

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA



TESIS DOCTORAL

**AISLAMIENTO DE *Micromonospora* DE NÓDULOS
DE LEGUMINOSAS TROPICALES Y ANÁLISIS DE
SU INTERÉS COMO PROMOTOR DEL
CRECIMIENTO VEGETAL**

Autor

MARIA EUGENIA CERDA CASTILLO

Directores

Dra. Martha E. Trujillo Toledo

Dr. Eustoquio Martínez Molina

2008

MARTHA E. TRUJILLO TOLEDO PROFESOR DOCTOR CONTRATADO PERMANENTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EUSTOQUIO MARTÍNEZ MOLINA, PROFESOR CATEDRÁTICO DEL MISMO DEPARTAMENTO,

CERTIFICAMOS:

Que la memoria titulada AISLAMIENTO DE *Micromonospora* DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS TROPICALES Y ANÁLISIS DE SU INTERÉS COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL, presentada por Maria Eugenia Cerda Castillo para optar el grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, extendemos el presente certificado en Salamanca a 30 de Octubre de 2008.

Fdo. Dra. Martha E. Trujillo Toledo

Fdo. Dr. Eustoquio Martínez Molina

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada AISLAMIENTO DE *Micromonospora* DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS TROPICALES Y ANÁLISIS DE SU INTERÉS COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO VEGETAL, presentada por Maria Eugenia Cerda Castillo para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Martha E. Trujillo Toledo y del Dr. Eustoquio Martínez Molina en el Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Salamanca a 30 de Octubre de 2008.

Fdo. Ángel Domínguez Olavarri

AGRADECIMIENTOS

El gran dilema al culminar una etapa de la vida sea cual sea, es plasmar en pocas palabras los sentimientos de agradecimiento a las personas que de una u otra forma han contribuido a que el camino recorrido para alcanzar la meta propuesta haya sido lo mas llevadero posible y se llegue a un feliz término.

Con la finalidad de no caer en el error involuntario de olvidar escribir el nombre de algunas personas en particular, que me hayan apoyado a lo largo de estos años para poder culminar con éxito este proyecto, por ello y con el perdón de cada una de las personas a quienes verbalmente les he transmitido mi agradecimiento sincero y humilde e incluso a quienes todavía no he tenido la oportunidad de hacerlo, omitiré plasmar en una hoja el nombre de cada uno de ustedes, así como a las diferentes instituciones u organismos.

Sé que es la palabra mas usada y escuchada por el oído de muchos, pero quiero decirles GRACIAS infinitas GRACIAS a tod@s por todo, por contribuir de una u otra forma a mi formación a nivel profesional a través de la adquisición de nuevos conocimientos científicos, transmitido por directores, doctores, compañeros y amigos, así como a todos aquellos que han aportando en mí, nuevos conceptos en el plano humano y social, a quienes hicieron que dicho proyecto, desde el inicio, que comenzó con la partida de mi país hacia este lado del charco (España-Europa), fuera posible, a quienes me recibieron y me hicieron sentir muchas veces que no estaba sola, haciendo mi estancia en tierras españolas menos frías y solitarias.

Regreso a casa diciéndome....”No llores porque ya se terminó....sonríe, porque sucedió.”(Gabriel García Márquez), y aunque esté al otro lado del charco (Nicaragua-Centro America) a miles de kilómetros creo que “No toda distancia es ausencia, ni todo silencio es olvido” (Mario Sarmiento).

Me marchó con la mayor lección aprendida...“ La sabiduría consiste en saber que se sabe lo que se sabe y saber que no se sabe lo que no se sabe” (Plutarco), y que... “Profesional no es el que obtiene un título, sino el que sabe valorar a los demás por lo que son” (Proverbio chino).

Culmino mi agradecimiento, manifestando lo siempre dicho: mi humilde choza (casa) siempre tendrá las puertas abiertas para cada uno de los que me esperan, se quedan o parten a otras tierras, y espero tener la oportunidad de compartir nuevas aventuras y experiencias con ustedes, como el calor de mi tierra y mi gente, nuestra cultura e historia, así como una pequeñísima parte del nuevo mundo, y como dicen los españoles... “Hasta luego”.

