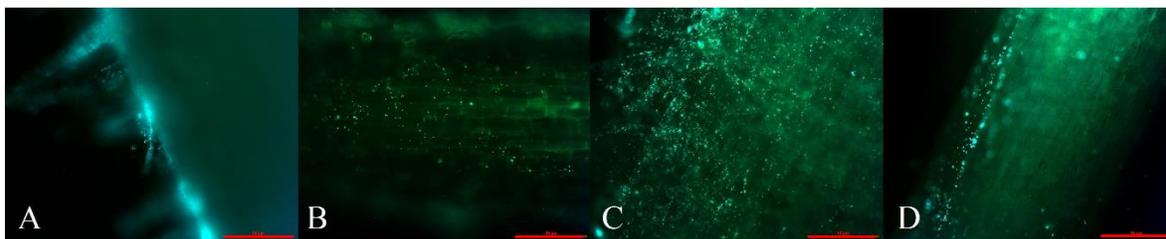


Figura 89. Colonización de raíces de *Erophaca baetica* L. por la cepa FCAP 26 en presencia de micorrizas y de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Pb.



Figura 90. Colonización de raíces de *Erophaca baetica* L. por micorrizas en presencia de la cepa FCAP 26 y de los siguientes metales: A: Al, B: Cu, C: Hg, D: Pb y E: Zn.

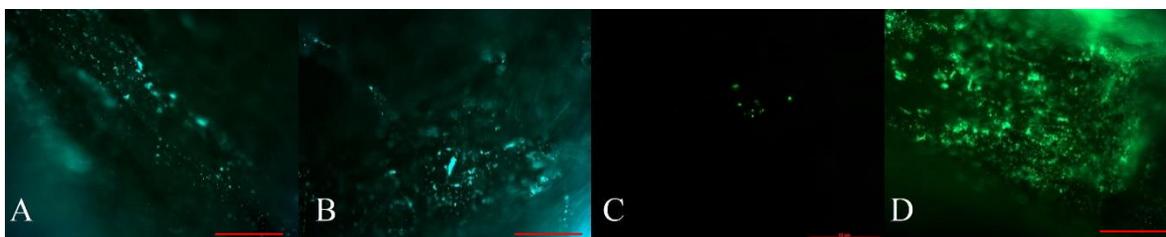


Figura 91. Colonización de raíces de *Astragalus pelecinus* L. por la cepa FCAP 26 en presencia de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Pb.

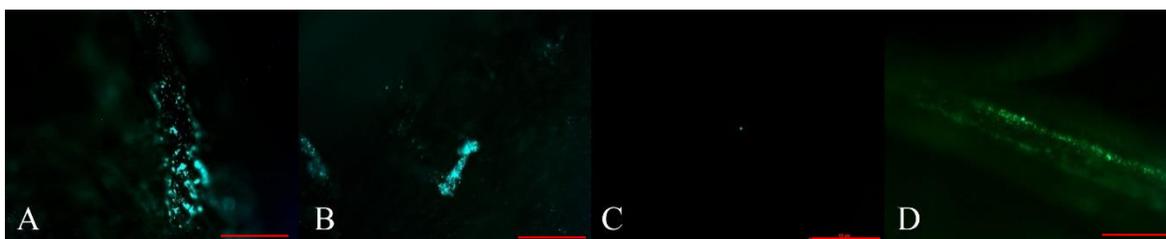


Figura 92. Figura 89. Colonización de raíces de *Astragalus pelecinus* L. por la cepa FCAP 26 en presencia de micorrizas y de los siguientes metales: A: Al, B: Zn, C: Hg, D: Pb.

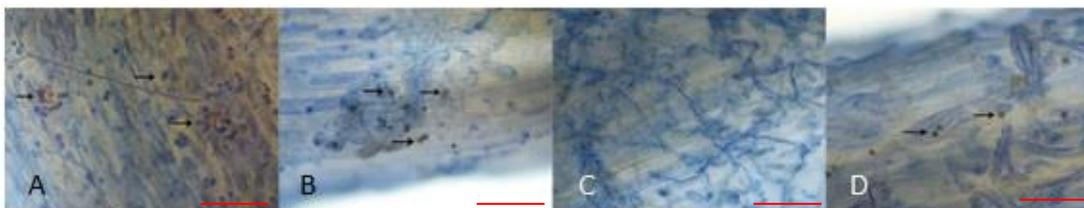


Figura 93. Colonización de raíces de *Astragalus pelecinus* L. por micorrizas en presencia de la cepa FCAP 26 y de los siguientes metales: A: Al, B: Cu, C: Hg, D: Pb y E: Zn.

2.3. Ensayo en invernadero en presencia de metales

2.3.1. *Erophaca baetica* L.

En primer lugar, analizaremos las plantas de *Erophaca baetica* L. bajo la presencia de los metales aluminio, plomo y zinc bajo condiciones de invernadero. En la Figura 94 observamos los efectos adversos para el desarrollo de la planta bajo la presencia de los metales sin la presencia de ningún inoculante microbiano.



Figura 94. Desarrollo de *Erophaca baetica* L. en presencia de diferentes metales. A: control negativo, B: control de Al, C: control de Pb y D: control de Zn. Barra equivale a 20cm

Al analizar las plantas bajo la presencia de aluminio se puede observar una diferencia importante respecto al control sin inocular (Figura 95). En este sentido se observa que las plantas en presencia del aluminio se afectan adversamente, al ser comparadas con plantas con plantas crecidas sin este metal. No obstante, hay tratamientos que han fomentado el crecimiento de las plantas.



Figura 95. Desarrollo de *Erophaca baetica* L. en presencia de aluminio. A: control negativo sin metales ni inoculantes, B: control negativo en presencia de Al sin inoculantes, C: inoculación con FCAP 26, D: inoculación con micorrizas, E: inoculación con micorrizas y FCAP 26. Barra equivale a 20cm

Así pues, realizando un análisis estadístico de las plantas en presencia de aluminio, los datos recogidos para distintos parámetros que reflejan la promoción del crecimiento vegetal (Tabla 50), encontramos que las longitudes aéreas y las radiculares, respecto al control con el metal fueron significativas para la cepa FCAP 26, micorrizas y la combinación de ambas. No se observó diferencias en el contenido de clorofila. Además se logró generar una mayor biomasa aérea mediante las inoculaciones con micorrizas solas y la co-inoculación de la cepa FCAP 26 con las micorrizas.

Ahora bien, analizando el contenido de aluminio acumulado no se encontraron diferencias significativas entre el control en presencia de aluminio y el mejor tratamiento, el cual fue con micorrizas con $62,0 \pm 3,4$ y $54,7 \pm 4,3$ (mg/kg de muestra). Sin embargo, como se puede apreciar las plantas inoculadas con micorrizas produjeron una mayor biomasa aérea, por lo tanto, si extrapolamos estos datos de acumulación de aluminio (mg de aluminio por kg de biomasa) y la cantidad de aluminio acumulado por planta será mayor para las plantas inoculadas con micorrizas, así pues, serviría como un rizorremediador.

Tabla 50. Características de las plantas de *Erophaca baetica* L. cultivadas en presencia de aluminio (2 mM)

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Clorofila	Longitud radicular (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radicular (g)
Control sin metal	20 ± 0,88a	22,6 ± 0,9a	18,93 ± 0,86ab	0,20 ± 0,02b	0,21 ± 0,03b
Control Al	36,05 ± 0,92b	25,5 ± 0,77b	17,42 ± 0,43a	0,16 ± 0,01a	0,11 ± 0,02a
FCAP 26	39,95 ± 1,31c	26,56 ± 0,9b	20,5 ± 0,98b	0,16 ± 0,02a	0,1 ± 0,02a
Micorrizas	44,35 ± 1,08cd	26,5 ± 0,8b	20,23 ± 0,68b	0,21 ± 0,02b	0,13 ± 0,02a
FCAP 26 + micorrizas	42,46 ± 1,17c	24,7 ± 0,84ab	21,14 ± 0,75b	0,21 ± 0,02b	0,13 ± 0,01a

Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

Para el caso del plomo las diferencias observadas eran menores en las características más importantes respecto al control con plomo, figura 96. En este sentido la tabla 51 presenta que respecto al control no hay diferencias significativas superiores principalmente en la biomasa aérea al ser comparadas con el control en presencia de metales. De igual modo tampoco se observaron diferencias en bioacumulación de este metal. Por tanto, para el plomo la inoculación de micorrizas y/o la cepa *Mesorhizobium* sp. 26 en plantas de *Erophaca baetica* no fueron efectivas para rizarremediar este metal.



Figura 96. Comparación entre A: control negativo, B: control de Pb, C: inoculación con FCAP 26, D: inoculación con micorrizas, E: inoculación con micorrizas y FCAP 26. Barra equivale a 20cm.

Tabla 51. Características de las plantas de *Erophaca baetica* L. cultivadas en presencia de plomo (15 mM)

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Clorofila	Longitud radicular (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radicular (g)
Control sin metal	20 ± 0,88a	22,62 ± 0,97a	18,93 ± 0,86a	0,20 ± 0,02a	0,21 ± 0,03b
Control Pb	41,7 ± 1,23b	24,71 ± 0,98ab	19,61 ± 0,85a	0,21 ± 0,01a	0,19 ± 0,01b
FCAP 26	39,76 ± 1,99b	26,07 ± 1,20	19,2 ± 1,25a	0,21 ± 0,03a	0,13 ± 0,02a
Micorrizas	42,55 ± 1,10bc	21,1 ± 1,17a	20,86 ± 0,97a	0,20 ± 0,03a	0,15 ± 0,02a
FCAP 26 + micorrizas	39,64 ± 1,10b	23,72 ± 1,04ab	19,21 ± 0,47a	0,18 ± 0,02a	0,11 ± 0,02a

Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

Por último, tenemos la presencia del zinc, la figura 97 muestra una planta representativa de cada tratamiento respecto a los controles. No se identificaron diferencias significativas entre el control con zinc y las inoculaciones. En otras palabras, ninguna de las co-inoculaciones no sobrepasaron al control respecto a longitudes o biomásas, tabla 52. Sin embargo, hay que destacar que se acumuló un mayor contenido de zinc en el tejido vegetal de las plantas inoculadas con las micorrizas. el control bioacumuló $119,1 \pm 0,6$ mg/kg de zinc por tejido vegetal versus la inoculación con micorrizas con $140,2 \pm 5,4$ mg/kg. En resumen, inoculación de micorrizas logró acumular una mayor cantidad de aluminio y zinc por planta de *Erophaca baetica* L. siendo un buen prospecto para ser utilizado como rizadorremediador.



Figura 97. Comparación entre A: control negativo, B: control de Zn, C: inoculación con FCAP 26, D: inoculación con micorrizas, E: inoculación con micorrizas y FCAP 26. Barra equivale a 20cm.

Tabla 52. Características de las plantas de *Erophaca baetica* L. cultivadas en presencia de de zinc (100 μ M).

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Clorofila	Longitud radicular (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radicular (g)
Control sin metales	20 \pm 0,88a	22,62 \pm 0,97a	18,93 \pm 0,86a	0,20 \pm 0,02a,b	0,21 \pm 0,03b
Control Zn (26)	42,86 \pm 0,90c	27,49 \pm 0,95b	20,96 \pm 1,13a	0,19 \pm 0,01a,b	0,17 \pm 0,01b
FCAP 26	40,28 \pm 1,41b,c	24,19 \pm 0,78a	19,12 \pm 0,61a	0,21 \pm 0,02b	0,14 \pm 0,02a,b
FCAP 26 + micorrizas	39,05 \pm 1,40b	24,42 \pm 0,86a	19,05 \pm 1,09a	0,18 \pm 0,03a,b	0,11 \pm 0,02a
Micorrizas	41,65 \pm 0,94ab,c	24,74 \pm 0,80a	19,2 \pm 0,69a	0,16 \pm 0,02a	0,14 \pm 0,0a,b

Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

2.3.2. *Astragalus pelecinus* L.

Respecto a la planta *Astragalus pelecinus* L. se decidió combinar todos los metales en un mismo ensayo y no estudiarlos por separado, pues esta planta crece en lugares contaminados en presencia de varios metales a la vez. En este sentido se obtuvo unos resultados significativamente superiores respecto a las plantas inoculadas como se muestra

en la tabla 53. Si se realiza un análisis comparativo entre la biomasa generada y la acumulación de metales, en primer lugar, el aluminio se puede determinar que el tratamiento con micorrizas puede bioacumular más aluminio por planta que el control sin inocular. En el caso del plomo ocurre algo similar a lo observado para *Erophaca baetica* L., por tanto, ninguna de las plantas con las inoculaciones resultó ser buenos prospectos en la rizorremediación del plomo. En el caso del zinc tampoco las inoculaciones sirvieron para la rizorremediación de este metal. Sin embargo, con la biomasa generada estas inoculaciones pueden servir para reforestar áreas con esta planta en suelos contaminados con estos tres metales.

Tabla 53. Características de las plantas de *Astragalus pelecinus* L. en presencia de zinc, aluminio y plomo.

Tratamiento	Longitud aérea (cm)	Clorofila	Longitud radicular (cm)	Peso seco aéreo (g)	Peso seco radicular (g)
Control sin metales	7,29 ± 0,38b	48,56 ± 1,54b,c	5,71 ± 0,34bc	0,36 ± 0,02b	0,91 ± 0,22b,c
Control con Al, Pb y Zn	3,08 ± 0,42a	33,98 ± 2a	3,42 ± 0,35a	0,19 ± 0,04a	0,4 ± 0,01a
FCAP 26	7,32 ± 0,67b	45,88 ± 0,90b	4,5 ± 0,26b	0,38 ± 0,09b	0,5 ± 0,11a
Micorrizas	8,06 ± 0,79b	46,78 ± 1,17b	4,94 ± 0,59b	0,58 ± 0,06b,c	0,65 ± 0,15a,b
FCAP 26 + micorrizas	7,5 ± 0,65b	50,53 ± 1,26c	6,5 ± 0,65c	0,43 ± 0,06b	0,53 ± 0,17b

Valores con la misma letra no son estadísticamente significativos a $P < 0,05$.

3. Resistencia a condiciones tropicales de cepas del género *Mesorhizobium* aisladas de la misma localidad pero con 14 años de diferencia

3.1. Ensayo bajo condiciones ambientales

Los patrones de temperatura y las precipitaciones han cambiado en las últimas décadas a nivel mundial. Además, se prevé que dichos cambios continúen en el futuro, provocando una intensificación de eventos extremos como inundaciones y/o sequías prolongadas induciendo tensiones hídricas. Dichos patrones serán muy notables en las zonas climáticas mediterráneas donde se estima que habrá una disminución del 25 al 30% de precipitaciones a finales del siglo XXI. Además, se pronostica que habrá una reducción en las escorrentías, siendo mayor en Turquía y España, de hasta un 30 a 40% (Jeppesen et al., 2015), todo ello a consecuencia del calentamiento global.

Dichos cambios globales, propiciarán cambios a nivel de los ecosistemas, afectando tanto la flora como la fauna de la zona, de igual modo se afectarán las comunidades microbianas. La diversidad de las especies radica básicamente en su genotipo, punto básico para los nuevos cambios evolutivos. Sin embargo, existen pocos estudios que evalúan las variaciones a nivel intraespecífico de los microorganismos cuando hacemos referencia a los cambios climáticos globales (Pauls et al., 2012).

El cambio climático global puede afectar a la diversidad genética intraespecífica de diversas maneras, además de cambios en la plasticidad fenotípica de individuos y poblaciones en respuesta a nuevas condiciones de adaptaciones evolutivas ante circunstancias cambiantes (Pauls et al., 2014; Hoffmann & Sgrò 2011). En este sentido, se han realizado algunas investigaciones. Por ejemplo, Santos y colaboradores (2014) estudiaron el efecto de las temperaturas sobre bacterias marinas fijadoras de nitrógeno asociadas a un tipo de coral. Un aumento térmico provocó cambios graduales en las poblaciones de estas bacterias, mostrando un posible futuro escenario del cambio climático. Además, el estudio de dichos cambios puede servir de bioindicador de estrés térmico en los arrecifes de coral. Existen muchas investigaciones donde se estudian las alteraciones de las poblaciones y/o comunidades simulando los cambios climáticos globales, sin embargo, hay muy poca literatura referente a los cambios a nivel genotípico asociados a permutaciones adaptativas en el tiempo relacionadas a cambios climáticos.

Una vez conocidos los efectos del cambio climático, resulta importante identificar cómo se adaptan los microorganismos a los cambios que ya estamos observando. Los aislados de este trabajo se obtuvieron a partir de plantas trampa de *Cicer arietinum* L. (garbanzo) crecidas en suelo procedente de la localidad de Fuentesauco en Zamora (España). Estos aislados se obtuvieron en dos periodos de tiempo diferentes: en primer lugar, las cepas denominadas FCAP en el año 2000 (32 cepas) y luego las cepas FSZ, en 2014 (66 cepas). Luego de un análisis filogenético del gen 16S rRNA y los genes housekeeping: *recA*, *glnII*, *atpD*, *rpoB* y la concatenación de *recA* con *glnII* de las cepas pertenecientes al género *Mesorhizobium* se identificó la existencia de un grupo de aislados

muy relacionados entre sí, pero aislados con 14 años de diferencia. Las cepas de este grupo fueron FCAP 30, FSZ 50 y FSZ 51 (Figuras 27-32). Por lo tanto, se quería determinar si se afectaba la relación simbiótica de estas cepas con plantas de garbanzo y evaluar si alguna de las cepas aisladas en el 2014 era más competitiva que la aislada en el año 2000. Puesto que entre los años 2000 y 2014, la región de aislamiento de las cepas ha sufrido la tendencia de elevación de temperaturas y aumento de las sequías debido al calentamiento global, nos planteamos si existía la posibilidad de que los aislados del mismo grupo obtenidos más recientemente fueran más resistentes a estas condiciones de cambio. Es por ello, que se decidió establecer un ensayo en Puerto Rico, país que se localiza en la región tropical del Caribe. A pesar de sus reducidas dimensiones (9.104km²), debido a su origen geológico muestra una diversidad de microclimas y suelos. Analizando el origen de la Isla, ésta surgió de volcanes marinos a consecuencia del choque de la placa tectónica del Caribe y la Norteamericana; posteriormente el viento, lluvia y mareas desgastaron la roca volcánica depositándose en las base de las montañas produciendo los llanos costeros; éstos, a su vez, interaccionaban con los sedimentos marinos y, además, el choque de las placas continuó elevando cientos de metros la Isla, incorporándose a la isla parte del fondo marino, produciendo terrenos calizos. Así, a pesar de su tamaño pequeño, es uno de los países más interesantes para el estudio de suelos, pues se encuentran casi todos los principales grandes grupos de suelos del planeta (Figura 98). Por lo tanto, en este ensayo se utilizaron tres tipos diferentes de suelos (inceptidoles, etisoles y mollisoles) para ver si estos suelos tienen algún efecto en el desarrollo de las plantas. En la Figura 98 se muestra la localidad de dónde fueron aislados éstos y cabe mencionar que el suelo etisol fue tomado a 32m de la costa, por tanto, puede contener una cantidad salina mayor. El suelo fue recolectado y añadidos en macetas para cultivar las plantas de garbanzo.

Retomando el tema del origen geológico de la Isla, en esta ocasión su orografía ha propiciado que se generen diversos microclimas. Por ejemplo, se puede tener un bosque húmedo tropical (Bosque del Estado) y a unos 22km tener un bosque seco (Bosque Seco de Guánica), donde éste último recibe unas 2,5 veces menos de precipitación anual. Por consiguiente, dichos microclimas difieren en precipitaciones (Figura 99), temperaturas (Figura 100), evapotranspiración (Figura 101), además de humedad y radiación solar. Por lo tanto, se seleccionaron dos zonas con microclima diferente para ver su efecto sobre los garbanzos inoculados con las cepas FCAP 30 y FSZ 50. Las zonas seleccionadas se identifican en la Figura 99, específicamente en el pueblo de Villalba (área de temperaturas más bajas y mayor precipitación) la cual denominaremos Zona A y Ponce (zona más cálida y menor precipitación) Zona B.

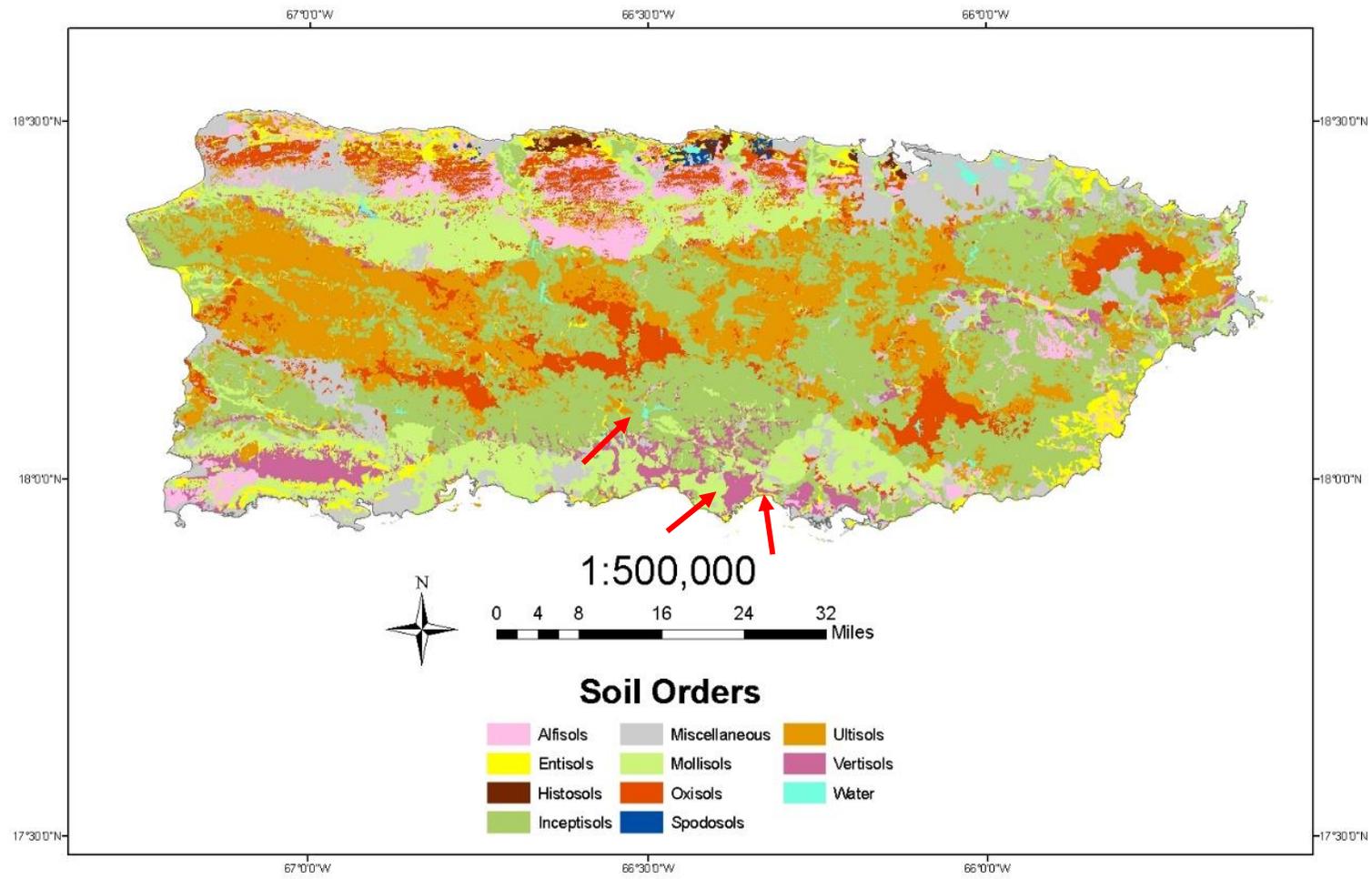


Figura 98: Diversidad de suelos en Puerto Rico. Las fechas indican los lugares de donde se obtuvo el suelo para realizar los ensayos.

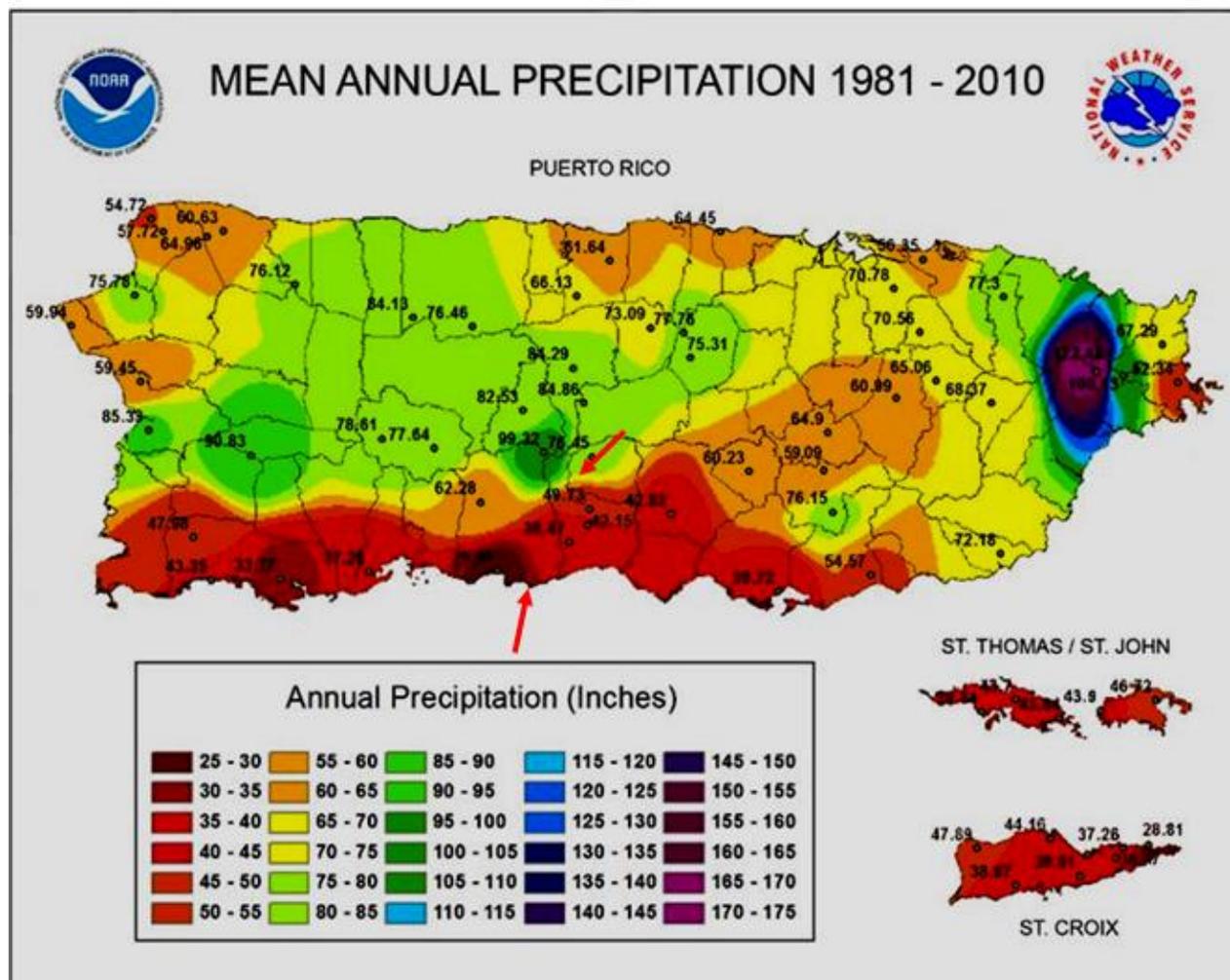


Figura 99: Precipitaciones anuales en diversas regiones de Puerto Rico. Las flechas identifican las zonas donde se colocarán las plantas.

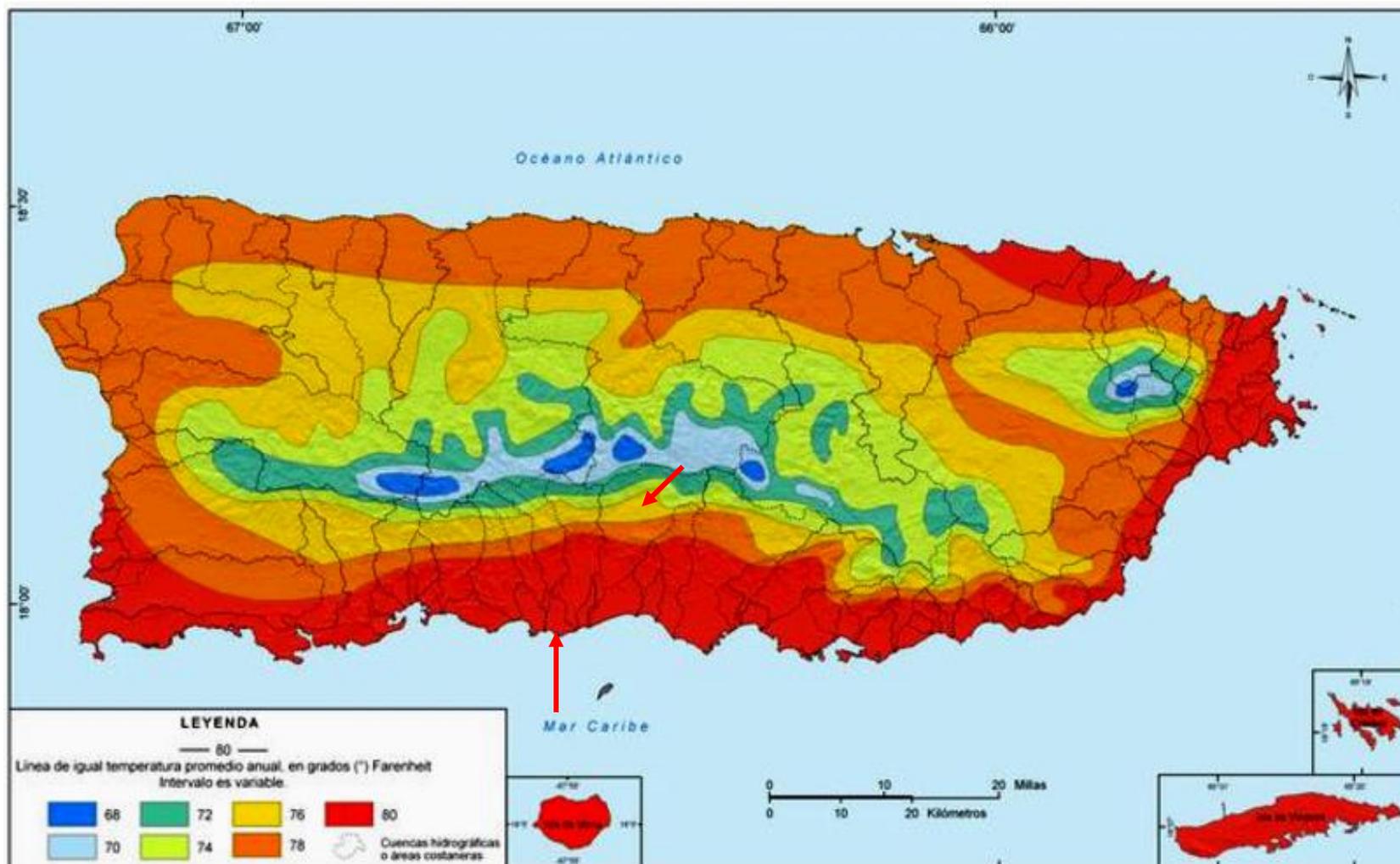


Figura 100: Temperatura promedio anual en diversas regiones de Puerto Rico. Las flechas identifican las zonas donde se colocarán las plantas.

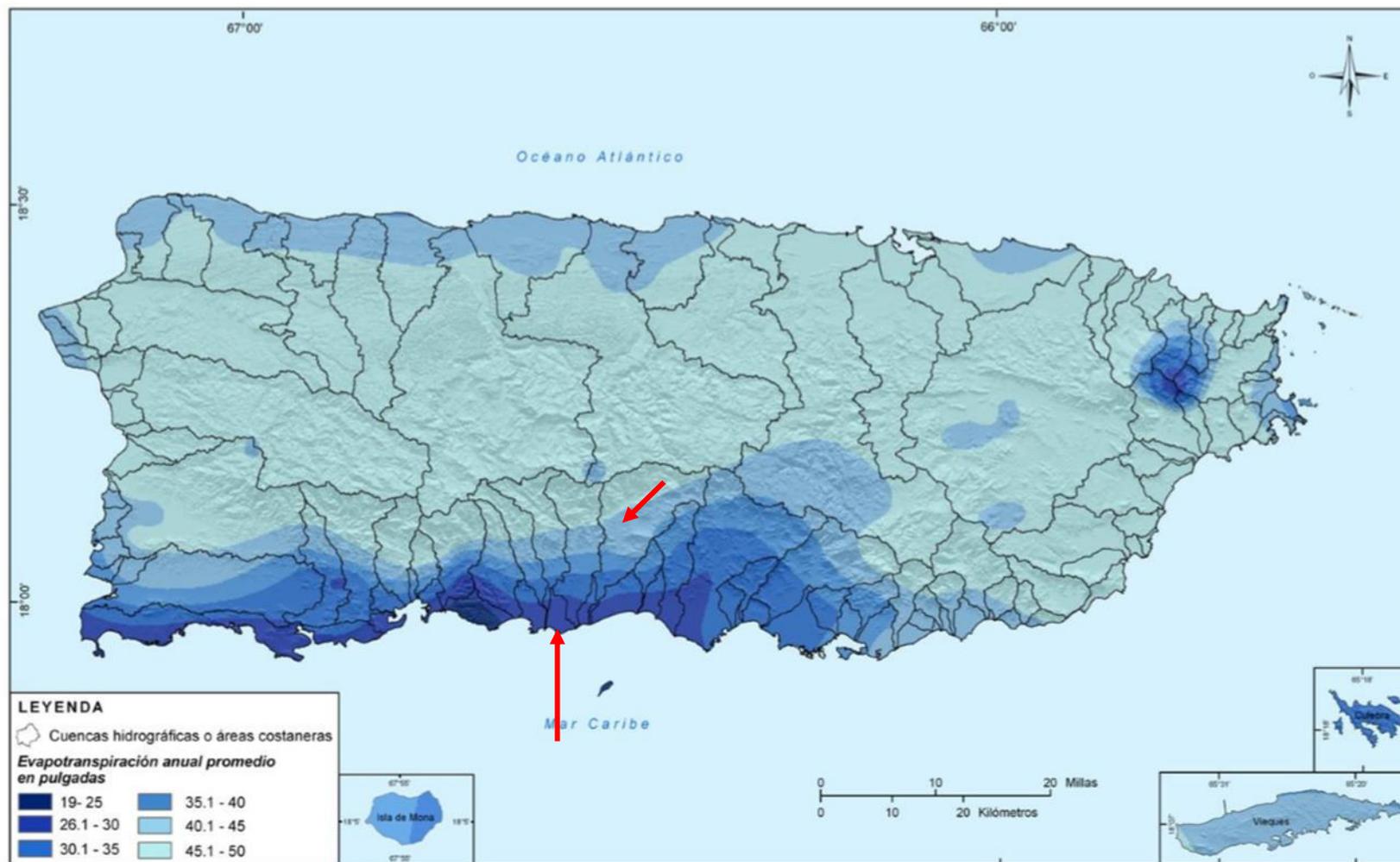


Figura 101: Evapotranspiración anual en diversas regiones de Puerto Rico. Las flechas identifican las zonas donde se colocarán las plantas.

En primer lugar, analizaremos las características de las plantas colocadas en la zona de menores temperaturas (Zona A). Las medias de temperaturas registradas fueron de 25,2°C. Referente a las precipitaciones durante el periodo del ensayo, al menos cada 3 días llovía con cantidades recolectadas inferiores a 23mm, a excepción de dos eventos de lluvias fuertes a los 4 y 9 días tras la inoculación de las plantas, donde se registraron 5,3 y 3,3 mm de precipitación, respectivamente. La Figura 102 muestra una planta representativa de cada tratamiento. Analizando los gráficos, en la Figura 103 observamos que no se muestran diferencias significativas en longitud aérea entre los tratamientos de las plantas crecidas en suelos inceptioles ni molisol. En cambio, en un suelo etisol (éste fue colectado cerca del mar) sí se observa que las plantas inoculadas con la cepa FSZ 50 fueron significativamente superiores. Una tendencia similar a la explicada para la longitud aérea se observa para la longitud radicular, lo único que en este caso en el suelo etisoles, ambos inoculantes fueron significativos respecto al control, aunque no entre ellos, Figura 104.



Figura 102. Plantas crecidas en Puerto Rico, en área de temperaturas de 25°C y mayor precipitación. A, B y C son plantas cultivadas en suelo inceptioles; D, E y F en suelo molisol; G, H e I en suelo etisol (cerca de la costa marítima). A, D y G son plantas controles sin inocular; B, E y H son plantas inoculadas con la cepa FCAP 30; C, F e I son plantas inoculadas con la cepa FSZ 50. Barra roja representa 30cm.

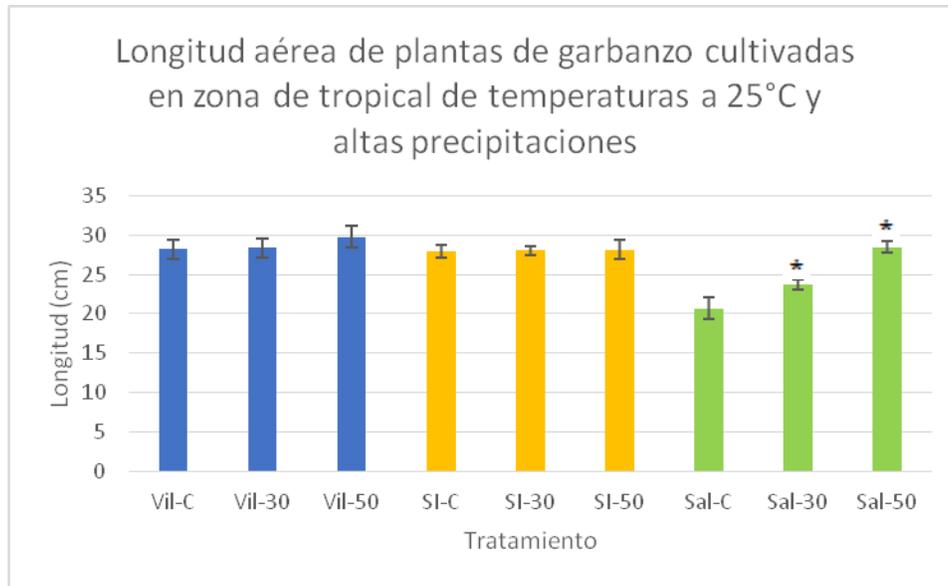


Figura 103. Longitud aérea de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de constantes precipitaciones y temperaturas de 25°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SIC- Suelo molisol sin inocular, SI-30- suelo molisol e inoculado con FCAP 30, SI-50 suelo molisol e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50. El * sobre la barra significa que son significativos respecto al control.

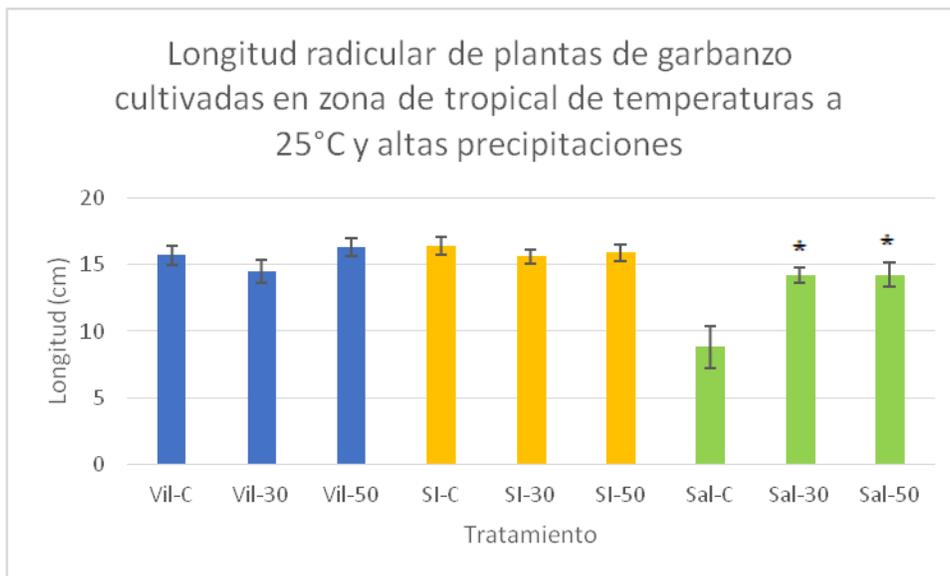


Figura 104. Longitud radicular de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de constantes precipitaciones y temperaturas de 25°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SIC- Suelo molisol sin inocular, SI-30- suelo

molisol e inoculado con FCAP 30, SI-50 suelo molisol e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50. El * sobre la barra significa que son significativos respecto al control.

Referente a la cantidad de nódulos, solo las plantas inoculadas con la cepa FSZ 50 lograron generarlos, aunque no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tipos de suelo. Para los suelos inceptidoles, molisol y etisoles fueron $3,7\pm 0,8$, $3,7\pm 1,1$ y $3,1\pm 0,8$. Analizando la biomasa aérea, mediante el peso seco aéreo sí se muestran diferencias significativas. Para el caso de las plantas cultivadas en inceptidoles la inoculación con la cepa FCAP 30 fue significativamente inferior al compararla con la FSZ 50. Para el suelo molisol no hubo diferencias significativas entre los inoculantes y el control. En cambio, para el suelo etisoles ambos inoculantes produjeron mayor biomasa aérea que el control, figura 105. En el caso del peso seco radicular no hubo diferencias para los suelos inceptidoles ni molisol. En cambio para etisoles ambos inoculantes generaron más biomasa radicular que las plantas sin inocular, figura 106.

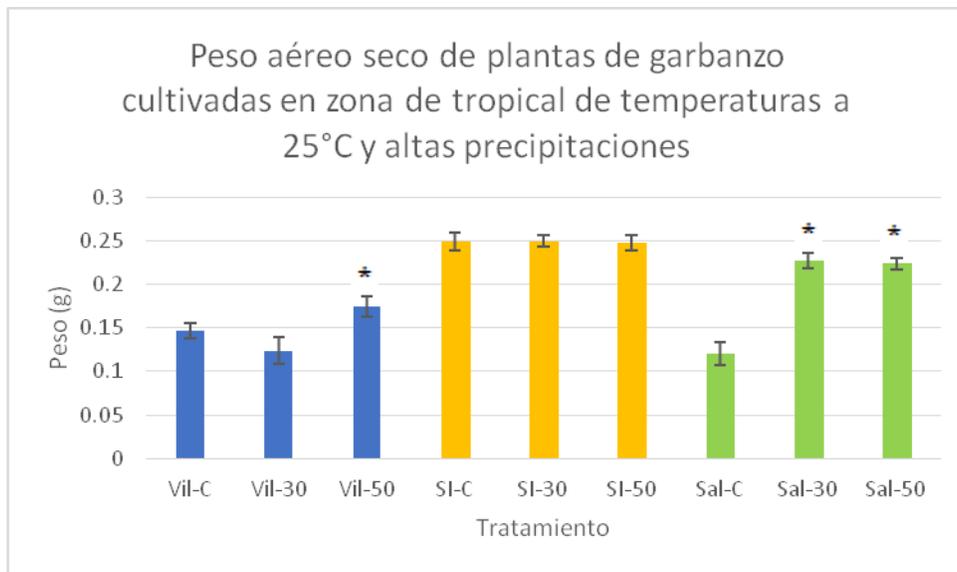


Figura 105. Peso seco aéreo de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de constantes precipitaciones y temperaturas de 25°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SIC- Suelo molisol sin inocular, SI-30- suelo molisol e inoculado con FCAP 30, SI-50 suelo molisol e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50. El * sobre la barra significa que son significativos respecto al control.

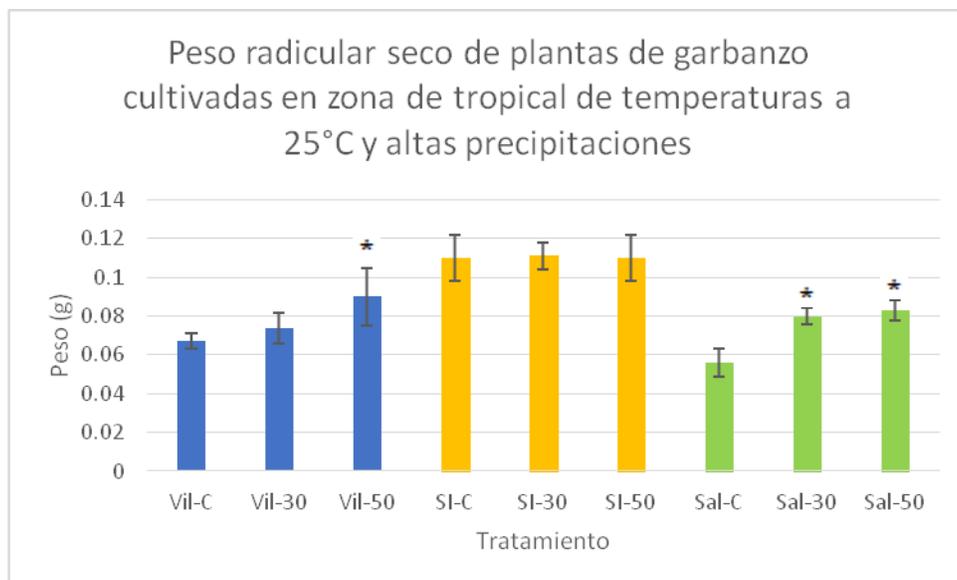


Figura 106. Peso seco radicular de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de constantes precipitaciones y temperaturas de 25°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SIC- Suelo molisol sin inocular, SI-30- suelo molisol e inoculado con FCAP 30, SI-50 suelo molisol e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50. El * sobre la barra significa que son significativos respecto al control.