*Dedicada a mi madre Maria
Lidia Castillo y a mi
familia.*



*“Lo que sabemos es una gota
de agua; lo que ignoramos es
el océano.” Isaac Newton*

Phaseolus vulgaris, L

INDICE

Página

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ECOLOGÍA DE LAS INTERRACIONES MICROBIANAS CON LAS PLANTAS	2
1.2. LAS LEGUMINOSAS	6
1.2.1. La alubia (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	9
1.2.1.1. Morfología	10
1.2.1.2. Germinación	11
1.2.1.3. Agronomía	12
1.2.1.4. Plagas y Enfermedades	13
1.2.1.5. Utilización y aprovechamiento	13
1.2.2. El cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>)	13
1.2.2.1. Morfología	15
1.2.2.2. Germinación	16
1.2.2.3. Agronomía	16
1.2.2.4. Plaga y Enfermedades	17
1.2.2.5. Utilización y Aprovechamiento	18
1.2.3 El Lupino o altramuz (<i>Lupinus spp.</i>)	18
1.2.3.1. Morfología	19
1.2.3.2. Germinación	19
1.2.3.3. Agronomía	21
1.2.3.4. Plagas y Enfermedades	22
1.2.3.5. Utilización y aprovechamiento	22
1.3. ACTINOBACTERIAS	23
1.4. GÉNERO MICROMONOSPORA	25
1.4.1. Clasificación taxonómica	26
1.4.2. Hábitat	27
1.4.3. Importancia del género	31

1.5. BIODIVERSIDAD BACTERIANA Y TAXONOMÍA	32
1.5.1. Métodos de genotipado para analizar la diversidad bacteriana	33
1.5.2. La importancia del gen ARNr 16S en la taxonomía bacteriana	35
1.5.3. La caracterización fenotípica como complemento de los estudios moleculares	37
OBJETIVOS	40

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Micromonospora* DE LEGUMINOSAS TROPICALES

2.1. INTRODUCCIÓN	42
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	44
2.2.1.1. Recogida de la muestras	44
2.2.1.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros de cepas a partir de nódulos	45
2.2.1.3. Mantenimiento y conservación de cepas	46
2.2.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	46
2.2.2.1. Obtención de células	46
2.2.2.2. Extracción de ADN	46
2.2.2.3. Caracterización mediante microsátélites	47
2.2.2.4. Caracterización mediante BOX-PCR	48
2.2.2.5. Secuenciación del gen ribosómico 16S	49
2.2.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	52
2.2.3.1. Morfología	52
2.2.3.2. Crecimientos en diferentes medios de cultivos	52
2.2.3.3. Características bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos aislados	52
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.3.1. AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE CEPAS DE <i>MICROMONOSPORA</i> A PARTIR DE NÓDULOS	57
2.3.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	59
2.3.2.1. Caracterización mediante microsátélite	59

2.3.2.2. Caracterización mediante BOX-PCR	62
2.3.2.3. Secuenciación del gen ARN ribosómico 16S	65
2.3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	70
2.3.3.1. Morfología	70
2.3.3.2. Crecimientos en diferentes medios de cultivos	70
2.3.3.3. Características bioquímica y fisiológica de los microorganismos aislados	75
2.4. CONCLUSIONES	86

CAPÍTULO 3

COINOCULACIÓN DE *Micromonospora* Y *Bradyrhizobium* EN *Lupinus albus*

3.1 INTRODUCCIÓN	88
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	90
3.2.1. Microorganismos usados en este estudio	90
3.2.2. Crecimientos en medio libre de nitrógeno	90
3.2.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>nifh</i>	91
3.2.4. Ensayo de antagonismo entre <i>Micromonospora</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	93
3.2.5. Efecto de la coinoculación con <i>Micromonospora</i> y <i>Bradyrhizobium</i> en la nodulación de <i>Lupinus albus</i>	94
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
3.3.2. Crecimientos en medio libre de nitrógeno	96
3.3.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>nifH</i>	97
3.3.4. Ensayo de antagonismo entre <i>Micromonospora</i> y <i>Bradyrhizobium</i>	101
3.3.5. Efecto de la coinoculación con <i>Micromonospora</i> y <i>Bradyrhizobium</i> en la nodulación de <i>Lupinus albus</i> .	102
3.4. CONCLUSIONES	112

CAPÍTULO 4

COINOCULACIÓN DE *Micromonospora* Y *Rhizobium* EN *Phaseolus vulgaris* CRECIDAS EN CÁMARA CLIMATIZADA