Por otro lado, un segundo grupo de plantas fue colocado en una zona más cálida, con temperaturas de 36,7°C y de menores precipitaciones (zona B). En este caso, sólo se registraron 5 precipitaciones durante todo el ensayo, siendo las más considerables las surgida a los 4 y 9 días luego de la inoculación (similar a las de la otra zona A, ya que se trató de un evento climatológico que afectó a gran parte de la Isla) con 35mm y 21mm respectivamente. En las restantes 3 precipitaciones se recolectaron menos de 15mm.

Al ser comparadas con las de la otra zona la parte aérea de estas plantas era muy inferior y, en contraste, en esta zona cálida su sistema radicular se desarrolló más que las de temperaturas más bajas. Además, muy pocas de estas plantas crecidas a temperaturas mayores y cultivadas en suelo molisol se desarrollaron, haciendo inviable la realización de los análisis estadísticos correspondientes, por tanto, no se incluirán en esta sección. Referente a las longitudes aéreas y radiculares, además del peso seco aéreo, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, (Figuras 108-110).

En el caso del peso seco radicular (Figura 111) para el suelo inceptidoles no se observa diferencias entre el control y los inoculantes, en cambio, en el suelo etisoles el control fue significativamente superior a los inoculantes.



Figura 107. Plantas crecidas en Puerto Rico, en área de temperaturas mayores a 35°C y menor precipitación. A, B y C son plantas cultivadas en suelo inceptioles; D, E y F en suelo etisol (cerca de la costa marítima). A y D son plantas controles sin inocular; B y E son plantas inoculadas con la cepa FCAP 30; C y F son plantas inoculadas con la cepa FSZ 50. Barra roja representa 30cm.

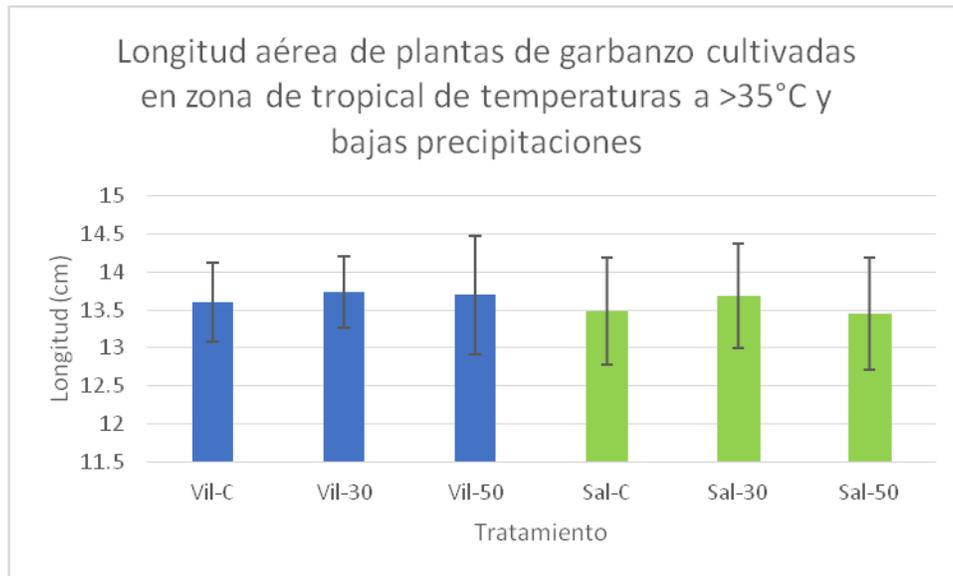


Figura 108. Longitud aérea de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de escasas precipitaciones y temperaturas de mayores 35°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50.

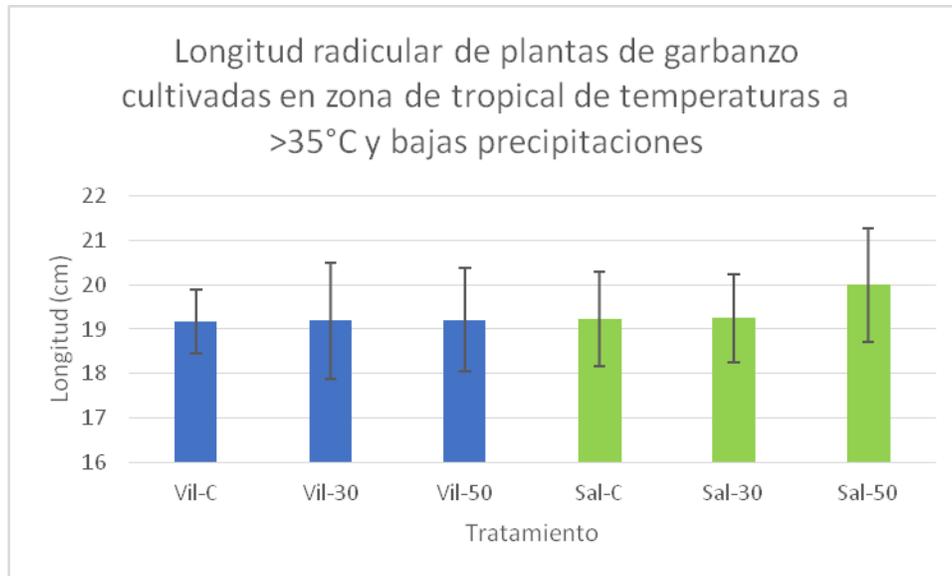


Figura 109. Longitud radicular de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de escasas precipitaciones y temperaturas de mayores 35°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50.

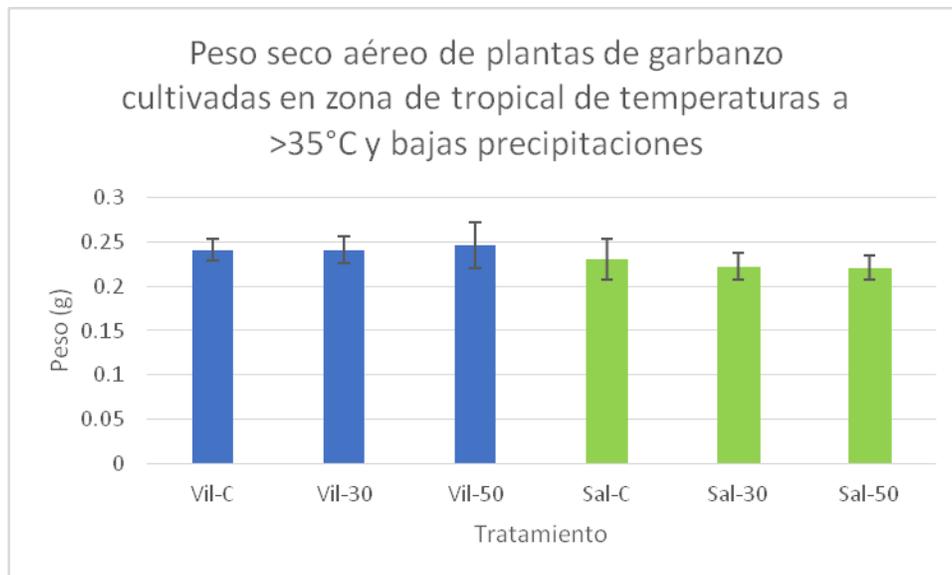


Figura 110. Peso seco aéreo de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de escasas precipitaciones y temperaturas de mayores 35°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50.

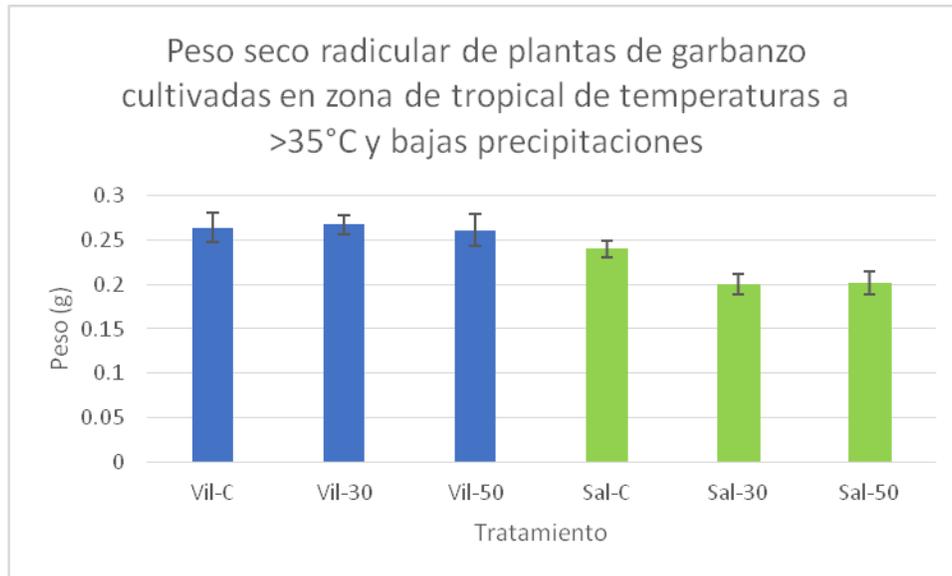


Figura 111. Peso seco radicular de las plantas de garbanzo crecidas en una zona tropical en un microclima de escasas precipitaciones y temperaturas de mayores 35°C. VilC- Suelo Inceptidoles sin inocular, Vil-30- suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 30, Vil-50 suelo Inceptidoles e inoculado con FCAP 50; SalC- Suelo etisoles sin inocular, Sal-30- suelo etisoles e inoculado con FCAP 30, sal-50 suelo etisoles e inoculado con FCAP 50.

3.2. Análisis genómico de cepas seleccionadas

Además de lo observado en el desarrollo de las plantas en diferentes microclimas y suelos, se procedió a la secuenciación de los genomas de las cepas de *Mesorhizobium* sp. FCAP 30 y FSZ 50. Conforme a los resultados generales obtenidos mediante el programa RAST 4.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) y analizado entre ambas cepas (Tabla 54 y Figura 112), se observa la alta similitud genética de ambas cepas a nivel general. Conforme a lo observado específicamente en los suelos etisoles colectado a 32m de distancia al mar, nos centraremos a evaluar genes envueltos en respuesta a estrés osmótico. En este caso, la cantidad de genes identificados por el RAST fueron los mismos para ambas cepas y al evaluar el porcentaje de similitud entre ellas mediante alineamiento, encontramos que todos ellos tienen un 100% de similitud, tabla 55. Así pues, se confirma la tendencia observada al analizar los genes *housekeeping* de la similitud de ambas cepas a pesar que se aislaron con 14 años de diferencia. Por lo tanto, las cepas se han mantenido estables por su adaptabilidad al suelo y al cultivo tradicional de garbanzo que se siembra en el área de Fuentesauco, Zamora. Por tanto, esta especie persiste y no ha sido desplazada por otras. Existe la posibilidad que el nicho que le ofrece el nódulo hubiera reducido el potencial efecto climático que se ha producido, como el mayor número de días de sequía y días de

temperatura más altas que los observados en años anteriores. De hecho, la tendencia que presenta la Agencia Estatal de Meteorología sobre Zamora es que las temperaturas continuarán aumentando, se ampliarán las olas de calor y disminuirán los días de lluvias (Figura 113). Por tanto, resultaría interesante ver en los próximos años si se logra recuperar otra cepa filogenéticamente cercana a éstas y estudiar si está presentando algunos cambios.

Tabla 54. Comparativa de los genomas FCAP 30 y FSZ 50

Característica /Grupos de genes	FCAP 30	FSZ 50
Pares de base	6,577,371	6,577,549
G+C	62,2%	62,2%
Cofactores, Vitaminas, Grupos prostéticos, Pigmentos	206	206
Pared celular y cápsula	24	24
Virulencia, enfermedad y defensa	61	61
Metabolismo de potasio	14	13
Fotosíntesis	0	0
Misceláneas	31	31
Fago, Profago, transporte de elemento, plásmido	0	0
Transporte de membrana	156	156
Adquisición de hierro y metabolismo	10	10
Metabolismo RNA	41	41
Nucleósidos y nucleótidos	128	128
Metabolismos de proteínas	179	179
Motilidad y quimiotaxis	0	0
Regulación y señalización celular	55	54
Metabolitos secundarios	6	6
Metabolismo DNA	105	105
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	47	47
Metabolismo de nitrógeno	49	49
Dormancia y esporulación	1	1
Respiración	137	137
Respuesta a estrés	92	92
Metabolismo de compuestos aromáticos	20	20
Aminoácidos y derivados	454	454
Metabolismo de azufre	41	41

Característica /Grupos de genes	FCAP 30	FSZ 50
Metabolismo de fósforo	39	39
Carbohidratos	419	419

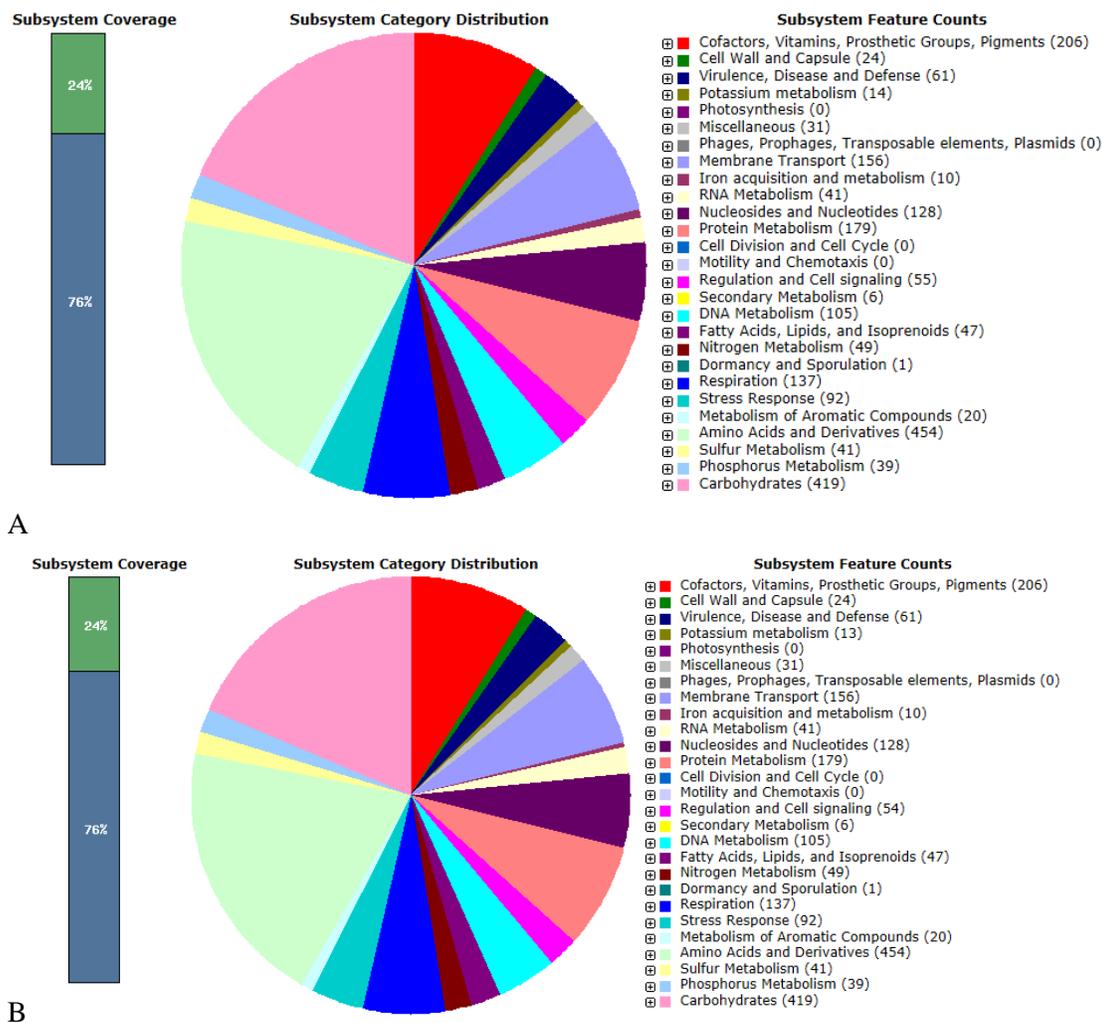


Figura 112. Muestra la división de algunos de los genes relacionados a subsistemas. A. FCAP 30; B. FSZ 50.

Tabla 55. Porcentaje de similitud entre genes relacionados con el estrés osmótico entre las cepas FCAP 30 y FSZ 50

Subsistema	Papel	% de similitud
Osmoregulation	Aquaporin Z	100%

Subsistema	Papel	% de similitud
Osmoprotectant ABC transporter YehZYXW of Enterobacteriales	Osmoprotectant ABC transporter permease protein YehY	100%
Osmoprotectant ABC transporter YehZYXW of Enterobacteriales	Osmoprotectant ABC transporter inner membrane protein YehW	100%
Osmoprotectant ABC transporter YehZYXW of Enterobacteriales	Osmoprotectant ABC transporter binding protein YehZ	100%
Osmoprotectant ABC transporter YehZYXW of Enterobacteriales	Osmoprotectant ABC transporter ATP-binding subunit YehX	100%
Synthesis of osmoregulated periplasmic glucans	Cyclic beta-1,2-glucan synthase (EC 2.4.1.-)	100%
Synthesis of osmoregulated periplasmic glucans	Beta-(1-->2)glucan export ATP-binding/permease protein NdvA (EC 3.6.3.42)	100%
Synthesis of osmoregulated periplasmic glucans	OpgC protein	100%
Synthesis of osmoregulated periplasmic glucans	Cyclic beta-1,2-glucan modification transmembrane protein	100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, glycine betaine-binding protein OpuAC	100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Sarcosine oxidase gamma subunit (EC 1.5.3.1)	100%
		100%
		100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Sarcosine oxidase alpha subunit (EC 1.5.3.1)	100%
		100%
		100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, ATP-binding protein OpuAA (EC 3.6.3.32)	100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Sarcosine oxidase beta subunit (EC 1.5.3.1)	100%
		100%
		100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Choline-sulfatase (EC 3.1.6.6)	100%
		100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Betaine aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8)	100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Sarcosine oxidase delta subunit (EC 1.5.3.1)	100%
		100%
		100%

Subsistema	Papel	% de similitud
		100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Glycine betaine ABC transport system, permease protein OpuAB	100%
Choline and Betaine Uptake and Betaine Biosynthesis	Choline dehydrogenase (EC 1.1.99.1)	100%

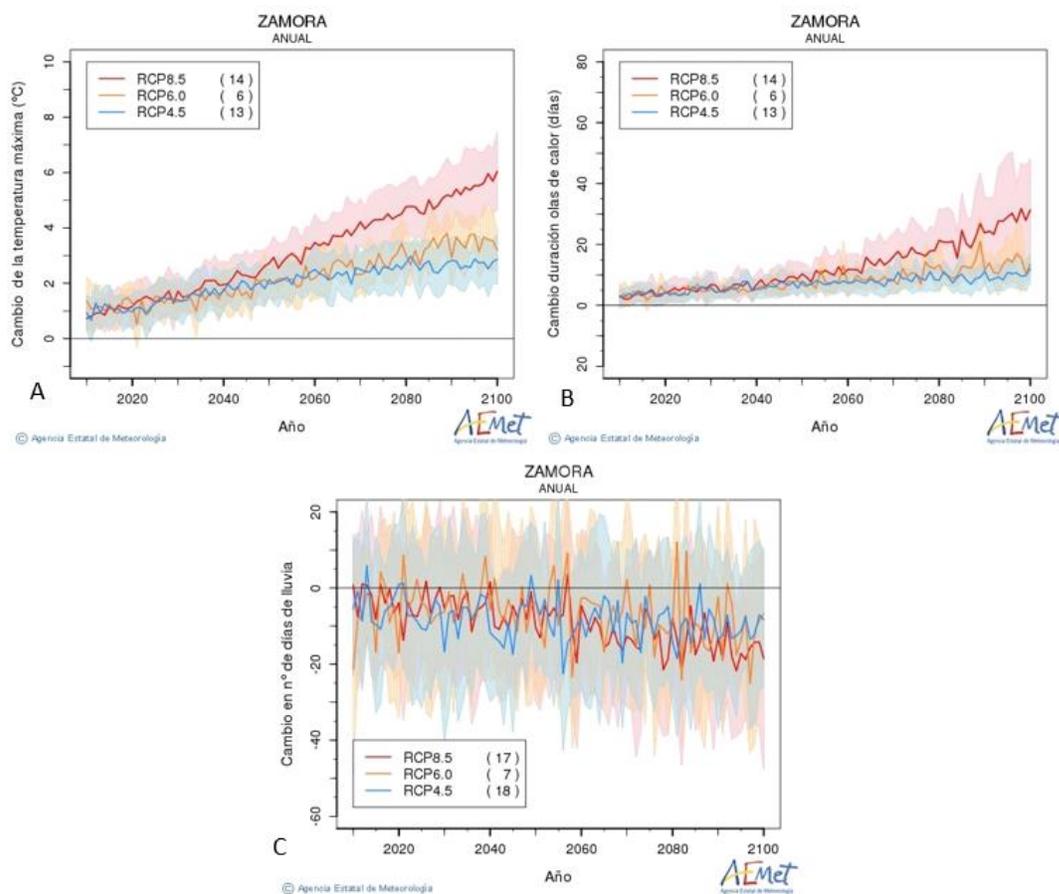


Figura 113. Proyecciones climáticas para Zamora respecto a: A. Temperaturas máximas, B.

DISCVSIÓN GENERAL

Discusión General

El garbanzo es una de las leguminosas más importantes, siendo la tercera más cultivada en el mundo. Sin embargo, al no considerarse una planta modelo, sus investigaciones no han avanzado tanto como otras leguminosas de menor producción que sí son consideradas plantas modelo o interaccionan con microorganismos modelo. En esta investigación se profundizó en el estudio de microorganismos que habitan en el interior de los nódulos de plantas de garbanzo, cuáles son sus potenciales capacidades para fomentar el crecimiento vegetal, cómo logran mejorar la producción de garbanzo y el contenido de nitrógeno, además del análisis de otras capacidades biotecnológicas para su uso en procesos de biorremediación.

Así pues, una vez realizado los diferentes análisis genotípicos, se pudo corroborar la diversidad microbiana presente en los nódulos de *Cicer arietinum* L. Incluso se identificaron al menos 5 grupos filogenéticamente diversos de *Mesorhizobium* sp., lo cual constituye una de las mayores diversidades de bacterias que nodulan garbanzo encontradas en un mismo suelo. A lo largo de los años, el proceso de domesticación de esta planta ha propiciado que disminuya la biodiversidad. Esto fue determinado por un trabajo realizado por Kim y colaboradores (2014) donde encontró que al analizar plantas de *Cicer arietinum* L. y de las especies salvajes *C. reticulatum* y *C. bijugum*, con diversos genes housekeeping hallaron más de un 60% de simbioses en plantas salvajes que en el garbanzo domesticado. Si bien es cierto, que la domesticación puede disminuir la biodiversidad microbiana, en esta investigación se ha demostrado que la nodulación no es tan limitada como se creía.

Por otra parte, no solo se demuestra la diversidad bacteriana presente en los nódulos, sino que algunas de esas cepas poseen la capacidad para fomentar el crecimiento vegetal demostrado de forma *in vitro*. Así pues, un estudio comparativo con parte de esta tesis por la similitud de la metodología utilizada fue la realizada por Jida & Assefa (2012) en Etiopía, donde se seleccionaron rizobios noduladores de garbanzo en diferentes suelos etíopes. En este sentido ellos determinaron que de sus cepas de *Mesorhizobium* el 27,8% fueron capaces de producir la fitohormona IAA, en nuestro caso el 53% de las cepas lo produjo. Por otro lado, el 44,4% de sus cepas fueron solubilizadoras de fosfato, en comparación con las mostradas en esta tesis, que el 97% fue capaz de solubilizarlo. Por tanto, se puede comparar la capacidad de algunos mecanismos PGPR donde en un solo suelo (Fuentesauco) fue mayor que en diversos suelos etíopes. Claro está que la presión selectiva juega un papel importante en las características de los microorganismos en diversos lugares, ya que ellos determinaron que el 14% de sus rizobios mostraron capacidad antagonista contra *Fusarium*, y en nuestro caso ninguno de los *Mesorhizobios* mostró esta característica.

Después de evaluar el potencial PGPR de forma *in vitro*, se determinó que la combinación de la cepa *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 con la cepa *Bacillus halotolerans* FSZ 47, es capaces de fomentar el crecimiento de las plantas de garbanzo, además, logran incrementar los contenidos de carbono y nitrógeno presentes en el suelo. Por lo tanto, ese nitrógeno puede fomentar el crecimiento de un segundo cultivo en rotación con el garbanzo, que en nuestro caso sería el trigo. Parece evidente, que algunas co-inoculaciones

Discusión General

seleccionadas pueden aumentar algunos microelementos esenciales en semillas que sirven como co-factores enzimáticos, lo que podría colaborar en la reducción de la cantidad de fertilizantes nitrogenados añadido a los suelos. La utilización de garbanzo con trigo se ha estudiado ampliamente, sin embargo, son pocos los que mencionan la inoculación de microorganismos específicos con potencial PGPR para esta rotación. Mas bien, estas investigaciones de rotación garbanzo-trigo se centran en diferentes dosis de fertilizantes nitrogenados, periodos de barbecho, una tercera planta u otra técnica agrícola. Por ejemplo, un estudio de rotación de garbanzo y trigo fue realizado por Danga y colaboradores (2010) en Kenia, donde después de 3 años, se logró aumentar un 19% más de nitrógeno en el suelo, además se mejoró la absorción de este elemento en trigo, aumentando el rendimiento un 39%, todo teniendo como variable la humedad una región tropical.

No resulta extraño que se estudie la interacción de bacterias de otros géneros con las poblaciones normales de rizobios de garbanzo. En nuestro caso observamos una buena colonización de *Mesorhizobium* sp FCAP 26 en conjunto con *Bacillus halotolerans* FSZ 47, con la cual se logró incrementar el crecimiento, desarrollo y producción bajo condiciones de invernadero. Así pues, conforme a los resultados obtenidos podemos proponer especies de *Bacillus* como biofertilizantes de garbanzo como *B. halotolerans* FSZ 47 o *B. arybhatai* FSZ 43. Existen otros trabajos que han utilizado especies del género *Bacillus* por ser buenos solubilizadores de fosfato, por ejemplo; *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* (Pereira et al., 2010). Otro microorganismo utilizado en la co-inoculación con *Mesorhizobium* en garbanzo ha sido *Pseudomonas argentinensis*, la cual mejoró el rendimiento de garbanzo en un 12,9% respecto a su control sin inocular, y un 5% solo con *Mesorhizobium* sp LGR33 (Sharma et al., 2013). Ya se han realizado estudios donde se evalúa incluso interacciones tripartitas entre *Paenibacillus lentimorbus*, *Piriformospora indica* (hongo) y los rizobios nativos de *Cicer arietinum* L, encontrando que se ha mejorado las nodulaciones y el crecimiento de las plantas (Nautiyal et al., 2010). También se ha utilizado *Pantoea cypripedii*, *Enterobacter aerogenes* y *Mesorhizobium ciceri*; siendo *P. cypripedii* un excelente solubilizador de fosfato, aumentando en un 53% la captación del fósforo total (Singh et al., 2014). En fin, existen varios trabajos donde las co-inoculaciones pueden aumentar el número de nódulos y producir una mayor biomasa aérea en plantas de garbanzo (Suneja et al., 2014), incluso añadiendo micorrizas (Saini et al., 2004). Pero son pocos los que los evalúan para ser rotados con otra planta.

Por otro lado, uno de los puntos destacables de esta investigación fue que se encontró una cepa capaz de inhibir el crecimiento de diferentes especies de *Fusarium*. El cultivo de garbanzo es susceptible a diferentes enfermedades fúngicas, bacterianas y virales, donde el rango de pérdida en rendimiento puede alcanzar de 5-10% en zonas templadas y en regiones tropicales desde 50% hasta un 100% de pérdidas (Dubey et al., 2007). Entre los fitopatógenos más preocupantes está la subespecie *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, reportándose en al menos 33 países causa pérdidas muy relevantes. India el mayor productor de garbanzo lo ha documentado, causando pérdidas anuales de un 10%. Sin embargo, si se desarrolla temprano en la planta, las pérdidas alcanzan 77-94%, aunque en un desarrollo más tardío también puede causar problemas serios con un porcentaje del 24% al 65% en pérdidas (Dubey et al., 2007). Por tanto, para resolver este problema, tradicionalmente se han utilizado fungicidas químicos, sin embargo, una investigación realizado por Kyei-Boahen (2001) determinó que algunos fungicidas comerciales pueden alterar la supervivencia de *Mesorhizobium ciceri* en

garbanzo, algunos de ellos reduciendo la nodulación (por tanto, el nitrógeno acumulado en la planta) y generando menos biomasa. Así pues, el haber identificado en este trabajo la cepa *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 con potencial biofungicida capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium* sp., estimamos que podría convertirse en una alternativa biotecnológica, ya que es capaz de coexistir en el interior del nódulo con otros endófitos de *Cicer arietinum* L., incluidos los endosimbiontes del género *Mesorhizobium*. En este sentido, sería interesante como proyecto futuro, estudiar la cepa *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28, para dilucidar la interacción que presenta con las plantas de garbanzo y sus endosimbiontes, la capacidad que tiene para ocupar el interior de los nódulos de las raíces y cómo se comportaría en plantas de garbanzo infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, especie fitopatógena de garbanzo.

Por último, otra característica interesante fue la tolerancia de la cepa *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 a algunos metales. A pesar que la cepa de *Mesorhizobium* sp. 26 no fue capaz de bioacumular más aluminio, plomo o zinc en plantas de *Erophaca baetica* L. y *Astragalus pelecinus* L., sí logró tolerarlos, colonizó el sistema radicular de las plantas y facilitó su crecimiento, por lo que potencialmente podría analizarse su empleo en la reforestación con estas leguminosas de suelos contaminados con metales. En este respecto, se ha descrito una cepa de *Mesorhizobium* sp. procedente de nódulos de garbanzo, capaz de tolerar concentraciones altas de cromo, inclusive, fomentar el crecimiento de garbanzo y aumentar su biomasa. Además, es capaz de reducir el Cr (VI) (Wani et al., 2008). Algunas cepas de *Mesorhizobium* aisladas en Etiopía han mostrado resistencia a zinc, cromo y plomo (Jida & Assefa 2012). Así pues, se confirma la tolerancia de algunas cepas de este género y su utilización en procesos de biorremediación y/o reforestación de suelos contaminados.

Conclusiones

Conclusiones

1. La diversidad de microorganismos aislados del interior de nódulos de *Cicer arietinum* L. procedentes de un único suelo, es más alta que lo esperado, tanto a nivel específico como a niveles más altos, que lo documentado hasta la fecha, ya que se han aislado un total de 7 géneros y 24 especies, no habiéndose descrito los géneros *Aneurinibacillus*, *Domibacillus* o *Sphaerisporangium* como endófitos de nódulos de garbanzo y habiéndose encontrado una potencial nueva especie del género *Domibacillus*, por lo que los nódulos de *Cicer arietinum* L. se proyectan como una fuente todavía por explorar de biodiversidad bacteriana.
2. A raíz de los resultados obtenidos del análisis filogenético de los genes 16S ARNr, *rec A*, *glnII*, *rpoB* y *atpD*, se ha demostrado la existencia de al menos 5 grupos filogenéticamente divergentes del género *Mesorhizobium*, por que la diversidad de endosimbiontes de *Cicer arietinum* L. es mucho mayor a la esperada y documentada. Por tanto, se amplía la cantidad de potenciales endosimbiontes naturales del género *Mesorhizobium* capaces de nodular las plantas de *Cicer arietinum* L.
3. Las cepas de *Mesorhizobium ciceri* FCAP 04 y *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 son capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas, incrementar el rendimiento y producción de cultivos de garbanzo en campo, sin afectar el contenido nutricional del grano, por lo que potencialmente se erigen cómo biofertilizantes adecuados para este cultivo.
4. La co-inoculación conjunta de la cepa *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 y *Bacillus halotolerans* FSZ 47 ha permitido aumentar la biomasa y la producción de semillas de garbanzo, además de incrementar los niveles de carbono y nitrógeno en el suelo, por lo tanto, son buenos candidatos para diseñar y desarrollar biofertilizantes eficientes para *Cicer arietinum* L.
5. Las diferentes co-inoculaciones de las cepas *Mesorhizobium ciceri* FCAP 04 y *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 con *Bacillus aryabhatai* FSZ 43 y *Bacillus halotolerans* FSZ 47 son capaces de colonizar el sistema radicular de las plantas de trigo y aumentar el contenido de algunos micronutrientes como el hierro, manganeso y zinc en granos, por lo tanto se puede determinar que estos inoculantes pueden servir para otros cultivos como el trigo al ser rotado con garbanzo.
6. Por primera vez se ha encontrado la bacteria *Aneurinibacillus migulanus* en el interior de nódulos de *Cicer arietinum* L., lo que unido a que la cepa FSZ 28 de esta especie posee capacidad antifúngica contra especies de *Fusarium*, la convierte en un potencial candidato para ser utilizada como potencial agente biofungicida para este cultivo.

Conclusiones

7. La coinoculación de *Mesorhizobium sp.* FCAP 26 y micorrizas (*Rhizopogon spp.*, *Scleroderma spp.*, *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* y *Glomus mosseae*) ha mejorado el crecimiento de *Astragalus pelecinus* L. en suelos con altas concentraciones de aluminio, plomo y zinc, por lo que esta combinación podría ser potencialmente útil en la reforestación de áreas con suelos contaminados con metales pesados, facilitando el incremento de la cobertura vegetal y mejorando el entorno.

Bibliografía

Bibliografía

Aaronson, R.P., Woo, E. (1981). Organization in the cell nucleus: divalent cations modulate the distribution of condensed and diffuse chromatin. *Journal of Cell Biology*; vol 90, 181-186.

Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Martínez, O. A., Menezes-Blackburn, D., Fernández, M. T., Marschner, P., ... & Mora, M. L. (2011). Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of soil science and plant nutrition*, 11(3), 1-12.

Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in microbiology*, 17(1), 37-45.

Ahemad, M., & Khan, M. S. (2012). Effects of pesticides on plant growth promoting traits of *Mesorhizobium* strain MRC4. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11(1), 63-71.

Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research*, 163(2), 173-181.

Alenezi, F. N., Fraser, S., Bełka, M., Doğmuş, T. H., Heckova, Z., Oskay, F., ... & Woodward, S. (2016). Biological control of *Dothistroma* needle blight on pine with *Aneurinibacillus migulanus*. *Forest Pathology*, 46(5), 555-558.

Alenezi, F. N., Rekik, I., Chenari Bouket, A., Luptakova, L., Weitz, H. J., Rateb, M. E., ... & Belbahri, L. (2017). Increased biological activity of *Aneurinibacillus migulanus* strains correlates with the production of new gramicidin secondary metabolites. *Frontiers in microbiology*, 8, 517.

Alexander, D. B., & Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils*, 12(1), 39-45.

Alexandre, A., Brígido, C., Laranjo, M., Rodrigues, S., & Oliveira, S. (2009). Survey of chickpea rhizobia diversity in Portugal reveals the predominance of species distinct from *Mesorhizobium ciceri* and *Mesorhizobium mediterraneum*. *Microbial ecology*, 58(4), 930-941.

Alfvén, T., Elinder, C.-G., Carlsson, M.D., et al. (2000). Low-level cadmium exposure and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*; vol 15, 1579-1586.

Amarger, N., Macheret, V., & Laguerre, G. (1997). *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 996-1006.

Andersen, J. H., Fossing, H., Hansen, J. W., Manscher, O. H., Murray, C., & Petersen, D. L. (2014). Nitrogen inputs from agriculture: Towards better assessments of eutrophication status in marine waters. *Ambio*, 43(7), 906-913

Bibliografía

Anil, L., Park, J., Phipps, R. H., & Miller, F. A. (1998). Temperate intercropping of cereals for forage: a review of the potential for growth and utilization with particular reference to the UK. *Grass and Forage Science*, 53(4), 301-317.

Araújo, J., Flores-Félix, J. D., Igual, J. M., Peix, A., González-Andrés, F., Díaz-Alcántara, C. A., & Velázquez, E. (2017). *Bradyrhizobium cajanii* sp. nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(7), 2236-2241.

Araus J, Li J, Parry M and Wang J 2014 Phenotyping and other breeding approaches for a New Green Revolution. *J Integr Plant Biol* 56, 422-424.

Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., ... & Chérif, M. (2007). Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(6-7), 470-479.

Arfaoui, A., Sifi, B., Boudabous, A., Hadrami, I. E., & Cherif, M. (2006). Identification of *Rhizobium* isolates possessing antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of *Fusarium* wilt of chickpea. *Journal of Plant Pathology*, 67-75.

Arora, N. K., Kang, S. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Current Science*, 673-677.

Arshad, M. A., & Martin, S. (2002). Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 88(2), 153-160.

Aslam, M., Mahmood, I. A., Peoples, M. B., Schwenke, G. D., & Herridge, D. F. (2003). Contribution of chickpea nitrogen fixation to increased wheat production and soil organic fertility in rain-fed cropping. *Biology and fertility of soils*, 38(1), 59-64.

Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.

Balachandar, D., Kumar, K., Arulmozhiselvan, K., & Kannaiyan, S. (2005). Influence of combined nitrogen on nitrogen transfer efficiency of immobilized cyanobacteria to rice seedlings. *Indian Journal of Microbiology*, 45(4), 257.

Bale, J. S., Van Lenteren, J. C., & Bigler, F. (2008). Biological control and sustainable food production. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1492), 761-776.

Banik, P., Midya, A., Sarkar, B. K., & Ghose, S. S. (2006). Wheat and chickpea intercropping systems in an additive series experiment: advantages and weed smothering. *European Journal of Agronomy*, 24(4), 325-332.

- Bañuelos, G.S., Ajwa, H.A., Mackey, B., et al. (1997). Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium. *Journal of Environmental Quality*; vol 26, 639-646.
- Baraúna, A. C., Rouws, L. F., Simoes-Araujo, J. L., dos Reis Junior, F. B., Iannetta, P. P., Maluk, M., ... & Zilli, J. E. (2016). *Rhizobium altiplani* sp. nov., isolated from effective nodules on *Mimosa pudica* growing in untypically alkaline soil in central Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 4118-4124.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., ... & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.
- Bashan, Y., Kamnev, A. A., & de-Bashan, L. E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils*, 49(4), 465-479.
- Bell, J. C., & Kowalczykowski, S. C. (2016). RecA: regulation and mechanism of a molecular search engine. *Trends in biochemical sciences*, 41(6), 491-507.
- Benito, P., Alonso-Vega, P., Aguado, C., Luján, R., Anzai, Y., Hirsch, A. M., & Trujillo, M. E. (2017). Monitoring the colonization and infection of legume nodules by *Micromonospora* in co-inoculation experiments with rhizobia. *Scientific reports*, 7(1), 11051.
- Berditsch, M., Afonin, S., & Ulrich, A. S. (2007). The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6620-6628.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Berg, G., Opelt, K., Zachow, C., Lottmann, J., Götz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2005). The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(2), 250-261.
- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A., & Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and environmental microbiology*, 68(7), 3328-3338.
- Berge, O., Lodhi, A., Brandelet, G., Santaella, C., Roncato, M. A., Christen, R., ... & Achouak, W. (2009). *Rhizobium alamii* sp. nov., an exopolysaccharide-producing species isolated from legume and non-legume rhizospheres. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(2), 367-372.
- Bethlenfalvay, G. J. (1994). Sustainability and rhizoorganisms in an ecosystem. *Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo*, 4, 9-10.

Bibliografía

- Bibi, F., Chung, E. J., Khan, A., Jeon, C. O., & Chung, Y. R. (2012). *Rhizobium halophytocola* sp. nov., isolated from the root of a coastal dune plant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8), 1997-2003.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4), 343-350.
- Boivin, S., Fonouni-Farde, C., & Frugier, F. (2016). How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. *Frontiers in plant science*, 7, 1240.
- Bolckmans, K. (2008). Biocontrol files. *Can Bull Ecol Pest Manag*, 13, 1-10.
- Bontemps, C., Elliott, G. N., Simon, M. F., Dos Reis Junior, F. B., Gross, E., Lawton, R. C., ... & James, E. K. (2010). Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. *Molecular ecology*, 19(1), 44-52.
- Boonsongcheep, P., Prathanturug, S., Takahashi, Y., & Matsumoto, A. (2016). *Rhizobium puerariae* sp. nov., an endophytic bacterium from the root nodules of the medicinal plant *Pueraria candollei* var. *candollei*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(3), 1236-1241.
- Brady NC, Weil RR (2002) *The nature and properties of soils*, 13th edn. Prentice Hall of India, New Delhi, 960
- Brazil, G. M., Kenefick, L., Callanan, M., Haro, A., De Lorenzo, V., Dowling, D. N., & O'gara, F. (1995). Construction of a rhizosphere pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of bph gene expression in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1946-1952.
- Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (1998). A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3663-3668.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L. (1997). Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. *Environmental Science Technology*; vol 31, 1399-1406.
- Burken, J.G., Schnoor, J.L. (1999). Distribution and volatilisation of organic compounds following uptake by hybrid poplar trees. *International Journal of Phytoremediation*; vol 1, 139-151.
- Cakmak, D., & Saljnikov, E. (2010). Effect of long-term nitrogen fertilization on main Soil chemical properties in Cambisol. In 19th World Congress of Soil Science.
- Carbonell, A.A., Burló, F.M., Mataix, J.J. (1995). Arsénico en el sistema suelo-planta. Universidad de Alicante.
- Carpanetto D and Bianchini P 2011 *Atlas Historico Del Mundo*. Tikal, Madrid.
- Carpenter, S.R.; Bennett, E.M. Reconsidering the planetary boundary for phosphorus. *Res. Lett.* 2011, doi:10.1088/1748-9326/6/1/014009

- Carvajal, M., Mota, C., Alcaraz-López, C., & Iglesias, M. (2014). Investigación sobre la absorción de CO₂ por los cultivos más representativos. Accessed Nov.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllöf, I., Holmström, C., Doolittle, W. F., & Kjelleberg, S. (2007). Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and environmental microbiology*, 73(1), 278-288.
- Casida Jr, L. E. (1982). *Ensifer adhaerens* gen. nov., sp. nov.: a bacterial predator of bacteria in soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(3), 339-345.
- Casierra-Posada, F., Poveda, J. (2005). Manganese and zinc toxicity reduce dry matter production, leaf pigment and fruit quality in strawberries (*Fragaria* sp. cv. Camarosa). *Agronomía Colombiana*; vol 23, 283-289.
- Celador-Lera, L., Menéndez, E., Peix, A., Igual, J. M., Velázquez, E., & Rivas, R. (2017). *Rhizobium zeae* sp. nov., isolated from maize (*Zea mays* L.) roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(7), 2306-2311.
- Cereales y granos. 2018. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. <http://www.fao.org/in-action/inpho/crop-compendium/cereals-grains/es/>. Recuperado el 11 de febrero de 2018.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2011). *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12), 2922-2927.
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Barrijal, S., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2012). *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. *Systematic and applied microbiology*, 35(5), 302-305.
- Chang, Y. L., Wang, J. Y., Wang, E. T., Liu, H. C., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2011). *Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lablab purpureus* and *Arachis hypogaea*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(10), 2496-2502.
- Chen, W. F., Sui, X. H., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium vignae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from multiple legume species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(3), 580-586.
- Chen, W. H., Yang, S. H., Li, Z. H., Zhang, X. X., Sui, X. H., Wang, E. T., ... & Chen, W. F. (2017). *Ensifer shofinae* sp. nov., a novel rhizobial species isolated from root nodules of soybean (*Glycine max*). *Systematic and applied microbiology*, 40(3), 144-149.
- Chen, W. M., Zhu, W. F., Bontemps, C., Young, J. P. W., & Wei, G. H. (2010). *Mesorhizobium alhagi* sp. nov., isolated from wild *Alhagi sparsifolia* in north-western China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(4), 958-962.

Bibliografía

- Chen, W. M., Zhu, W. F., Bontemps, C., Young, J. P. W., & Wei, G. H. (2011). *Mesorhizobium camelthorni* sp. nov., isolated from *Alhagi sparsifolia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(3), 574-579.
- Chen, W. X., Li, G. S., Qi, Y. L., Wang, E. T., Yuan, H. L., & Li, J. L. (1991). *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(2), 275-280.
- Chen, W. X., Tan, Z. Y., Gao, J. L., Li, Y., & Wang, E. T. (1997). *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 870-873.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X., & Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 153-159.
- Cheng HP, Walker GC (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180:5183–5191.
- Cheng, Z., Park, E., & Glick, B. R. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(7), 912-918.
- Conway G and Barbie E 1988 After the Green Revolution: sustainable and equitable agricultural development. *Futures* 20, 651-670.
- Cordeiro, A. B., Ribeiro, R. A., Helene, L. C. F., & Hungria, M. (2017). *Rhizobium esperanzae* sp. nov., a N₂-fixing root symbiont of *Phaseolus vulgaris* from Mexican soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(10), 3937-3945.
- Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology*, 15(3), 137-140.
- Cournoyer, B., & Lavire, C. (1999). Analysis of *Frankia* evolutionary radiation using *glnII* sequences. *FEMS microbiology letters*, 177(1), 29-34.
- Crovadore, J., Cochard, B., Calmin, G., Chablais, R., Schulz, T., & Lefort, F. (2016). Whole-genome sequence of *Mesorhizobium hungaricum* sp. nov. strain UASWS1009, a potential resource for agricultural and environmental uses. *Genome announcements*, 4(5), e01158-16.
- Cruz-González, X., Laza-Pérez, N., Mateos, P. F., & Rivas, R. (2017). Analysis and effect of the use of biofertilizers on *Trifolium rubens* L., a preferential attention species in Castile and Leon, Spain, with the aim of increasing the plants conservation status. *AIMS Microbiology*, 3(4): 733-746
- Cruz-Quiroz, R. D., Chavez, C., Hernandez, M., Rodriguez, R., Hernandez, D., & Aguilar, C. N. (2011). Antagonist capacity of newly isolated strains of *Pseudomonas fluorescens*

against three important phytopathogenic bacteria. *American Journal of Agricultural and Biological Science*. 6 (2): 267-272

da Costa, E. M., Guimarães, A. A., de Carvalho, T. S., Rodrigues, T. L., de Almeida Ribeiro, P. R., Lebbe, L., ... & de Souza Moreira, F. M. (2018). *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Archives of Microbiology*, 1-10.

da Costa, E. M., Guimarães, A. A., Vicentin, R. P., de Almeida Ribeiro, P. R., Leão, A. C. R., Balsanelli, E., ... & de Souza Moreira, F. M. (2017). *Bradyrhizobium brasiliense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Archives of microbiology*, 199(8), 1211-1221.

da Silva, K., De Meyer, S. E., Rouws, L. F., Farias, E. N., dos Santos, M. A., O'Hara, G., ... & Zilli, J. E. (2014). *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), 3395-3401.