4.1. INTRODUCCIÓN	114
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	115
4.2.1. Microorganismos usados en este estudio	115
4.2.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno	115
4.2.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>nifH</i>	115
4.2.4. Capacidad de nodulación por <i>Rhizobium</i> en semillas químicamente tratadas	117
4.2.5. Ensayo de antagonismo entre las cepas de <i>Micromonospora</i> aisladas de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Rhizobium phaseoli</i>	118
4.2.6. Coinoculación de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>Micromonospora</i> y <i>Rhizobium phaseoli</i> crecidas en cámara climatizada	119
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	121
4.3.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno	121
4.3.3. Amplificación y secuenciación del gen <i>nifH</i>	122
4.3.4. Capacidad de nodulación por <i>Rhizobium</i> en semillas químicamente tratadas	123
4.3.5. Ensayo de antagonismo entre las cepas de <i>Micromonospora</i> aisladas de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Rhizobium phaseoli</i>	125
4.3.6. Coinoculación de plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> con <i>Micromonospora</i> y <i>Rhizobium phaseoli</i> crecidas en cámara climatizada	126
4.4. CONCLUSIONES	134
5. BIBLIOGRAFÍA	136
ANEXOS	152

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ECOLOGÍA DE LAS INTERACCIONES MICROBIANAS CON LAS PLANTAS

De entre la gran diversidad de microorganismos presentes en la naturaleza llaman la atención los microorganismos que se encuentran vinculados o interactuando con las plantas por su potencial de utilización para usos biotecnológicos, pero también por su importancia para esclarecer su relación con la planta que interactúan. En los últimos años se ha observado un gran interés a nivel mundial en el estudio de las interacciones planta-microorganismo, fundamentalmente encaminado a generar nuevos conocimientos básicos aplicables a los sistemas de producción.

La rizosfera de las plantas se presenta como un ambiente favorable para el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos que forman parte de esa microbiota del suelo y, cuando se analizan muestras de estas zonas suelen presentar un número más elevado de microorganismos que los mismos suelos en las zonas que carecen de plantas. Algunos microorganismos penetran en las raíces de las plantas ya que éstas les proporcionan un lugar apropiado para su desarrollo al ser ricas en nutrientes orgánicos y factores de crecimiento requeridos por los heterótrofos, y suministrar condiciones relativamente constantes de pH y presión osmótica en un hábitat, el suelo, en el que la presencia de nutrientes y agua puede variar enormemente. La planta resulta favorecida de su interacción con los microorganismos de forma evidenciable en su salud y/o crecimiento.

De forma paralela, existen otras asociaciones en las que el microorganismo permanece de forma silente, mientras que la planta no resulta claramente beneficiada. Se trata de relaciones neutras en las que ni la salud ni el crecimiento de la planta se ven afectados y de las que se desconoce su finalidad. Sin embargo, los límites de dependencia entre microorganismo y planta son difíciles de determinar (Azevedo, 2000), ya que existen distintos tipos de relaciones, con beneficio mutuo, beneficio unilateral o sin beneficio conocido. Hoy sabemos que numerosos hongos permanecen en los tejidos de las plantas sin causar enfermedad aparente, y que llegan a comportarse como fitopatógeno en determinadas situaciones adversas. Por otro lado, durante la

coevolución de los fitopatógenos y sus hospedadores, los microorganismos pueden presentar mutaciones naturales que les hace perder la patogenicidad (Tan y Zou, 2001).

El término rizosfera fue empleado por primera vez por Hiltner en 1904 asignando la siguiente definición: “Es el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz”. Esta delgada capa de suelo ha sido estudiada intensamente en los últimos años; en la rizosfera es donde se produce ese complejo equilibrio ecológico entre la microbiota y las raíces de las plantas gracias a las relaciones biológicas de tipo sinérgico o comensalismo. La composición inorgánica del suelo también influye sobre la planta y la microbiota. Del tipo de suelo dependen el contenido de humedad y la aireación, que a su vez, influyen notablemente en la colonización microbiana. De éste modo, en el medio rizosférico existe una compleja interacción entre la planta, los microorganismos y el suelo, dando lugar a una serie de beneficios mutuos entre la parte biótica y con una importante intervención de la parte abiótica.

La planta genera beneficios sobre la microbiota cuando la raíz exuda azúcares, como monómeros o polisacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos que son aprovechados por las poblaciones microbianas. Los componentes del exudado, dependiendo de su naturaleza, pueden participar en la activación de los genes microbianos responsables de la iniciación de la asociación simbiótica.