Dall'Agnol, R. F., Ribeiro, R. A., Delamuta, J. R. M., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Andrade, D. S., ... & Hungria, M. (2014). *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 3222-3229.

Danga, B. O., Ouma, J. P., Wakindiki, I. I. C., & Bar-Tal, A. (2010). Chickpea-wheat rotation for higher production in a humid tropical region. *Agronomy journal*, 102(2), 363-371.

Dangeard, P. A. (1926). *Recherches sur les tubercules radicaux des légumineuses*. Ed. du botaniste.

Das, K., Rajawat, M. V. S., Saxena, A. K., & Prasanna, R. (2017). Development of *Mesorhizobium ciceri*-based biofilms and analyses of their antifungal and plant growth promoting activity in chickpea challenged by *Fusarium* wilt. *Indian journal of microbiology*, 57(1), 48-59.

de Lajudie, P., Laurent-Fulele, E., Willems, A., TOREK, U., Coopman, R., Collins, M. D., ... & Gillis, M. (1998). *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(4), 1277-1290.

de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., ... & Dreyfus, B. (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 369-382.

De Lajudie, Philipp. E., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, D., Maestrojuan, G., Neyra, M., ... & Gillis, M. (1994). Polyphasic Taxonomy of Rhizobia: Emendation of the Genus *Sinorhizobium* and Description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli*

Bibliografía

sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 715-733.

de Matos, G. F., Zilli, J. E., de Araújo, J. L. S., Parma, M. M., Melo, I. S., Radl, V., ... & Rouws, L. F. M. (2017). *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. *Archives of microbiology*, 199(9), 1251-1258.

De Meyer, S. E., Tan, H. W., Andrews, M., Heenan, P. B., & Willems, A. (2016). *Mesorhizobium calcicola* sp. nov., *Mesorhizobium waitakense* sp. nov., *Mesorhizobium sophorae* sp. nov., *Mesorhizobium newzealandense* sp. nov. and *Mesorhizobium kowhahi* sp. nov. isolated from *Sophora* root nodules. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(2), 786-795.

De Meyer, S. E., Tan, H. W., Heenan, P. B., Andrews, M., & Willems, A. (2015). *Mesorhizobium waimense* sp. nov. isolated from *Sophora longicarinata* root nodules and *Mesorhizobium cantuariense* sp. nov. isolated from *Sophora microphylla* root nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3419-3426.

de Souza Moreira, F. M., Cruz, L., De Faria, S. M., Marsh, T., Martínez-Romero, E., de Oliveira Pedrosa, F., ... & Young, J. P. W. (2006). *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 197-206.

Degefu, T., Wolde-meskel, E., Liu, B., Cleenwerck, I., Willems, A., & Frostegård, Å. (2013). *Mesorhizobium shonense* sp. nov., *Mesorhizobium hawassense* sp. nov. and *Mesorhizobium abyssinicae* sp. nov., isolated from root nodules of different agroforestry legume trees. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(5), 1746-1753.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Araújo, J. L. S., Rouws, L. F. M., Zilli, J. É., Parma, M. M., ... & Hungria, M. (2016). *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 3078-3087.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(9), 3342-3351.

Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, M. M., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense* sp. nov., nitrogen-fixing symbionts of tropical forage legumes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4424-4433.

Deryło, M., & Skorupska, A. (1993). Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent *Pseudomonas*. *Plant and Soil*, 154(2), 211-217.

- Dhima, K. V., Lithourgidis, A. S., Vasilakoglou, I. B., & Dordas, C. A. (2007). Competition indices of common vetch and cereal intercrops in two seeding ratio. *Field Crops Research*, 100(2), 249-256.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Drancourt, M., & Raoult, D. (2002). *rpoB* gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333-1338.
- Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(1), 89-98.
- Dubey, S. C., Suresh, M., & Singh, B. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological control*, 40(1), 118-127.
- Duca D, Lorv J, Patten C, Rose D, Glick B (2014) Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *A Van Leeuw J Microb* 106:85–125
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., ... & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews*, 81(2), 163-182.
- Duhan, J. S., Dudeja, S. S., & Khurana, A. L. (1998). Siderophore production in relation to N₂ fixation and iron uptake in pigeon pea-Rhizobium symbiosis. *Folia microbiologica*, 43(4), 421-426.
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., Schisler, D. A., & Rooney, A. P. (2016). Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojavensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(6), 2438-2443.
- Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., ... & Ormeño-Orrillo, E. (2014)^a. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 2072-2078.
- Durán, D., Rey, L., Navarro, A., Busquets, A., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. (2014)^c. *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Systematic and applied microbiology*, 37(5), 336-341.
- Durán, D., Rey, L., Navarro, A., Busquets, A., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. (2014)^b. *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-*

Bibliografía

joephae, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Systematic and applied microbiology*, 37(5), 336-341.

Dury, J., Schaller, N., Garcia, F., Reynaud, A., & Bergez, J. E. (2012). Models to support cropping plan and crop rotation decisions. A review. *Agronomy for sustainable development*, 32(2), 567-580.

Dushenkov, V., Kumar, N.P.B.A., Motto, H., et al. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science Technology*; vol 29, 1239-1245.

Eckhardt, M. M., Baldwin, I. L., & Fred, E. B. (1931). Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. *Journal of bacteriology*, 21(4), 273.

Elkoca, E., Kantar, F., & Sahin, F. (2007). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition*, 31(1), 157-171.

Ferguson, B. J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M. H., Lin, Y. H., Reid, D. E., & Gresshoff, P. M. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of integrative plant biology*, 52(1), 61-76.

Fields, S. (2004). Global nitrogen: cycling out of control. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), A556.

Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews*, 58(3), 352-386.

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484(7393), 186-194.

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., ... & Rivas, R. (2013). Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for *Lactuca sativa* and *Daucus carota* crops. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176(6), 876-882.

Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol 1. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 337-359.

Frioni, L. (1990). *Ecología Microbiana del Suelo*, 1ª edn. Uruguay: Departamento de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de la República.

Fu, G. (2000). Nitrogen dynamics in a chickpea-wheat rotation in a hummocky field (Doctoral dissertation).

Fu, G. Y., Yu, X. Y., Zhang, C. Y., Zhao, Z., Wu, D., Su, Y., ... & Sun, C. (2017). *Mesorhizobium oceanicum* sp. nov., isolated from deep seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2739-2745.

- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., & Hirsch, A. M. (2006). A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 150(1), 79-88.
- Gao, J. L., Sun, P., Wang, X. M., Lv, F. Y., Mao, X. J., & Sun, J. G. (2017). *Rhizobium wenxiniae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize root. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 2798-2803.
- Gao, J. L., Turner, S. L., Kan, F. L., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Qiu, Y. H., ... & Chen, W. X. (2004). *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(6), 2003-2012.
- García-Fraile, P., Carro, L., Robledo, M., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Fernández, M. T., ... & Peix, Á. (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(5), e38122.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015). Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. doi: 10.3934/bioeng.2015.3.183 2(3): 183-205.
- García-Fraile, P., Menéndez, E., Celador-Lera, L., Díez-Méndez, A., Jiménez-Gómez, A., Marcos-García, M., Cruz-González, X., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. & Rivas, R. (2017). Bacterial Probiotics: A Truly Green Revolution. In *Probiotics and Plant Health* (pp. 131-162). Springer, Singapore.
- García-Fraile, P., Rivas, R., Willems, A., Peix, A., Martens, M., Martínez-Molina, E., ... & Velazquez, E. (2007). *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of *Populus alba*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(4), 844-848.
- Gaunt, M. W., Turner, S. L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S. A., & Young, J. P. (2001). Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(6), 2037-2048.
- Ghasemi-Fasaei, R., Ronaghi, A., Maftoun, M., Karimian, N. A., & Soltanpour, P. N. (2005). Iron-manganese interaction in chickpea as affected by foliar and soil application of iron in a calcareous soil. *Communications in soil science and plant analysis*, 36(13-14), 1717-1725.
- Ghosh, W., & Roy, P. (2006). *Mesorhizobium thioanganeticum* sp. nov., a novel sulfur-oxidizing chemolithoautotroph from rhizosphere soil of an Indian tropical leguminous plant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(1), 91-97.
- Gill, P. R., Barton, L. L., Scoble, M. D., & Neilands, J. B. (1991). A high-affinity iron transport system of *Rhizobium meliloti* may be required for efficient nitrogen fixation in planta. *Plant and Soil*, 130(1-2), 211-217.

Bibliografía

Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.

Gomez M, Barrett C, Raney T, et al 2013 Post-green revolution food systems and the triple burden of malnutrition. *Food Policy* 42, 129-138.

González-Chávez, M. D. C. A., Aitkenhead-Peterson, J. A., Gentry, T. J., Zuberer, D., Hons, F., & Loeppert, R. (2010). Soil microbial community, C, N, and P responses to long-term tillage and crop rotation. *Soil and Tillage Research*, 106(2), 285-293.

Goss, M. J., Barry, D. A. J., & Rudolph, D. L. (1998). Contamination in Ontario farmstead domestic wells and its association with agriculture:: 1. Results from drinking water wells. *Journal of Contaminant Hydrology*, 32(3), 267-293.

Govantes Vicens, F., & Montañez Mancera, J. A. (1982). *El cultivo del garbanzo* (No. Folleto 7282) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Graham, P. H., & Vance, C. P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.

Grisson, C. M., Jackson, S., Merlot, S., Dobson, A., & Grison, C. (2015). *Rhizobium metallidurans* sp. nov., a symbiotic heavy metal resistant bacterium isolated from the *Anthyllis vulneraria* Zn-hyperaccumulator. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(5), 1525-1530.

Grönemeyer, J. L., Bünger, W., & Reinhold-Hurek, B. (2017). *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *Lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(12), 4884-4891.

Grönemeyer, J. L., Chimwamurombe, P., & Reinhold-Hurek, B. (2015)^b. *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3241-3247.

Grönemeyer, J. L., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2015)^a. *Bradyrhizobium kavangense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional Namibian pulses. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4886-4894.

Grönemeyer, J. L., Hurek, T., Bünger, W., & Reinhold-Hurek, B. (2016). *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 62-69.

Gruber, N., & Galloway, J. N. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451(7176), 293-296.

Grupo Banco Mundial. (2017). Tierras cultivables (% del área de tierra). Recuperado 16 de enero de 2018. <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.ARBL.ZS>

- Grupo Banco Mundial. (2017). Tierras cultivables (hectáreas por persona). Recuperado 16 de enero de 2018. <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.LND.ARBL.HA.PC>
- Gu, C. T., Wang, E. T., Tian, C. F., Han, T. X., Chen, W. F., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2008). *Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Lespedeza* root nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(6), 1364-1368.
- Guan, S. H., Chen, W. F., Wang, E. T., Lu, Y. L., Yan, X. R., Zhang, X. X., & Chen, W. X. (2008). *Mesorhizobium caraganae* sp. nov., a novel rhizobial species nodulated with *Caragana* spp. in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2646-2653.
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M. H., Abdelmoumen, H., Quinones, M. A., ... & Peix, A. (2013). Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Systematic and applied microbiology*, 36(4), 218-223.
- Gupta, C. P., Sharma, A., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2001). Effect of metal ions on growth of *Pseudomonas aeruginosa* and siderophore and protein production.
- Gyeong, H. R., Baek, K., Hwang, C. Y., Park, K. H., Kim, H. M., Lee, H. K., & Lee, Y. K. (2015). *Domibacillus tundrae* sp. nov., isolated from active layer soil of tussock tundra in Alaska, and emended description of the genus *Domibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3407-3412.
- Han, T. X., Han, L. L., Wu, L. J., Chen, W. F., Sui, X. H., Gu, J. G., ... & Chen, W. X. (2008). *Mesorhizobium gobiense* sp. nov. and *Mesorhizobium tarimense* sp. nov., isolated from wild legumes growing in desert soils of Xinjiang, China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2610-2618.
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
- Hardoim, P., Nissinen, R., & van Elsas, J. D. (2012). Ecology of bacterial endophytes in sustainable agriculture. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 97-126). Springer Berlin Heidelberg.
- Helene, L. C. F., Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., & Hungria, M. (2017). *Bradyrhizobium mercantei* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(6), 1827-1834.
- Helene, L. C. F., Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and

Bibliografía

environmental services. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4441-4448.

Hemmat, A., & Eskandari, I. (2004). Tillage system effects upon productivity of a dryland winter wheat–chickpea rotation in the northwest region of Iran. *Soil and tillage research*, 78(1), 69-81.

Hernández-Leal, T. I., Carrión, G., & Heredia, G. (2011). Solubilización in vitro de fosfatos por una cepa de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agrociencia*, 45(8), 881-892.

Herridge, D. F., Marcellos, H., Felton, W. L., Turner, G. L., & Peoples, M. B. (1995). Chickpea increases soil-N fertility in cereal systems through nitrate sparing and N₂ fixation. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4-5), 545-551.

Hirsch, P., & Müller, M. (1985). *Blastobacter aggregatus* sp. nov., *Blastobacter capsulatus* sp. nov., and *Blastobacter denitrificans* sp. nov., new budding bacteria from freshwater habitats. *Systematic and applied microbiology*, 6(3), 281-286.

Hoffmann, A. A., & Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), 479-485.

Holden, V. I., & Bachman, M. A. (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986-995.

Hou, B. C., Wang, E. T., Li Jr, Y., Jia, R. Z., Chen, W. F., Gao, Y., ... & Chen, W. X. (2009). *Rhizobium tibeticum* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from *Trigonella archiducis-nicolai* (Širj.) Vassilcz. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 3051-3057.

Howieson, J., & Ballard, R. (2004). Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia—some contemporary thoughts. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(8), 1261-1273.

Iannacone, J., Alvarino, L. (2005). Ecotoxicological effects of three heavy metals on the root growth of four vascular plants. *Agricultura Técnica*; vol 65, 198-203.

İçgen, B., Özcengiz, G., & Alaeddinoglu, N. G. (2002). Evaluation of symbiotic effectiveness of various *Rhizobium cicer* strains. *Research in microbiology*, 153(6), 369-372.

Idris EES, Bochow H, Ross H, Boriss F (2004). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. 6. Phytohormone action of culture filtrate prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* FZB24, FZB42, FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37. *J Plant Dis Prot* 111:583–597

Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(6), 619-626.

- Ike, A., Sriprang, R., Ono, H., et al. (2007). Bioremediation of cadmium contaminated soil using symbiosis between leguminous plant and recombinant rhizobia with the MTL4 and the PCS genes. *Chemosphere*; vol 66, 1670-1676.
- Ilyas, N., & Bano, A. (2012). Potential use of soil microbial community in agriculture. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 45-64). Springer Berlin Heidelberg.
- Indicación Geográfica Protegida, Garbanzos de Fuentesauco. 2007. Calidad Agroalimentaria. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España. http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/legumbres/IGP_gfuentesauco.aspx. Recuperado 18 de febrero de 2018.
- Industriales con datos de Datacomex. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España. <http://www.mapama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/#para1>. Recuperado 10 de febrero de 2018.
- Intawongse, M., Dean, J. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants*; vol 23, 36–48.
- Islam, M. S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., & Seki, T. (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(6), 1416-1429.
- Islam, M. T., & Hossain, M. M. (2012). Plant probiotics in phosphorus nutrition in crops, with special reference to rice. In *Bacteria in agrobiolgy: plant probiotics* (pp. 325-363). Springer Berlin Heidelberg.
- Jackson, R. W., Johnson, L. J., Clarke, S. R., & Arnold, D. L. (2011). Bacterial pathogen evolution: breaking news. *Trends in genetics*, 27(1), 32-40.
- Jacobsen, C. S. (1997). Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* DBO1 (pRO101) in 2, 4-D contaminated soil. *Plant and Soil*, 189(1), 139-144.
- Jang, J. H., Lee, D., Cha, S., & Seo, T. (2017). *Ensifer collicola* sp. nov., a bacterium isolated from soil in South Korea. *Journal of Microbiology*, 55(7), 520-524.
- Janso, J. E., & Carter, G. T. (2010). Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4377-4386.
- Jarvis, B. D. W., Downer, H. L., & Young, J. P. W. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 93-96.

Bibliografía

Jarvis, B. D. W., Pankhurst, C. E., & Patel, J. J. (1982). *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(3), 378-380.

Jarvis, B. D. W., Van Berkum, P., Chen, W. X., Nour, S. M., Fernandez, M. P., Cleyet-Marel, J. C., & Gillis, M. (1997). Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 895-898.

Javanmard, A., Nasab, A. D. M., Javanshir, A., Moghaddam, M., & Janmohammadi, H. (2009). Forage yield and quality in intercropping of maize with different legumes as double-cropped. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(1), 163-166.

Jeppesen, E., Brucet, S., Naselli-Flores, L., Papastergiadou, E., Stefanidis, K., Noges, T., ... & Bucak, T. (2015). Ecological impacts of global warming and water abstraction on lakes and reservoirs due to changes in water level and related changes in salinity. *Hydrobiologia*, 750(1), 201-227.

Jiao, Y. S., Yan, H., Ji, Z. J., Liu, Y. H., Sui, X. H., Wang, E. T., ... & Chen, W. F. (2015). *Rhizobium sophorae* sp. nov. and *Rhizobium sophoriradicis* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of the medicinal legume *Sophora flavescens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(2), 497-503.

Jida, M., & Assefa, F. (2012). Phenotypic diversity and plant growth promoting characteristics of *Mesorhizobium* species isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) growing areas of Ethiopia. *African Journal of Biotechnology*, 11(29).

Jiménez-Díaz, R. M., Castillo, P., del Mar Jiménez-Gasco, M., Landa, B. B., & Navas-Cortés, J. A. (2015). Fusarium wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. *Crop Protection*, 73, 16-27.

Jordan, D. C. (1982). Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 32(1), 136-139.

Kantar, F., Hafeez, F. Y., Shivakumar, B. G., Sundaram, S. P., Tejera, N. A., Aslam, A., ... & Raja, P. (2007). Chickpea: *Rhizobium* management and nitrogen fixation. *Chickpea Breeding and Management*, 179-192.

Kavamura, V. N., & Esposito, E. (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology advances*, 28(1), 61-69.

Khalid, R., Zhang, Y. J., Ali, S., Sui, X. H., Zhang, X. X., Amara, U., ... & Hayat, R. (2015). *Rhizobium pakistanensis* sp. nov., isolated from groundnut (*Arachis hypogaea*) nodules grown in rainfed Pothwar, Pakistan. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 281-290.

- Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In *Phosphate solubilizing microorganisms* (pp. 31-62). Springer International Publishing.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Musarrat, J. (Eds.). (2009). *Microbial strategies for crop improvement*. Berlin: Springer.
- Khan, M. S., Zaidi, A., & Wani, P. A. (2007). Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. *Agronomy for sustainable development*, 27(1), 29-43.
- Khan, R., Khan, H., Farhatullah & Harada, K. (2010). Evaluation of microsatellite markers to discriminate induced mutation lines, hybrid lines and cultigens in chickpea (*Cicer arietinum* L). *Australian Journal of Crop Science*, 4(5), 301-308
- Khush G 2001 Green revolution: the way forward. *Nat Rev Genet* 2, 815-822.
- Kim, D. H., Kaashyap, M., Rathore, A., Das, R. R., Parupalli, S., Upadhyaya, H. D., ... & Yasin, M. (2014). Phylogenetic diversity of *Mesorhizobium* in chickpea. *Journal of biosciences*, 39(3), 513-517.
- Kingsley, M. T., Fredrickson, J. K., Metting, F. B., & Seidler, R. J. (1994). Environmental restoration using plant-microbe bioaugmentation. *Bioremediation of chlorinated and polyaromatic hydrocarbon compounds*. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla, 287-292.
- Kittiwongwattana, C., & Thawai, C. (2014). *Rhizobium lemnae* sp. nov., a bacterial endophyte of *Lemna aquinoctialis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(7), 2455-2460.
- Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F., & Kishore, G. M. (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*, 3(11), 1187-1193.
- Kokalis–Burelle, N., Vavrina, C. S., Rosskopf, E. N., & Shelby, R. A. (2002). Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil*, 238(2), 257-266.
- Kuiper, I., Legendijk, E. L., Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(1), 6-15.
- Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems* (pp. 37-59). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kumar, M., Gogoi, A., Kumari, D., et al. (2017). Review of perspective, problems, challenges, and future scenario of metal contamination in the urban environment. *Journal of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste*; vol 21; DOI: 10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000351.

Bibliografía

Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., et al. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science Technology*; vol 29, 1232-1238.

Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E., & Udell, S. E. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501-505.

Kyei-Boahen, S., Slinkard, A. E., & Walley, F. L. (2001). Rhizobial survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Canadian journal of microbiology*, 47(6), 585-589.

L'taief, B., Sifi, B., Gtari, M., Zaman-Allah, M., & Lachaâl, M. (2007). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Tunisia. *Canadian journal of microbiology*, 53(3), 427-434.

Lambin, E. F., Rounsevell, M. D. A., & Geist, H. J. (2000). Are agricultural land-use models able to predict changes in land-use intensity?. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 82(1), 321-331.

Lang, E., Schumann, P., Adler, S., Spröer, C., & Sahin, N. (2013). *Azorhizobium oxalatophilum* sp. nov., and emended description of the genus *Azorhizobium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(4), 1505-1511.

Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: an overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiological research*, 169(1), 2-17.

Laranjo, M., Alexandre, A., Rivas, R., Velázquez, E., Young, J. P. W., & Oliveira, S. (2008). Chickpea rhizobia symbiosis genes are highly conserved across multiple *Mesorhizobium* species. *FEMS microbiology ecology*, 66(2), 391-400.

Leteinturier B, Herman J, Longueville FD, Quintin L, Oger R (2006) Leguminosas grano y oleaginosas. 2017. Subdirección General de Cultivos Herbáceos. Adaptation of a crop sequence indicator based on a land parcel management system. *Agric Ecosyst Environ* 112(4):324–334

Li, C. Y., Massicote, H. B., & Moore, L. V. H. (1992). Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil*, 140(1), 35-40.

Li, Q. Q., Wang, E. T., Chang, Y. L., Zhang, Y. Z., Zhang, Y. M., Sui, X. H., ... & Chen, W. X. (2011). *Ensifer sojae* sp. nov., isolated from root nodules of *Glycine max* grown in saline-alkaline soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1981-1988.

Li, Y. H., Wang, R., Zhang, X. X., Young, J. P. W., Wang, E. T., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2015). *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4655-4661.

- Li, Y., Yan, J., Yu, B., Wang, E. T., Li, X., Yan, H., ... & Xie, Z. (2016). Ensifer alkalisolii sp. nov. isolated from root nodules of Sesbania cannabina grown in saline-alkaline soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 5294-5300.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H. J., & Pée, K. H. V. (2000). Natural products with antifungal activity from Pseudomonas biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 56(8), 688-695.
- Lin, D. X., Chen, W. F., Wang, F. Q., Hu, D., Wang, E. T., Sui, X. H., & Chen, W. X. (2009). Rhizobium mesosinicum sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(8), 1919-1923.
- Lin, S. Y., Hsu, Y. H., Liu, Y. C., Hung, M. H., Hameed, A., Lai, W. A., ... & Young, C. C. (2014). Rhizobium straminoryzae sp. nov., isolated from the surface of rice straw. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 2962-2968.
- Lin, S. Y., Hung, M. H., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Wen, C. Z., ... & Young, C. C. (2015). Rhizobium capsici sp. nov., isolated from root tumor of a green bell pepper (Capsicum annuum var. grossum) plant. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(3), 773-784.
- Lindh, U., Hudecek, R., Danersund, A., et al. (2002). Removal of dental amalgam and other metal alloys supported by antioxidant therapy alleviates symptoms and improves quality of life in patients with amalgam-associated ill health. *Neuroendocrinol Letters*; vol 23, 459-482.
- Lindström, K. (1989). Rhizobium galegae, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 365-367.
- Lithourgidis, A. S., Vlachostergios, D. N., Dordas, C. A., & Damalas, C. A. (2011). Dry matter yield, nitrogen content, and competition in pea-cereal intercropping systems. *European Journal of Agronomy*, 34(4), 287-294.
- Liu, T. Y., Li Jr, Y., Liu, X. X., Sui, X. H., Zhang, X. X., Wang, E. T., ... & Puławska, J. (2012). Rhizobium cauense sp. nov., isolated from root nodules of the herbaceous legume Kummerowia stipulacea grown in campus lawn soil. *Systematic and applied microbiology*, 35(7), 415-420.
- Lloret, L., Ormeno-Orrillo, E., Rincon, R., Martínez-Romero, J., Rogel-Hernández, M. A., & Martínez-Romero, E. (2007). Ensifer mexicanus sp. nov. a new species nodulating Acacia angustissima (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and applied microbiology*, 30(4), 280-290.
- Lohar, D., Stiller, J., Kam, J., Stacey, G., & Gresshoff, P. M. (2009). Ethylene insensitivity conferred by a mutated Arabidopsis ethylene receptor gene alters nodulation in transgenic Lotus japonicus. *Annals of botany*, 104(2), 277-285.
- Long, S. R. (1996). Rhizobium symbiosis: nod factors in perspective. *The Plant Cell*, 8(10), 1885.

Bibliografía

- López-Bellido, R. J., & López-Bellido, L. (2001). Efficiency of nitrogen in wheat under Mediterranean conditions: effect of tillage, crop rotation and N fertilization. *Field Crops Research*, 71(1), 31-46.
- López-Larramona, G., Gomez-de-Ona, E., Maestre-Muñiz, M. M., Ruiz-Chicote, A. M., Galán-Dorado, E., & González-Delgado, L. (2013). Bacteriemia por *Kluyvera ascorbata* en un paciente adulto. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(3), 226-227.
- López-López, A., Rogel, M. A., Ormeno-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., & Martínez-Romero, E. (2010). *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 322-327.
- López-López, A., Rogel-Hernández, M. A., Barois, I., Ceballos, A. I. O., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2012). *Rhizobium grahamii* sp. nov., from nodules of *Dalea leporina*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria ternatea*, and *Rhizobium mesoamericanum* sp. nov., from nodules of *Phaseolus vulgaris*, siratro, cowpea and *Mimosa pudica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(9), 2264-2271.
- Lorite, M. J., Flores-Félix, J. D., Peix, Á., Sanjuán, J., & Velázquez, E. (2016). *Mesorhizobium olivaresii* sp. nov. isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *Systematic and applied microbiology*, 39(8), 557-561.
- Lu, J. K., Dou, Y. J., Zhu, Y. J., Wang, S. K., Sui, X. H., & Kang, L. H. (2014). *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(6), 1900-1905.
- Lu, Y. L., Chen, W. F., Han, L. L., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2009). *Rhizobium alkalisoli* sp. nov., isolated from *Caragana intermedia* growing in saline-alkaline soils in the north of China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 3006-3011.
- Lu, Y. L., Chen, W. F., Wang, E. T., Han, L. L., Zhang, X. X., Chen, W. X., & Han, S. Z. (2009). *Mesorhizobium shangrilense* sp. nov., isolated from root nodules of *Caragana* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 3012-3018.
- Ma, W., Charles, T. C., & Glick, B. R. (2004). Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5891-5897.
- Ma, W., Guinel, F. C., & Glick, B. R. (2003). *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4396-4402.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Brock, T. D. (2006). *Brock biology of microorganisms* (11th Edition.). Upper Saddle River, NJ : Pearson Prentice Hall.

- Malik, D. K., & Sindhu, S. S. (2011). Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* sp.: effect of coinoculation with *Mesorhizobium* sp. Cicer on nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(1), 25-32.
- Mani, D., & Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(3), 843-872.
- Marcos-García, M., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., Mateos, P. F., Peix, Á., Velázquez, E., & Rivas, R. (2017). *Mesorhizobium helmanticense* sp. nov., isolated from *Lotus corniculatus* nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(7), 2301-2305.
- Marek-Kozaczuk, M., Leszcz, A., Wielbo, J., Wdowiak-Wróbel, S., & Skorupska, A. (2013). *Rhizobium pisi* sv. *trifolii* K3. 22 harboring nod genes of the *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* cluster. *Systematic and applied microbiology*, 36(4), 252-258.
- Martínez-Hidalgo, P., Galindo-Villardón, P., Trujillo, M. E., Igual, J. M., & Martínez-Molina, E. (2014). Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Scientific reports*, 4, 6389.
- Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Felix, J. D., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., ... & Velázquez, E. (2015). 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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(6), 1703-1708.
- Martínez-Hidalgo, P., Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Igual, J. M., Sanjuán, J., León-Barrios, M., ... & Velázquez, E. (2016). Reclassification of strains MAFF 303099T and R7A into *Mesorhizobium japonicum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 4936-4941.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(3), 417-426.
- Martínez Y, Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad antifouling de compuestos de origen natural. (Tesis inédita). Facultad de Ciencia, Universidad Nacional de Colombia, 2010. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5100/>.
- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haack, S. K., Martinez-Molina, E., ... & Dazzo, F. B. (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 1816-1822.

Bibliografía

McSpadden Gardener, B. B., & Driks, A. (2004). Overview of the Nature and Application of Biocontrol Microbes: *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1244-1244.

Medema MH, Blin K, Cimermanic P, et al (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39:W339–W346.

Menéndez Gutiérrez, E. (2014). Resumen de tesis. Colonización, infección y nodulación en la interacción mutualista *Ensifer-Medicago*: análisis molecular y funcional de la implicación del gen *celC*. (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca, España.

Menna, P., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2934-2950.

Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., ... & Willems, A. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 664-674.

Merabet, C., Martens, M., Mahdhi, M., Zakhia, F., Sy, A., Le Roux, C., ... & Willems, A. (2010). Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(3), 664-674.

Michel, D. C., Passos, S. R., Simões-Araujo, J. L., Baraúna, A. C., da Silva, K., Parma, M. M., ... & Zilli, J. E. (2017). *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. *Archives of microbiology*, 199(5), 657-664.

Miransari, M. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Heavy Metal Tolerance in Plants. In *Arbuscular Mycorrhizas and Stress Tolerance of Plants* (pp. 147-161). Springer, Singapore.

Mishra, M., Prasad, R., Varma, A. (2014). Rootonic with bio-zinc to accelerate *Pennisetum glaucum* seed germination and plant growth. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*; vol 4, 552-561

Misra, A.K. and Prasad, B. (2003). *Trichoderma* – a genus for biocontrol. In: *Biopesticide and Bioagents in Integrated Pest Management of Agriculture Crops*, R.P. Shrivastava (ed.) International Book Distribution Co., Lucknow. pp. 811-833

Mnasri, B., Liu, T. Y., Saidi, S., Chen, W. F., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Mhamdi, R. (2014). *Rhizobium azibense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from root-nodules

- of *Phaseolus vulgaris*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64(5), 1501-1506.
- Mogi, T., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S., & Kita, K. (2008). Gramicidin S identified as a potent inhibitor for cytochrome bd-type quinol oxidase. FEBS letters, 582(15), 2299-2302.
- Molina, A., & Rodríguez, P. (2008). Resistencia sistémica inducida: Una herramienta bioecológica. Puerto de la Cruz, Tenerife: sd. II Conferencia Internacional sobre Eco-biología del Suelo y el Compost.
- Monni, S., Salemaa, M., Millar, N. (2000). The tolerance of *Empetrum nigrum* to copper and nickel. Environmental Pollution; vol 109, 221-229.
- Moreira, F. M. S., Carvalho, Y., Gonçalves, M., Haukka, K., Young, P. J. W., Faria, S. M., ... & Pedrosa, F. O. (2002). *Azorhizobium johannense* sp. nov. and *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.: a highly specific symbiosis. In Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity (pp. 197-197). Springer, Dordrecht.
- Morfología de la Planta. Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo. México <http://www.canimolt.org/trigo/morfologia>. Recuperado el 11 de febrero de 2018.
- Mousavi, S. A., Österman, J., Wahlberg, N., Nesme, X., Lavire, C., Vial, L., ... & Lindström, K. (2014). Phylogeny of the Rhizobium–Allorhizobium–Agrobacterium clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. Systematic and applied microbiology, 37(3), 208-215.
- Mousavi, S. A., Willems, A., Nesme, X., De Lajudie, P., & Lindström, K. (2015). Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. Systematic and applied microbiology, 38(2), 84-90.
- Muntean, V., Ștef, L. C., & Drgan-Bularda, M. (2004). Enzymological research on sediments from Mures River. Romanian Biol Sci, 1(3-4), 104-114.
- Muñoz, J. A., Coronado, C., Pérez-Hormaeche, J., Kondorosi, A., Ratet, P., & Palomares, A. J. (1998). MsPG3, a *Medicago sativa* polygalacturonase gene expressed during the alfalfa–*Rhizobium meliloti* interaction. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(16), 9687-9692.
- Nandasena, K. G., O'hara, G. W., Tiwari, R. P., Sezmiş, E., & Howieson, J. G. (2007). In situ lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. Environmental microbiology, 9(10), 2496-2511.
- Nandasena, K. G., O'Hara, G. W., Tiwari, R. P., Willems, A., & Howieson, J. G. (2009). *Mesorhizobium australicum* sp. nov. and *Mesorhizobium opportunistum* sp. nov., isolated from *Biserrula pelecinus* L. in Australia. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 59(9), 2140-2147.

Bibliografía

- Nascimento, F., Brígido, C., Alho, L., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2012)^a. Enhanced chickpea growth-promotion ability of a Mesorhizobium strain expressing an exogenous ACC deaminase gene. *Plant and soil*, 353(1-2), 221-230.
- Nascimento, F. X., Brígido, C., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2012)^b. ACC deaminase genes are conserved among Mesorhizobium species able to nodulate the same host plant. *FEMS microbiology letters*, 336(1), 26-37.
- Nautiyal, C. S., Chauhan, P. S., DasGupta, S. M., Seem, K., Varma, A., & Staddon, W. J. (2010). Tripartite interactions among *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, *Piriformospora indica* DSM 11827, and *Cicer arietinum* L. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(8), 1393-1399.
- Nell, M., Wawrosch, C., Steinkellner, S., et al. (2010). Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpene acid concentrations in *Valeriana officinalis* L. *Planta Medica*; vol 76, 393-398.
- Nguyen, T. M., & Kim, J. (2015). *Mesorhizobium soli* sp. nov., a novel species isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia* L. in South Korea by using a modified culture method. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(2), 301-310.
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B. D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., ... & Lindström, K. (1999). *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(4), 1359-1368.
- Nopparat, C., Jatupornpipat, M., & Rittiboon, A. (2009). Optimization of the phosphate-solubilizing fungus, *Aspergillus japonicus* SA22P3406, in solid-state cultivation by response surface methodology. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)*, 43, 172-181.
- Nordberg, G., Jin, T., Bernard, A., et al. (2002). Low bone density and renal dysfunction following environmental cadmium exposure in China. *Ambio*; vol 31, 478-481.
- Nour, S. M., Cleyet-Marel, J. C., Normand, P., & Fernandez, M. P. (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 640-648.
- Nour, S. M., Fernandez, M. P., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 511-522.
- Novoa, S. A., & Villagrán, A. (2002). Evaluación de un instrumento medidor de clorofila en la determinación de niveles de nitrógeno foliar en maíz. *Agricultura técnica*, 62(1), 166-171.
- O'Gara F, Shanmugam K (1976) Control of symbiotic nitrogen fixation in rhizobia regulation of NH₄⁺ assimilation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 451(2), 342-352.

- Ogasawara, M., Suzuki, T., Mutoh, I., Annapurna, K., Arora, N. K., Nishimura, Y., & Maheshwari, D. K. (2003). *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis*, 34(1), 53-68.
- O'hara, G. W., Goss, T. J., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1989). Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied and environmental microbiology*, 55(8), 1870-1876.
- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 252-263.
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics*, 45, 119-144.
- Ortíz-Castro, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., & López-Bucio, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 701-712.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Gu, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., ... & Udvardi, M. K. (2005). Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology*, 15(6), 531-535.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... & Vonstein, V. (2013). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic acids research*, 42(D1), D206-D214.
- Pal, R., Nandi, S. (1990). Cytological abnormalities induced by mercury water pollutants on *Allium cepa*. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*; vol 45, 767-774.
- Palme, K., Li, X., & Teale, W. D. (2014). Towards second green revolution: engineering nitrogen use efficiency. *Journal of genetics and genomics= Yi chuan xue bao*, 41(6), 315-316.
- Panday, D., Schumann, P., & Das, S. K. (2011). *Rhizobium pusense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(11), 2632-2639.
- Pandya, J. R., Sabalpara, A. N., & Chawda, S. K. (2011). *Trichoderma*: a particular weapon for biological control of phytopathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 7(5), 1187-1191.
- Pasmore, M., & Costerton, J. W. (2003). Biofilms, bacterial signaling, and their ties to marine biology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 407-413.
- Pastor, J., Hernández, A.J. (2002). Estudio de suelos de vertederos sellados y de sus especies vegetales espontáneas para la fitorrestauración de suelos degradados y contaminados del centro de España. *Anales de Biología*, vol 24, 145-153.

Bibliografía

- Patel, S., & Saraf, M. (2017). Interaction of root colonizing biocontrol agents demonstrates the antagonistic effect against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 149(2), 425-433.
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., & Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular ecology*, 22(4), 925-946.
- Payne, G. W., Vandamme, P., Morgan, S. H., LiPuma, J. J., Coenye, T., Weightman, A. J., ... & Mahenthiralingam, E. (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3917-3927.
- Peix A, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, RodríguezBarrueco C et al. (2003) *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *Int J Syst Evol Microbiol*; 53:2067–2072.
- Peix, A., Rivas-Boyer, A. A., Mateos, P. F., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2001). Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(1), 103-110.
- Peng J, Richards D, Hartley N, Murphy G, et al 1999 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400:256-261.
- Peng, G., Yuan, Q., Li, H., Zhang, W., & Tan, Z. (2008). *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from the wild rice *Oryza alta*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(9), 2158-2163.
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118(1), 10-15.
- Peoples, M. B., Brockwell, J., Herridge, D. F., Rochester, I. J., Alves, B. J. R., Urquiaga, S., ... & Sampet, C. (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*, 48(1-3), 1-17.
- Pereira, A. (2010). Temperature stress tolerance in chickpea rhizobia. (Tesis Doctoral). Universidad de Évora. Portugal.
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J., & Voesenek, L. A. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in plant science*, 11(4), 176-183.
- Pingali P 2012 Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. *P Natl Acad Sci USA* 109, 12302-12308.
- Prabhu, A. A., Chityala, S., Jayachandran, D., Naik, N., & Dasu, V. V. (2017). Rhizoremediation of Environmental Contaminants Using Microbial Communities. In *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological Perspectives* (pp. 433-453). Springer, Singapore.

- Prentiss, M., Prévost, C., & Danilowicz, C. (2015). Structure/function relationships in RecA protein-mediated homology recognition and strand exchange. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 50(6), 453-476.
- Qin, W., Deng, Z. S., Xu, L., Wang, N. N., & Wei, G. H. (2012). *Rhizobium helanshanense* sp. nov., a bacterium that nodulates *Sphaerophysa salsula* (Pall.) DC. in China. *Archives of microbiology*, 194(5), 371-378.
- Quan, Z. X., Bae, H. S., Baek, J. H., Chen, W. F., Im, W. T., & Lee, S. T. (2005). *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2543-2549.
- Raaijmakers, J. M., Vlami, M., & De Souza, J. T. (2002). Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 537-547.
- Radwan, S., Sorkhoh, N., & Ei-Nemr, I. (1995). Oil biodegradation around roots. *Nature*, 376, 302.
- Rae, A. L., Bonfante-Fasolo, P., & Brewin, N. J. (1992). Structure and growth of infection threads in the legume symbiosis with *Rhizobium leguminosarum*. *The Plant Journal*, 2(3), 385-395.
- Rajkumar, M., Ae, N., Prasad, M. N. V., & Freitas, H. (2010). Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in biotechnology*, 28(3), 142-149.
- Ramachandran, K., Srinivasan, V., Hamza, S., & Anandaraj, M. (2007). Phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere soil and its growth promotion on black pepper (*Piper nigrum* L.) cuttings. In *First international meeting on microbial phosphate solubilization* (pp. 325-331). Springer, Dordrecht.
- Ramírez-Bahena, M. H., Flores-Félix, J. D., Chahboune, R., Toro, M., Velázquez, E., & Peix, A. (2016). *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropici*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Systematic and applied microbiology*, 39(6), 378-383.
- Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., ... & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (= NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(11), 2484-2490.
- Ramírez-Bahena, M. H., Hernández, M., Peix, Á., Velázquez, E., & León-Barrios, M. (2012). Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine

Bibliografía

(Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 35(5), 334-341.

Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., ... & Velazquez, E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(8), 1929-1934.

Rani, A., & Goel, R. (2012). Role of PGPR Under Different Agroclimatic Conditions. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 169-183). Springer Berlin Heidelberg.

Rashid, M. H. O., Young, J. P. W., Everall, I., Clercx, P., Willems, A., Braun, M. S., & Wink, M. (2015). Average nucleotide identity of genome sequences supports the description of *Rhizobium lentis* sp. nov., *Rhizobium bangladeshense* sp. nov. and *Rhizobium binae* sp. nov. from lentil (*Lens culinaris*) nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 3037-3045.

Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2011). Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 42, 489-512.

Reetha, S., Bhuvaneswari, G., Thamizhiniyan, P., & Mycin, T. R. (2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allim cepa*. L). *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3(2), 568-574.

Reichman, S.M. (2007). The potential use of the legume-rhizobium symbiosis for the remediation of arsenic contaminated sites. *Soil Biology and Biochemistry*; vol 39, 2587-2593.

Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pettersson, B., & Priest, F. G. (2002). *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(1), 101-107.

Ribeiro, R. A., Martins, T. B., Ormeño-Orrillo, E., Delamuta, J. R. M., Rogel, M. A., Martínez-Romero, E., & Hungria, M. (2015). *Rhizobium ecuadorensis* sp. nov., an indigenous N₂-fixing symbiont of the Ecuadorian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genetic pool. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 3162-3169.

Ribeiro, R. A., Rogel, M. A., Lopez-Lopez, A., Ormeno-Orrillo, E., Barcellos, F. G., Martinez, J., ... & Hungria, M. (2012). Reclassification of *Rhizobium tropici* type A strains as *Rhizobium leucaenae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(5), 1179-1184.

Rincón-Rosales, R., Lloret, L., Ponce, E., & Martínez-Romero, E. (2008). Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS microbiology ecology*, 67(1), 103-117.

- Rincón-Rosales, R., Villalobos-Escobedo, J. M., Rogel, M. A., Martínez, J., Ormeño-Orrillo, E., & Martínez-Romero, E. (2013). *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(9), 3423-3429.
- Rink, L., Gabriel, P. (2000). Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*; vol 598, 541-552.
- Rivas, R., Laranjo, M., Mateos, P. F., Oliveira, S., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2007). 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*. *Letters in applied microbiology*, 44(4), 412-418.
- Rivas, R., Velázquez, E., Palomo, J. L., Mateos, P. F., García-Benavides, P., & Martínez-Molina, E. (2002). Rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subspecies *sepedonicus* using two primers random amplified polymorphic DNA (TP-RAPD) fingerprints. *European journal of plant pathology*, 108(2), 179-184.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Soto, M. J., Velázquez, E., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., & Mateos, P. F. (2011). Development of functional symbiotic white clover root hairs and nodules requires tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(7), 798-807.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J. I., Velázquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Piñero, J. L., Ramírez-Bahena, M. H., ... & Mateos, P. F. (2008). Rhizobium cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7064-7069.
- Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E., ... & Mateos, P. F. (2012). Role of Rhizobium endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial cell factories*, 11(1), 125.
- Rodríguez Mendoza, M. D. L. N., Alcántar González, G., Aguilar Santelises, A., Etchevers Barra, J. D., & Santizó Rincón, J. A. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. *Terra Latinoamericana*, 16(2).
- Rodríguez, M. J., Caminero, C., Díez, M. C., González, B., Martín, A., Barrios, A., ... & García, F. (2006). [Typification, selection and varieties for the Protected Geographical Indication of the Fuentesauco chickpea (*Cicer arietinum* L.)[Spain]]. In *Jornadas de la Asociación Española de Leguminosas*, 2., Cuenca (España), 25-27 Abr 2006. JCCM, CA.
- Rodríguez, O., Rodríguez, F.H., Lira, R.G., et al. (2006). Capacidad de seis especies vegetales para acumular plomo en suelos Contaminados. *Revista Fitotecnia Mexicana*; vol 29, 239-245.
- Román-Ponce, B., Zhang, Y. J., Vásquez-Murrieta, M. S., Sui, X. H., Chen, W. F., Padilla, J. C. A., ... & Wang, E. T. (2016). *Rhizobium acidisoli* sp. nov., isolated from root nodules

Bibliografía

of *Phaseolus vulgaris* in acid soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(1), 398-406.

Romdhane, S. B., Tajini, F., Trabelsi, M., Aouani, M. E., & Mhamdi, R. (2007). Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and the native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(9), 1195-1201.

Rome, S., Fernandez, M. P., Brunel, B., Normand, P., & Cleyet-Marel, J. C. (1996). *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 972-980.

Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., ... & Debelle, F. (2014). An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *The Plant Journal*, 77(6), 817-837.