Los microorganismos rizosféricos tienen también efecto sobre el crecimiento de las plantas: incrementan el reciclaje y la solubilización de nutrientes minerales, aportan por síntesis vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y giberelinas que estimulan el crecimiento de la planta. Para llevar estas funciones a cabo utilizan diferentes mecanismos, los cuales pueden ser directos, vía movilización de nutrientes, producción de fitohormonas, antibióticos, etc., e indirectos, estimulando la producción de fitohormonas por las plantas e induciendo sus sistemas de resistencia sistémica. De este modo, los microorganismos pueden verse como agentes biológicos útiles para los cultivos y susceptibles, por tanto, de ser utilizados como biofertilizantes por su potencial de favorecer la nutrición de las plantas y como elicitores de resistencia sistémica frente a patógenos. Aunque para obtener una eficacia real, estos microorganismos deben establecer una relación lo más estrecha posible con la planta y esta relación será tanto más íntima cuanto mayor sea el grado de interacción entre microorganismos y raíz.

Así, los microorganismos que establecen rizoendosimbiosis como los rizobia con las leguminosas serían los más eficaces en la fijación de nitrógeno con estas plantas, después estarían los microorganismos endofíticos y finalmente los microorganismos rizosféricos que son fácilmente desplazables por otros microorganismos. Por lo tanto, para seleccionar un microorganismo y utilizarlo en un cultivo es necesario partir de cepas aisladas preferentemente en la rizoplana de sus raíces, excepto en el caso de las leguminosas en que se parte directamente de los nódulos, y en último extremo de la rizosfera.

Los microorganismos endófitos son aquellos que desarrollan todo o parte de su ciclo vital en los tejidos internos de la planta. Los endófitos se introducen en la planta principalmente a través de la raíz al comienzo de la germinación o a través de las raíces secundarias. En menor medida, la fracción aérea de la planta (flores, hojas o cotiledones) constituye otra puerta de entrada a través de los estomas, o como resultado de un daño foliar. Una vez en los tejidos, los microorganismos pueden quedar confinados en el punto de entrada o extenderse hacia otras zonas de la planta, dentro de las células vegetales, en el espacio intercelular, o bien en el sistema vascular.

Estudiadas una amplia variedad de plantas, como tomate (*Solanum lycopersicum*), patata (*Solanum tuberosum*), trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium hirsutum*), colza (*Brassica napus*), arroz (*Oryza officinalis*) y cítricos, se ha comprobado que albergan importantes variaciones cuantitativas y cualitativas en la población de endófitos, atribuibles por un lado a la planta, como género, edad, tipo de tejido; y por otro lado a factores ecológicos como clima, estación del año, composición bacteriana del suelo etc. (Zinniel *et al.*, 2002; Conn y Franco, 2004).

Los endosimbiontes son aquellos microorganismos endófitos que establecen una relación de beneficio mutuo con la planta. El ejemplo clásico de este patrón de simbiosis en plantas dicotiledóneas está protagonizado por las bacterias saprofitas del suelo, *Rhizobium* (en leguminosas) y *Frankia* (en plantas actinorrizas), que promueven la fijación de nitrógeno atmosférico desde el interior de la célula vegetal (Fig. 1.1). *Rhizobium* y *Frankia* comienzan su relación simbiótica cuando la bacteria presente en la rizosfera de la planta, recibe el estímulo de determinados componentes del exudado de la raíz. Ésta es la primera de una concatenación de señales moleculares que conducirán

al desarrollo de un nuevo órgano en la planta, el nódulo, en el que la bacteria pondrá a disposición de la planta nitrógeno en una forma molecular fácilmente asimilable.

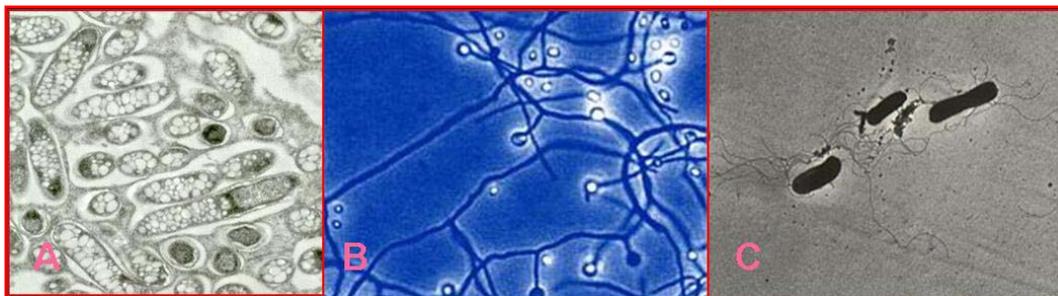


Fig. 1.1. A. *Rhizobium*; B. *Frankia*; C. *Bradyrhizobium*.