Rozahon, M., Ismayil, N., Hamood, B., Erkin, R., Abdurahman, M., Mamtimin, H., ... & Rahman, E. (2014). *Rhizobium populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 3215-3221.

Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L., & Bais, H. P. (2008^a). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS microbiology ecology*, 64(2), 153-166.

Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W., & Bais, H. P. (2008^b). Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3), 1547-1556.

Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K., & Prasad, R. D. (2005). Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied soil ecology*, 28(2), 139-146.

Rufo, L., de la Fuente, V. (2010). *Vegetación arbórea y arbustiva de la cuenca del Río Tinto* (Huelva, España). *Lazaroa*; vol 31, 39-58.

Rybakova, D., Cernava, T., Köberl, M., Liebming, S., Etemadi, M., & Berg, G. (2016). Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. *Plant and soil*, 405(1-2), 125-140.

Saharan, B. S., & Verma, S. (2014). Potential plant growth promoting activity of *Bacillus licheniformis* UHI (II) 7. *Int. J. Microbial Resour. Technol*, 2, 22-27.

Saïdi, S., Ramírez-Bahena, M. H., Santillana, N., Zúñiga, D., Álvarez-Martínez, E., Peix, A., ... & Velázquez, E. (2014). *Rhizobium laguerreae* sp. nov. nodulates *Vicia faba* on several continents. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(1), 242-247.

Saini, V. K., Bhandari, S.C. & Tarafdar, J.C. (2004). Comparison of crop yield, soil microbial C, N, and P, N-fixation, nodulation and mycorrhizal infection in inoculated and non-inoculated sorghum and Chickpea crops. *Field Crops Research*, 89, 39-47.

- Sainz Rozas, H., & Echeverría, H. (1998). Uso del medidor de clorofila para el monitoreo de la nutrición nitrogenada del cultivo de maíz. *Rev. Fac. Agron. La Plata*, 103, 37-44.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., & Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(10), 635-648.
- Sánchez-Parra, B., Frerigmann, H., Alonso, M. M. P., Loba, V. C., Jost, R., Hentrich, M., & Pollmann, S. (2014). Characterization of four bifunctional plant IAM/PAM-amidohydrolases capable of contributing to auxin biosynthesis. *Plants*, 3(3), 324-347.
- Santos, H. F., Carmo, F. L., Duarte, G., Dini-Andreote, F., Castro, C. B., Rosado, A. S., ... & Peixoto, R. S. (2014). Climate change affects key nitrogen-fixing bacterial populations on coral reefs. *The ISME journal*, 8(11), 2272-2279.
- Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc; 1990.
- Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73
- Sayer J and Cassman K 2013 Agricultural innovation to protect the environment. *P Natl Acad Sci USA* 110, 8345-8348.
- Sayed, R. Z., Reddy, M. S., Kumar, K. V., Yellareddygar, S. K. R., Deshmukh, A. M., Patel, P. R., & Gangurde, N. S. (2012). Potential of plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agriculture. In *Bacteria in agrobiolgy: Plant probiotics* (pp. 287-313). Springer Berlin Heidelberg.
- Schnoor, J. L., Aitchison, E. W., Kelley, S. L., & Alvarez, P. J. J. (1998, March). Phytoremediation and bioaugmentation of 1, 4-dioxane. In *Abstr. Adv. Biol. Syst. Rem. Conf* (pp. 87-91).
- Scholla, M. H., & Elkan, G. H. (1984). *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 484-486.
- Schüßler, A., Walker, C. (2010). The Glomeromycota. A species list with new families and new genera.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Scott, P. T., Pregelj, L., Chen, N., Hadler, J. S., Djordjevic, M. A., & Gresshoff, P. M. (2008). *Pongamia pinnata*: an untapped resource for the biofuels industry of the future. *Bioenergy Research*, 1(1), 2-11.

Bibliografía

- Segovia, L., Young, J. P. W., & Martínez-Romero, E. (1993). Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 374-377.
- Seiler, H., Wenning, M., & Scherer, S. (2013). *Domibacillus robiginosus* gen. nov., sp. nov., isolated from a pharmaceutical clean room. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(6), 2054-2061.
- Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. (2013). Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of bacteriology*, 195(24), 5540-5554.
- Shaharoon, B., Naveed, M., Arshad, M., & Zahir, Z. A. (2008). Fertilizer-dependent efficiency of *Pseudomonads* for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied microbiology and biotechnology*, 79(1), 147-155.
- Shamseldin, A., Carro, L., Peix, A., Velázquez, E., Moawad, H., & Sadowsky, M. J. (2016). The symbiovar *trifolii* of *Rhizobium bangladeshense* and *Rhizobium aegyptiacum* sp. nov. nodulate *Trifolium alexandrinum* in Egypt. *Systematic and applied microbiology*, 39(4), 275-279.
- Shamseldin, A., Moawad, H., El-Rahim, W. M. A., & Sadowsky, M. J. (2014). Near-full length sequencing of 16S rDNA and RFLP indicates that *Rhizobium etli* is the dominant species nodulating Egyptian winter Berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). *Systematic and applied microbiology*, 37(2), 121-128.
- Shao, J., Li, S., Zhang, N., Cui, X., Zhou, X., Zhang, G., ... & Zhang, R. (2015). Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Microbial cell factories*, 14(1), 130.
- Sharma, A., Dhar, S. K., Prakash, O., Vemuluri, V. R., Thite, V., & Shouche, Y. S. (2014). Description of *Domibacillus indicus* sp. nov., isolated from ocean sediments and emended description of the genus *Domibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(9), 3010-3015.
- Sharma, P., Khanna, V., & Kumar, P. (2013). Efficacy of aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)-deaminase-producing rhizobacteria in ameliorating water stress in chickpea under axenic conditions. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (50), 5749-5757
- Sharma, P., Khanna, V., Kaur, N., Dhillon, G., Singh, G., Sharma, S., ... & Saxena, A. K. (2013). Effect of dual inoculation of *Pseudomonas argentinensis* LPGPR1 and *Mesorhizobium* on growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Research*, 50(1and2), 1-4.
- Shaviv, A. (2001). Advances in controlled-release fertilizers. *Advances in agronomy*, 71, 1-49.

- Shi, X., Li, C., Zhao, L., Si, M., Zhu, L., Xin, K., ... & Zhang, L. (2016). *Rhizobium gei* sp. nov., a bacterial endophyte of *Geum aleppicum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(10), 4282-4288.
- Shiro, S., Kuranaga, C., Yamamoto, A., Sameshima-Saito, R., & Saeki, Y. (2016). Temperature-dependent expression of *nodC* and community structure of soybean-nodulating bradyrhizobia. *Microbes and environments*, 31(1), 27-32.
- Silva, F. V., De Meyer, S. E., Simões-Araújo, J. L., da Costa Barbé, T., Xavier, G. R., O'Hara, G., ... & Zilli, J. E. (2014). *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian rainforest soils. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(7), 2358-2363.
- Singh, O., Gupta, M., Mittal, V., Kiran, S., Nayyar, H., Gulati, A., & Tewari, R. (2014). Novel phosphate solubilizing bacteria '*Pantoea cypripedii* PS1' along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant growth regulation*, 73(1), 79-89.
- Skorov G 1973 The green revolution and social progress. *World Dev* 1, 13-21.
- Smith, R.A.H., Bradshaw, A.D. (1972). Stabilization of toxic mine wastes by the use of tolerant plant pollutions. *Transactions of the Institution of Mining and Metallurgy, Section A: Mining Technology*; vol 81, 230-237.
- Sonalkar, V. V., Mawlankar, R., Krishnamurthi, S., Tang, S. K., & Dastager, S. G. (2014). *Domibacillus enclensis* sp. nov., isolated from marine sediment, and emended description of the genus *Domibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(12), 4098-4102.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* 31(4):425-448
- Spence, C., Alff, E., Shantharaj, D., & Bais, H. (2012). Probiotics for Plants: Importance of Rhizobacteria on Aboveground Fitness in Plants. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 1-14). Springer Berlin Heidelberg.
- Squartini, A., Struffi, P., Döring, H., Selenska-Pobell, S., Tola, E., Giacomini, A., ... & Dazzo, F. B. (2002). *Rhizobium sullae* sp. nov.(formerly'*Rhizobium hedysari*'), the root-nodule microsymbiont of *Hedysarum coronarium* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4), 1267-1276.
- Sriprang, R., Hayashi, M., Yamashita, M., Ono, H., Saeki, K., & Murooka, Y. (2002). A novel bioremediation system for heavy metals using the symbiosis between leguminous plant and genetically engineered rhizobia. *Journal of Biotechnology*, 99(3), 279-293.
- Staessen, J.A., Roels, H.A., Emilianov, D., et al. (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. *Lancet*; vol 353, 1140-1144.

Bibliografía

Steenland, K., Boffetta, P. (2000). Lead and cancer in humans: where are we now? *American Journal of Industrial Medicine*; vol 38, 295-304.

Steer, A., 1998. Making development sustainable. *Adv. Geo-Ecol.* 31, 857–865.

Sun, Q. L., & Sun, L. (2016). Description of *Domibacillus iocasae* sp. nov., isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus *Domibacillus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(2), 982-987.

Sunea, P. Kumar, A. & Dahiya, P. (2014). Characterization of epiphytic bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) nodules. *African Journal of Microbiology Research*, 8(12), 1302-1309.

Tan, H. W., Weir, B. S., Carter, N., Heenan, P. B., Ridgway, H. J., James, E. K., ... & Andrews, M. (2012). Rhizobia with 16S rRNA and nifH similar to *Mesorhizobium huakuii* but Novel recA, glnII, nodA and nodC genes are symbionts of New Zealand Carmichaelinae. *PloS one*, 7(10), e47677.

Tan, Z. Y., Kan, F. L., Peng, G. X., Wang, E. T., Reinhold-Hurek, B., & Chen, W. X. (2001). *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(3), 909-914.

Tarkowski, P., & Vereecke, D. (2014). Threats and opportunities of plant pathogenic bacteria. *Biotechnology advances*, 32(1), 215-229.

Taurian, T., Ibáñez, F., Angelini, J., Tonelli, M. L., & Fabra, A. (2012). Endophytic bacteria and their role in legumes growth promotion. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 141-168). Springer Berlin Heidelberg.

Tejerizo, G. T., Rogel, M. A., Ormeño-Orrillo, E., Althabegoiti, M. J., Nilsson, J. F., Niehaus, K., ... & Martínez-Romero, E. (2016). *Rhizobium favelukesii* sp. nov., isolated from the root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4451-4457.

Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2(3), 194-208.

Thijs, S., & Vangronsveld, J. (2015). Rhizoremediation. In *Principles of Plant-Microbe Interactions* (pp. 277-286). Springer, Cham.

Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T., ... & Chen, W. X. (2008). *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(12), 2871-2875.

Timmusk, S., Grantcharova, N., & Wagner, E. G. H. (2005). *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7292-7300.

Tindall, B. J. (2017). The consequences of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García et al. 2005, *Bacillus malacitensis* Ruiz-García et al. 2005 and *Brevibacterium halotolerans* Delaporte and

- Sasson 1967 (Approved Lists 1980) being treated as heterotypic synonyms. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(1), 175-176.
- Toledo I, Lloret, L., & Martínez-Romero, E. (2003). *Sinorhizobium Americanum* sp. Nov. a New *Sinorhizobium* Species Nodulating Native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 54-64.
- Tomar, S. S., Pathan, M. A., Gupta, K. P., & Khandkar, R. (1993). Effect of phosphate-solubilizing bacteria at different levels of phosphate on blackgram (*Phaseolus mungo*). *Indian Journal of Agronomy*, 38, 131-131.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P., & Martínez-Molina, E. (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(12), 2799-2804.
- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual review of plant biology*, 64, 781-805.
- Vadakattu, G. & Paterson, J. Free-living bacteria lift soil nitrogen supply. *Farming Ahead* 169, 40 (2006).
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*; vol 12, 1161-1208.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., & Velazquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(11), 2631-2637.
- Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G., Campbell, T. A., & Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(1), 13-22.
- Van Berkum, P., Leibold, J. M., & Eardly, B. D. (2006). Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp.(*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). *Systematic and applied microbiology*, 29(3), 207-215.
- Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology letters*, 11(3), 296-310.
- Van Loon, L. C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119(3), 243-254.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36(1), 453-483.

Bibliografía

Vangronsveld, J., van Assche, F., Clijsters, H. (1995). Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution*; vol 87, 51-59.

Vasilakoglou, I., Dhima, K., Lithourgidis, A., & Eleftherohorinos, I. (2008). Competitive ability of winter cereal–common vetch intercrops against sterile oat. *Experimental Agriculture*, 44(4), 509-520.

Vázquez, S., Carpena, R.O., Bernal, M.P. (2008). Contribution of heavy metals and As-loaded lupin root mineralization to the availability of the pollutants in multi-contaminated soils. *Environmental Pollution*; vol 152, 373-379.

Velázquez, E., Igual, J. M., Willems, A., Fernández, M. P., Muñoz, E., Mateos, P. F., ... & Gillis, M. (2001). *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 1011-1021.

Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Kumar, A. (2013). Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, 282-286.

Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Lavakush, S. V. (2010). Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. *Int J Agric Res*, 5(11), 954-983.

Verma, A., Ojha, A. K., Pal, Y., Kumari, P., Schumann, P., Gruber-Vodicka, H., ... & Krishnamurthi, S. (2017)^a. An investigation into the taxonomy of “*Bacillus aminovorans*” and its reclassification to the genus *Domibacillus* as *Domibacillus aminovorans* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 40(7), 458-467.

Verma, A., Ojha, A. K., Dastager, S. G., Natarajan, R., Mayilraj, S., & Krishnamurthi, S. (2017)^b. *Domibacillus mangrovi* sp. nov. and *Domibacillus epiphyticus* sp. nov., isolated from marine habitats of the central west coast of India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(8), 3063-3070.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil*, 255(2), 571-586.

Vicente, C., Pérez-Fernández, M. (2016). Broad environmental tolerance of native root-nodule bacteria of *Biserrula pelecinus* indicate potential for soil fertility restoration. *Plant Ecology and diversity*; DOI: 10.1080/17550874.2016.1182226

Vidal, C., Chantreuil, C., Berge, O., Maure, L., Escarre, J., Bena, G., ... & Cleyet-Marel, J. C. (2009). *Mesorhizobium metallidurans* sp. nov., a metal-resistant symbiont of *Anthyllis*

vulneraria growing on metallicolous soil in Languedoc, France. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 850-855.

Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., ... & Martínez-Romero, E. (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 569-575.

Wagner, S. C. (2012). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 15.

Wahab, A. A. (1975). Nitrogen fixation by *Bacillus* strains isolated from the rhizosphere of *Ammophila arenaria*. *Plant and Soil*, 42(3), 703-708.

Wang, E. T., Chen, W. F., Sui, X. H., Zhang, X. X., Liu, H. C., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium herbae* sp. nov. and *Rhizobium giardinii*-related bacteria, minor microsymbionts of various wild legumes in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), 1912-1920.

Wang, E. T., Martínez-Romero, J. y López-Lara, I. M. (2001). *Rhizobium* y su destacada simbiosis con plantas. Mexico: UNAM.

Wang, E. T., Tan, Z. Y., Willems, A., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B., & Martínez-Romero, E. (2002). *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1687-1693.

Wang, E. T., Van Berkum, P., Beyene, D., Sui, X. H., Dorado, O., Chen, W. X., & Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(3), 687-699.

Wang, E. T., Van Berkum, P., Sui, X. H., Beyene, D., Chen, W. X., & Martínez-Romero, E. (1999). Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 51-65.

Wang, F. Q., Wang, E. T., Liu, J., Chen, Q., Sui, X. H., Chen, W. F., & Chen, W. X. (2007). *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(6), 1192-1199.

Wang, F., Wang, E. T., Wu, L. J., Sui, X. H., Li Jr, Y., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium vallis* sp. nov., isolated from nodules of three leguminous species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(11), 2582-2588.

Bibliografía

Wang, H., Zhong, Z., Cai, T., Li, S., & Zhu, J. (2004). Heterologous overexpression of quorum-sensing regulators to study cell-density-dependent phenotypes in a symbiotic plant bacterium *Mesorhizobium huakuii*. *Archives of microbiology*, 182(6), 520-525.

Wang, J. Y., Wang, R., Zhang, Y. M., Liu, H. C., Chen, W. F., Wang, E. T., ... & Chen, W. X. (2013). *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(2), 616-624.

Wang, R., Chang, Y. L., Zheng, W. T., Zhang, D., Zhang, X. X., Sui, X. H., ... & Chen, W. X. (2013)^b. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. *Systematic and applied microbiology*, 36(2), 101-105.

Wang, Y. C., Wang, F., Hou, B. C., Wang, E. T., Chen, W. F., Sui, X. H., ... & Zhang, Y. B. (2013)^a. Proposal of *Ensifer psoraleae* sp. nov., *Ensifer sesbaniae* sp. nov., *Ensifer morelense* comb. nov. and *Ensifer americanum* comb. nov. *Systematic and applied microbiology*, 36(7), 467-473.

Wani, P. A., Khan, M. S., & Zaidi, A. (2008). Chromium-reducing and plant growth-promoting *Mesorhizobium* improves chickpea growth in chromium-amended soil. *Biotechnology letters*, 30(1), 159-163.

Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z., & Chen, W. X. (2003). Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(5), 1575-1583.

Wei, G. H., Wang, E. T., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., & Chen, W. X. (2002). *Rhizobium indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2231-2239.

Wei, G., Chen, W., Zhu, W., Chen, C., Young, J. P. W., & Bontemps, C. (2009). Invasive *Robinia pseudoacacia* in China is nodulated by *Mesorhizobium* and *Sinorhizobium* species that share similar nodulation genes with native American symbionts. *FEMS microbiology ecology*, 68(3), 320-328.

Wei, X., Yan, S., Li, D., Pang, H., Li, Y., & Zhang, J. (2015). *Rhizobium helianthi* sp. nov., isolated from the rhizosphere of sunflower. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4455-4460.

Wintz, H., Fox, T., Vulpe, C. (2002). Responses of plants to iron, zinc and copper deficiencies. *Biochemical Society Transactions*; vol 30, 766-768.

Withers, P. J., Neal, C., Jarvie, H. P., & Doody, D. G. (2014). Agriculture and eutrophication: where do we go from here?. *Sustainability*, 6(9), 5853-5875.

- Xing, J., Liu, C., Zhang, Y., He, H., Zhou, Y., Li, L., ... & Xiang, W. (2015). *Sphaerisorangium dianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a root of *Dianthus chinensis* L. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(1), 9-14.
- Xu, D., Wang, L., Wang, G., & Zheng, S. (2016). *Domibacillus antri* sp. nov., isolated from the soil of a cave. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(7), 2502-2508.
- Xu, L. M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., & Fan, H. (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 706-711.
- Xu, L., Shi, J. F., Zhao, P., Chen, W. M., Qin, W., Tang, M., & Wei, G. H. (2011). *Rhizobium sphaerophysae* sp. nov., a novel species isolated from root nodules of *Sphaerophysa salsula* in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(4), 845-854.
- Xu, L., Shi, J., Li, C., Zhu, S., & Li, B. (2017)^a. *Rhizobium hedysari* sp. nov., a novel species isolated from a root nodule of *Hedysarum multijugum* in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(4), 479-488.
- Xu, L., Zhang, Y., Deng, Z. S., Zhao, L., Wei, X. L., & Wei, G. H. (2013). *Rhizobium qilianshanense* sp. nov., a novel species isolated from root nodule of *Oxytropis ochrocephala* Bunge in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(3), 559-565.
- Xu, L., Zhang, Y., Mohamad, O. A., Jiang, C., & Friman, V. P. (2017)^b. *Mesorhizobium zhangyense* sp. nov., isolated from wild *Thermopsis lanceolata* in northwestern China. *Archives of microbiology*, 1-8.
- Yan, H., Yan, J., Sui, X. H., Wang, E. T., Chen, W. X., Zhang, X. X., & Chen, W. F. (2016). *Ensifer glycinis* sp. nov., a rhizobial species associated with species of the genus *Glycine*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(8), 2910-2916.
- Yan, J., Yan, H., Liu, L. X., Chen, W. F., Zhang, X. X., Verástegui-Valdés, M. M., ... & Han, X. Z. (2017). *Rhizobium hidalgonense* sp. nov., a nodule endophytic bacterium of *Phaseolus vulgaris* in acid soil. *Archives of microbiology*, 199(1), 97-104.
- Yang, S. F., & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 155-189.
- Yao, L. J., Shen, Y. Y., Zhan, J. P., Xu, W., Cui, G. L., & Wei, G. H. (2012). *Rhizobium taibaishanense* sp. nov., isolated from a root nodule of *Kummerowia striata*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(2), 335-341.
- Yao, Y., Sui, X. H., Zhang, X. X., Wang, E. T., & Chen, W. X. (2015). *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(6), 1831-1837.

Bibliografía

Yee, D. C., Maynard, J. A., & Wood, T. K. (1998). Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 112-118.

Yin, C., Jones, K. L., Peterson, D. E., Garrett, K. A., Hulbert, S. H., & Paulitz, T. C. (2010). Members of soil bacterial communities sensitive to tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2111-2118.

Yoon S-H, Ha S-M, Kwon S, et al (2017) Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617.

Yoon, J. H., Kang, S. J., Yi, H. S., Oh, T. K., & Ryu, C. M. (2010). *Rhizobium soli* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(6), 1387-1393.

Young, C. C., Shen, F. T., & Singh, S. (2012). Strategies for the Exploration and Development of Biofertilizer. In *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Probiotics* (pp. 127-139). Springer Berlin Heidelberg.

Young, J. M. (2003). The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an opinion. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2107-2110.

Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martinez-Romero, E., Kerr, A., & Sawada, H. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 89-103.

Yuan, C. G., Jiang, Z., Xiao, M., Zhou, E. M., Kim, C. J., Hozzein, W. N., ... & Li, W. J. (2016). *Mesorhizobium sediminum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(11), 4797-4802.

Zachow, C., Pirker, H., Westendorf, C., Tilcher, R., & Berg, G. (2009). The *Caenorhabditis elegans* assay: a tool to evaluate the pathogenic potential of bacterial biocontrol agents. *European journal of plant pathology*, 125(3), 367-376.

Zanden J 1991 The first green revolution: the growth of production and productivity in European agriculture, 1870-1914. *Econ Hist Rev* 44, 215-239.

Zerbino D, Birney E (2008) Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.