El género *Rhizobium* está constituido por bacilos Gram negativos que establecen simbiosis con las leguminosas y una especie de la familia *Ulmaceae* (*Parasponia andersonii*). Recientemente, el hábitat natural de los rhizobia se ha extendido a un tercer nicho, las raíces gramíneas. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ha demostrado estar presente de forma natural en las raíces de arroz (*Oryza breviligulata*) en cultivo rotatorio con trébol, sin la presencia de nódulos. Este hábitat en el interior de las raíces de cereales ya ha sido identificado como un importante reservorio de diversas bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno, conocidas como rhizobacterias estimuladoras del crecimiento de las plantas o PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Se trata de especies como *Acetobacter diazotrophicus* y *Herbaspirillum seropedicae* en caña de azúcar (*Sacharum officinarum*), o géneros como *Azoarcus* spp. y *Azospirillum* spp. en maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza* sp.). Como la mayoría de estas PGPR en sus homólogas plantas huésped, *R. leguminosarum* demostró ser un eficaz promotor del crecimiento del arroz tras su inoculación (Chaintreuil *et al.*, 2000).

El género *Frankia*, perteneciente a la familia *Frankiaceae* del Orden *Actinomycetales*, se compone de bacterias filamentosas, Gram positivas, y constituye el único género de actinomicetos capaces de inducir la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico en algunas angiospermas no leguminosas, denominadas plantas actinorrízicas.

A diferencia de la simbiosis rhizobia-leguminosa, en la que la planta hospedadora, con pocas excepciones, pertenece a una única familia, las plantas actinorrizas están distribuidas en 7 órdenes y 8 familias de angiospermas, *Betulaceae*, *Casuarinaceae*,

Coriariaceae, *Datscaceae*, *Eleagnaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* y *Rosaceae*. Esta asociación se encuentra ocupando una gran variedad de ecosistemas en el mundo que incluyen tundra ártica, dunas, costeras, bosque tropical y templado, ecosistemas alpinos, chaparral y matorral esclerófilo entre otros (Benson y Silvester, 1993).

Más recientemente se han descrito nuevas interacciones planta-microorganismo. Concretamente se han reaislado distintos tipos de actinobacterias a partir de nódulos radicales de fijación de nitrógeno y otras zonas de la raíz en plantas sanas, lo que parece indicar que estas ofrecen beneficios a las plantas. Se ha observado la presencia de actinobacterias del género *Micromonospora* como endófitos de plantas sanas de *Triticum aestivum* (Coombs y Franco, 2003), de *Casuarina equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005) y en nódulos de diversas plantas de *Lupinus angustifolius* (Fernández-Molinero, 2005 y Trujillo *et al.*, 2007) y *Coriaria myrtifolia* (Trujillo *et al.*, 2006).

Se han aislado cepas de *Streptomyces* endófitas a partir de raíces esterilizadas en superficie de 28 especies de plantas diferentes (Sardi *et al.*, 1992), y se ha logrado su visualización sobre el tejido radical (Coombs y Franco, 2003). Además se han visto beneficios de la interacción *Streptomyces-Rhizobium*-leguminosa en plantas de *Pisum sativum*, en las que se producía una mejora tanto en crecimiento como en salud en las plantas inoculadas con *Streptomyces+Rhizobium* en comparación con las plantas control en las que se inoculó sólo *Rhizobium*; aumentando la frecuencia de nodulación, el tamaño medio de los nódulos y el vigor y número de bacteroides de *Rhizobium* en su interior, e incrementando a su vez la asimilación de hierro y probablemente de otros nutrientes del suelo. De este modo, mediante la colonización de las raíces y los nódulos, *Streptomyces* puede actuar como una bacteria promotora del crecimiento en plantas (Tokala *et al.* 2002).

1.2 LAS LEGUMINOSAS

Las leguminosas son hierbas, arbustos o árboles, anuales o perennes que forman una de las mayores familias de angiospermas, con cerca de 700 géneros y 18.000 especies, distribuidas por todo el mundo, incluyendo plantas acuáticas, trepadoras y fuertemente xerofíticas, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales.