- Zerbino, D. R., & Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome research*, 18(5), 821-829.
- Zhang, J. J., Liu, T. Y., Chen, W. F., Wang, E. T., Sui, X. H., Zhang, X. X., ... & Chen, W. X. (2012). *Mesorhizobium muleiense* sp. nov., nodulating with *Cicer arietinum* L. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(11), 2737-2742.
- Zhang, L., Shi, X., Si, M., Li, C., Zhu, L., Zhao, L., ... & Wang, Y. (2014). *Rhizobium smilacinae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the leaf of *Smilacina japonica*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106(4), 715-723.
- Zhang, R. J., Hou, B. C., Wang, E. T., Li Jr, Y., Zhang, X. X., & Chen, W. X. (2011). *Rhizobium tubonense* sp. nov., isolated from root nodules of *Oxytropis glabra*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(3), 512-517.
- Zhang, X. X., Gao, J. S., Cao, Y. H., Sheirdil, R. A., Wang, X. C., & Zhang, L. (2015). *Rhizobium oryzicola* sp. nov., potential plant-growth-promoting endophytic bacteria isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 2931-2936.
- Zhang, X. X., Tang, X., Sheirdil, R. A., Sun, L., & Ma, X. T. (2014). *Rhizobium rhizoryzae* sp. nov., isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(4), 1373-1377.
- Zhang, X., Li, B., Wang, H., Sui, X., Ma, X., Hong, Q., & Jiang, R. (2012). *Rhizobium petrolearium* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8), 1871-1876.
- Zhang, Y. J., Zheng, W. T., Overall, I., Young, J. P. W., Zhang, X. X., Tian, C. F., ... & Chen, W. X. (2015). *Rhizobium anhuiense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vicia faba* and *Pisum sativum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(9), 2960-2967.
- Zhang, Y. M., Li Jr, Y., Chen, W. F., Wang, E. T., Sui, X. H., Li, Q. Q., ... & Chen, W. X. (2012). *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(8), 1951-1957.
- Zhao, C. T., Wang, E. T., Zhang, Y. M., Chen, W. F., Sui, X. H., Chen, W. X., ... & Zhang, X. X. (2012). *Mesorhizobium silamurunense* sp. nov., isolated from root nodules of *Astragalus* species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(9), 2180-2186.
- Zhao, J. J., Zhang, J., Sun, L., Zhang, R. J., Zhang, C. W., Yin, H. Q., & Zhang, X. X. (2017)^a. *Rhizobium oryziradicis* sp. nov., isolated from rice roots. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(4), 963-968.

Bibliografía

- Zhao, J. J., Zhang, J., Zhang, R. J., Zhang, C. W., Yin, H. Q., & Zhang, X. X. (2017)^b. *Rhizobium rhizosphaerae* sp. nov., a novel species isolated from rice rhizosphere. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(5), 651-656.
- Zheng, W. T., Li Jr, Y., Wang, R., Sui, X. H., Zhang, X. X., Zhang, J. J., ... & Chen, W. X. (2013). *Mesorhizobium qingshengii* sp. nov., isolated from effective nodules of *Astragalus sinicus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(6), 2002-2007.
- Zhou, P. F., Chen, W. M., & Wei, G. H. (2010). *Mesorhizobium robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(11), 2552-2556.
- Zhou, S., Li, Q., Jiang, H., Lindström, K., & Zhang, X. (2013). *Mesorhizobium sangaii* sp. nov., isolated from the root nodules of *Astragalus luteolus* and *Astragalus ernestii*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(8), 2794-2799.
- Zhu, Y. J., Lu, J. K., Chen, Y. L., Wang, S. K., Sui, X. H., & Kang, L. H. (2015). *Mesorhizobium acaciae* sp. nov., isolated from root nodules of *Acacia melanoxylon* R. Br. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(10), 3558-3563.
- Zilli, J. E., Baraúna, A. C., da Silva, K., De Meyer, S. E., Farias, E. N., Kaminski, P. E., ... & Dourado, F. D. S. (2014). *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centrolobium paraense*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(12), 3950-3957.

Summary and Conclusion

Summary

The chickpea is one of the most important legumes, being the third most cultivated in the world. However, since it is not considered a biological model plant, few studies have been carried out on garbanzo referebte to know and understand its mechanisms with interaction with bacteria. In this study, a total of 95 bacterial strains were isolated from *Cicer arietinum* L. (chickpea) nodules grown in a soil from Fuentesauco in Zamora, Spain. The 95 isolates were analyzed by a Random Amplification of the Polymorphic DNA and 68 different genetic profiles were identified, as shown in figure 1.

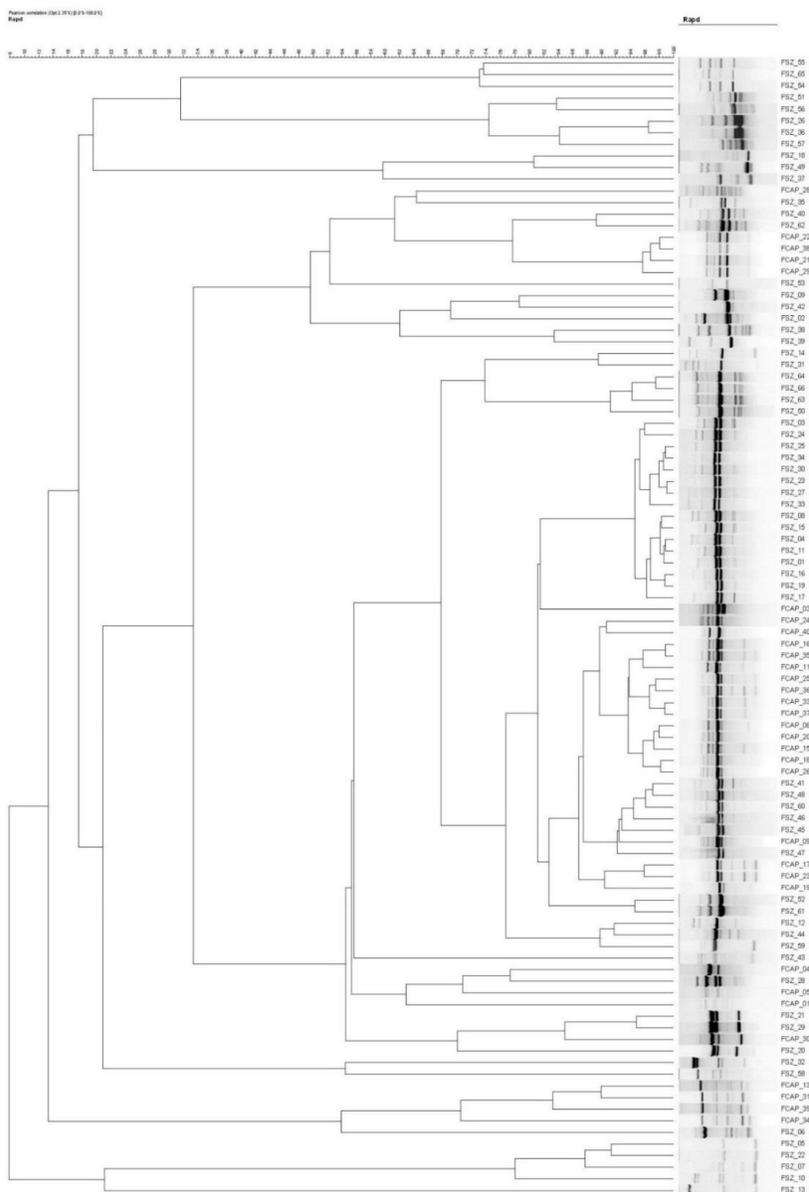


Figure 1. RAPD dendrogram based on the UPGMA grouping and the Pearson correlation coefficient of all endophytes isolated from the interior of *Cicer arietinum* L.

Then, the 16S ribosomal gene of a representative isolate of each genetic profile was sequenced, finding a high diversity, since the isolates were identified as *Bacillus halotolerans*, *B. aryabhatai*, *B. megaterium*, *B. halosaccharovorans*, *B. licheniformis*, *B. timonensis*, *B. sonorensis*, *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*, *B. aerius*, *Paenibacillus faecis*, *P. lautus*, *P. tundrae*, *Aneurinibacillus migulanus*, *Domibacillus* sp. FSZ 02 (possible new species), *Micromonospora saelicesensis*, *M. matsumotoense*, *M. yangpuensis*, *Sphaerisporangium dianthi* and *Mesorhizobium ciceri*. In addition, after analyzing the sequences of the 16S RNA, *recA*, *glnII*, *rpoB*, *atpD* genes and the concatenation of the sequences of the *recA-glnII* genes of the isolates included in the genus *Mesorhizobium*, it was observed that 5 new species could be described, out of a total of 24 species present in the interior of the nodule, which belonged to 7 different genera. Thus, once the different genotypic analyzes were carried out, the microbial diversity present in the nodules of *Cicer arietinum* L. could be corroborated, which constitutes one of the greatest diversity of bacteria from chickpea nodules found in the same soil. Over the years, the process of domestication of this plant has led to a decrease in biodiversity. This was determined by a work carried out by Kim and collaborators (2014) where he found that when analyzing plants of *Cicer arietinum* L. and of the wild species *C. reticulatum* and *C. bijugum*. While it is true that domestication can diminish microbial biodiversity, this research has shown that it is not as limited as it was believed. Figure 2 shows the diversity of genera of microorganisms present inside the nodules.

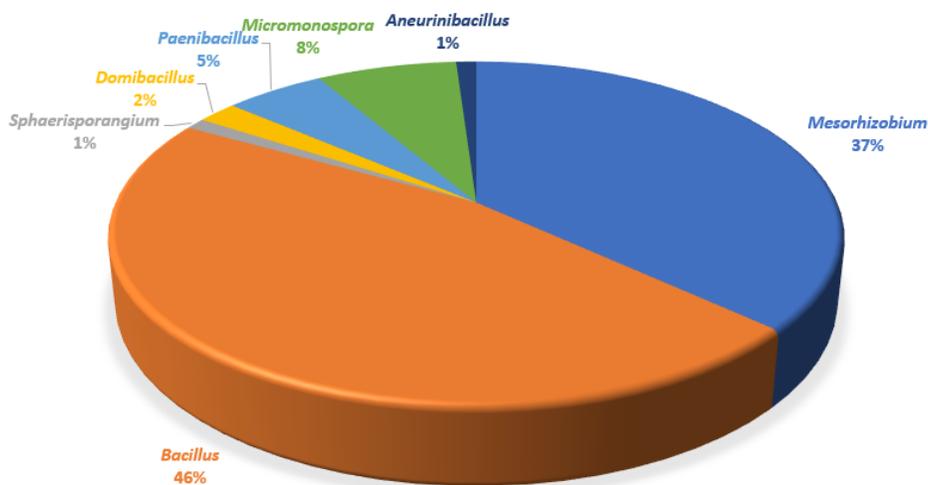


Figure 2. Diversity of genera present inside the nodules of *Cicer arietinum* L.

Once the microbial diversity was known, an analysis was carried out to evaluate which of these 95 strains can promote plant growth. In this case, it was determined that 71% of the isolates can produce cellulose or other polysaccharide with β -1,4 bonds, 66% of the strains at 72hrs is capable of producing biofilms in a considerable amount, 94% can produce

cellulases, 8% produces siderophores, 85% solubilizes phosphate and 55% can produce Indol-3-acetic acid (IAA). Therefore, some of the strains have the potential to promote the growth and development of plants. Now it would be important to analyze how those characteristics determined *in vitro* by some bacteria can promote plant growth, *in vivo*. Now, as is known the rhizobium-legume interaction in our case *Mesorhizobium* - *Cicer arietinum* L. in the biological nitrogen fixation, we proceeded to interact the strains of *Mesorhizobium* in chickpea plants under controlled biotic and abiotic conditions, in order to evaluate how that single strain fostered the growth of the plant by supplying nitrogen. In this sense, each of the strains achievement to nodulate the chickpea plants (Figure 3), confirming what was genetically determined by sequencing the *nodC* gene. In addition, after a histological analysis we observed the structures where the biological fixation of nitrogen takes place, besides some strains they improved the growth of some plants, even better than a fertilized control, Figure 4.

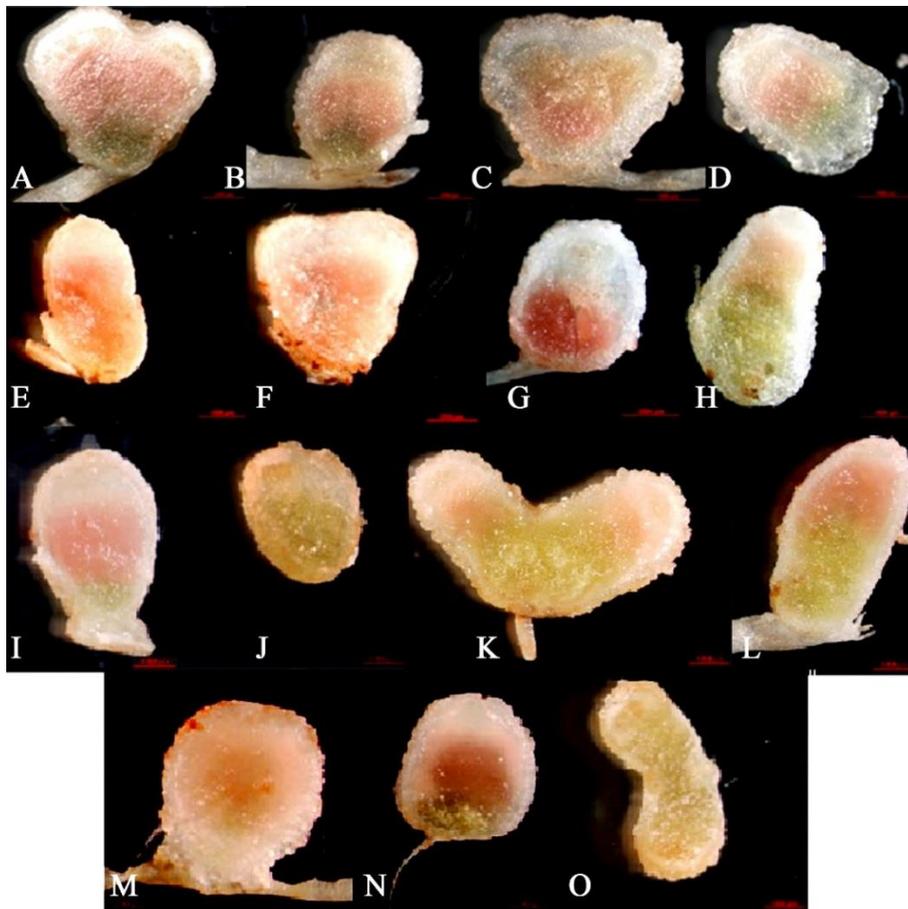


Figure 3. Nodules of the plants of *Cicer arietinum* L. inoculated with different strains of *Mesorhizobium* and visualizamo by means of stereoscope: A. FCAP 03, B. FCAP 16, C. FCAP 15, D. FCAP 26, E. FCAP 06, F. FCAP 17, G. FCAP 19, H. FCAP 29, I. FCAP 04, J. FCAP 09, K. FCAP 30, L. FCAP 31, M. FSZ 50, N. FSZ 51 y FSZ 52.



Figure 4. Representative sample of the chickpea plants obtained with each of the strains with respect to their controls.

Therefore, after evaluating some of the variants of the growth and development of the plants, it was determined that the strains of *Mesorhizobium* FCAP 04 and FCAP 26 were the best. It is worth to mention that the best strains at the promotion of plant development were FCAP 04 and FCAP 26. Strain FCAP 04 induced a higher chlorophyll content and was one of those which showed higher root biomass, and strain FCAP 26 induced the formation of a greater number of nodules and one of the highest yields in biomass, both aerial and radicular. Therefore, both strains were selected for field assays, where an increase of 46.8% and 54.3% in the number of seeds per plant was obtained with the strains FCAP 26 and FCAP 04, respectively, compared to the control without inoculation.

Together with the strains mentioned above, co-inoculations were carried out with the strains *Bacillus aryabhatai* FSZ 43 and *Bacillus halotolerans* FSZ 47, which were selected for their PGPR characteristics *in vitro*. On the other hand, to observe root colonization, selected *Mesorhizobium* strains were transformed to express fluorescent proteins. The colonization of *Bacillus* strains in wheat roots was observed by immunofluorescence. According to the greenhouse assays, the co-inoculation FCAP 26 + FSZ 47 showed a notable increase in length of the aerial part in plants, chlorophyll content in leaves and production of chickpea seeds per plant. It was also observed that some treatments managed to increase the content of carbon, potassium, iron, manganese and zinc in seeds, - in comparison to the

negative control. In addition, it was observed that carrying out a soil analysis in a simulation of chickpea-wheat rotation, independently of the added bacterial strains in comparison with the original soil, the carbon and nitrogen content in the soil was increased, being FCAP 26 + FSZ 47 the best treatment. This co-inoculation increased the nitrogen content by 159.3% in the soil, in only one cycle of rotation.

Another of the strains identified in this work was *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28, which showed the ability to inhibit the growth of 3 strains of *Fusarium* *in vitro* and *in vivo* (Figure 5) by inhibiting them on pregerminated seeds of chickpea, increasing the percentage of plants developed with respect to controls without inoculation.

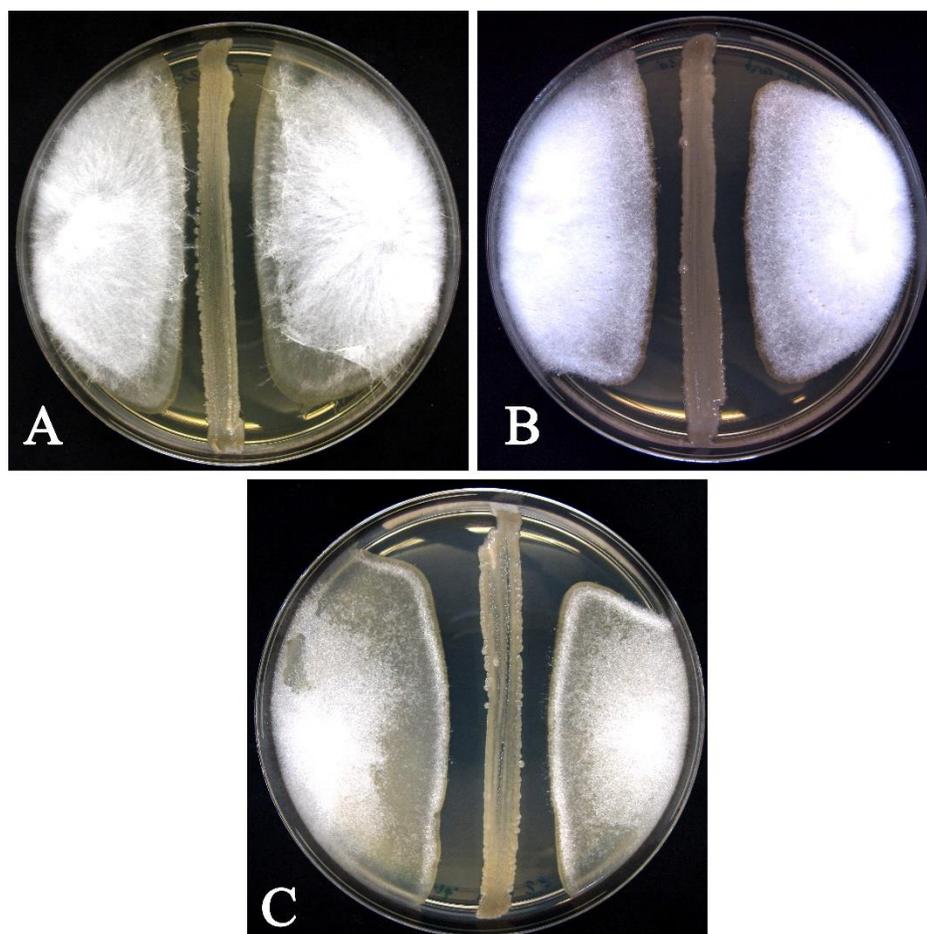


Figure 5. Antagonistic effect between the strain FSZ 28 and: A. *Fusarium annulatum*, B. *F. circinatum* and C. *Fusarium* sp. (30dpi).

On the other hand, *Mesorhizobium* sp FCAP 26 was selected to perform bioremediation tests on *Erophaca baetica* L. and *Astragalus pelecinus* L. plants. The joint inoculation of *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 and mycorrhiza (*Rhizopogon* spp, *Scleroderma* spp, *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*.), stimulates the growth and development of *Astragalus pelecinus* L. in soils contaminated with aluminum (2mM), lead

(15mM) and zinc (100 μ M). In this way, we can increase the vegetation cover and improve the state of the environment in soils contaminated with these metals.

Finally, the genomes of several selected strains were analyzed, and an assay was carried out under tropical microclimate conditions, using the strains *Mesorhizobium* FCAP 30 and *Mesorhizobium* FSZ 50, both isolated from chickpea nodules from soil from Fuentesauco, and phylogenetically close, but isolated with 14 years of difference.

Among the most noteworthy feature is plants grown in warmer tropical microclimate conditions (with an average temperature of 36.7 ° C) and drier; the aerial part of the plants remained small, while its root developed more, however, none of the strains managed to nodulate the plant and no significant differences were observed between the treatments. In contrast, the test placed in an area with a cooler microclimate of temperatures (25.2 ° C on average) and regular rainfall, the plants acquired an aerial part of greater length, however, their roots were lower.

Conclusion

1. The diversity of microorganisms isolated from the interior of nodules of *Cicer arietinum* L. from a single soil is higher than expected, both at a specific level and at higher levels, than what has been documented to date, since isolated a total of 7 genera and 24 species, not having described the genera *Aneurinibacillus*, *Domibacillus* or *Sphaerisporangium* as endophytes of chickpea nodules and having found a potential new species of the genus *Domibacillus*, so the nodules of *Cicer arietinum* L. are projected as a still unexplored source of bacterial biodiversity.
2. Following the results obtained from the phylogenetic analysis of the 16S rRNA, *recA*, *glnII*, *rpoB* and *atpD* genes, the existence of at least 5 phylogenetically divergent groups of the *Mesorhizobium* genus has been demonstrated, the diversity of *Cicer arietinum* L. endosymbionts is much larger than expected and documented. Therefore, the number of known natural potentials endosymbiont of the *Mesorhizobium* genus able to nodulate *Cicer arietinum* L. plants has increased.
3. *Mesorhizobium ciceri* FCAP 04 and *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 strains are able to colonize the root system of plants and increase the yield and production of chickpea crops in the field, without affecting the nutritional content of the grain, so they are potentially suitable biofertilizers for this crop.
4. The co-inoculation of *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 and *Bacillus halotolerans* FSZ 47 strains has allowed to increase the biomass and the production of chickpea seeds, besides increasing the levels of carbon and nitrogen in the soil, therefore, they are good candidates to design and develop efficient biofertilizers for *Cicer arietinum* L.
5. The different co-inoculations of the strains *Mesorhizobium ciceri* FCAP 04 and *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 with *Bacillus aryabhatai* FSZ 43 and *Bacillus halotolerans* FSZ 47 are able to colonize the root system of wheat plants and increase the content of some micronutrients such as iron, manganese and zinc in grains, therefore it can be determined that these inoculants can be used for other crops such as wheat when rotated with chickpea.
6. For the first time, *Aneurinibacillus migulanus* has been found inside the nodules of *Cicer arietinum* L.; Moreover, *Aneurinibacillus migulanus* FSZ 28 has antifungal capacity against *Fusarium* species, which makes it a potential candidate to be used as a potential biofungicidal agent for this crop.
7. The coinoculation of *Mesorhizobium* sp. FCAP 26 and mycorrhiza (*Rhizopogon* spp, *Scleroderma* spp, *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*) has improved the growth of *Astragalus pelecinus* L. in soils with high concentrations

of aluminum, lead and zinc, so this combination could be potentially useful in the reforestation of areas with soils contaminated with heavy metals, facilitating the increase of plant cover and improving the environment.