En la actualidad, muchas de las especies de la familia *Leguminosae* tienen una gran importancia económica. Algunas son importantes especies forrajeras que se pueden cultivar bien en terrenos pobres en nitrógeno o bien emplearse también como abonos verdes, es el caso de los tréboles (*Trifolium*), la alfalfa (*Medicago sativa*), la esparceta (*Onobrychis viciifolia*) o los altramuces (*Lupinus*). Otras se cultivan por el gran valor alimenticio de sus granos, ricos en albuminoides y fécula, como las alubias (*Phaseolus*), las habas (*Vicia faba*), los guisantes (*Pisum sativum*), los garbazos (*Cicer arietinum*), o las lentejas (*Lens culinaris*). Entre las oleaginosas se pueden mencionar el cacahuete (*Arachis hypogea*) y la soja (*Glycine max*). De las plantas leñosas merece ser citada la falsa acacia (*Robinia pseudoacacia*), útil para la repoblación forestal de países secos, y además plantas ornamentales como la “lluvia de oro” (*Laburnum anagyroides*) y la glicina (*Wisteria sinensis*). En medicina se emplean la gatuña (*Ononis spinosa*) y el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*) (Sitte *et al.*, 2004) (Fig. 1.2).



Fig. 1.2. Tipos de leguminosas de la familia Leguminosae

Otra característica a destacar en las leguminosas, es su capacidad de establecer simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno formando unos órganos en las raíces llamados nódulos, lo que permite que sean capaces de crecer en terrenos secos, pobres en nitrógeno o calcáreos, siendo las primeras colonizadoras tras la degradación de ecosistemas, e incrementar la fertilidad de los suelos.

La familia *Leguminosae*, está formada por plantas dicotiledóneas, cuyo nombre deriva del latín *legumen* (semillas con vainas). Aunque algunos autores la han separado en tres familias independientes –*Caesalpiniaceae*, *Mimosaceae* y *Papilionaceae*–, en el presente trabajo se sigue la clasificación descrita por Strasburger, (2004) en el que se consideran tres subfamilias que se distinguen por la disposición de sus piezas florales (Fig. 1.3).



Fig. 1.3. Flor de leguminosas

El hecho de que el cultivo de leguminosas enriquece el terreno es conocido desde hace mucho tiempo, habiéndose derivado del mismo la técnica de alternar cultivos de año en año siguiendo rotaciones en las que obligadamente interviene una leguminosa. Este proceso de fijación de nitrógeno en el suelo es una consecuencia de un proceso simbiótico entre las plantas y ciertas bacterias del género *Rhizobium*. La cantidad de nitrógeno liberado por las bacterias radiculares depende del suelo, de las condiciones de cultivo, de la especie cultivada e incluso de la variedad.

La mayoría de las especies de las subfamilias *Faboideae* y *Mimosoideae* en las que se ha estudiado la capacidad de nodulación, son capaces de establecer simbiosis con rhizobia (Allen 1981) formando nódulos radicales generalmente y caulinares ocasionalmente. En la subfamilia *Caesalpinoideae* se han encontrado nódulos en pocos de los géneros estudiados (Allen 1981; Sprent *et al.*, 1993; Foster 1998). Algunos autores sugieren que esto puede ser debido a que, aunque todas las leguminosas puedan ser capaces de tener una simbiosis con rhizobia como endófitos, no todas pueden formar nódulos (Bryan *et al.*, 1996 y Doyle, 1998).

1.2.1. La alubia (*Phaseolus vulgaris*)

La alubia, judía, faba, fríjol, poroto, o cualquiera de la infinidad de sinónimos con los que se conoce a esta especie (*Phaseolus vulgaris*) (Fig. 1.4) es considerado uno de los cultivos más antiguos, como lo han demostrado las múltiples investigaciones arqueológicas realizadas, que han encontrado restos diversos de semillas, fragmentos de



Fig. 1.4. Planta y fruto de *Phaseolus*

vaina o incluso plantas completas con diferente antigüedad. En la región suroeste de los EEUU se han encontrado restos de hace 2,300 años, en México de hasta 7,000 años e incluso de 8,000 a 10,000 años de antigüedad en Perú (Voysesst, 1993).

Actualmente está aceptado su origen americano sin ninguna controversia, basándose en las fuertes evidencias que han proporcionado los restos arqueológicos, los estudios botánicos realizados entre las formas salvajes y cultivadas, las referencias históricas reflejadas en textos del *Descubrimiento* y también en los datos lingüísticos de las lenguas indias nativas (Asensio, 1996).

La alubia común es una de las leguminosas más importantes del mundo, precedida solamente por la soja (*Glycine max*) y el cacahuete (*Arachis hypogaea*). Está ampliamente distribuida y es cultivada en todos los continentes excepto en la Antártida, siendo en el continente americano donde su producción es mayor.

La producción de alubia en Nicaragua se caracteriza por ser una actividad de pequeños y medianos productores en diferentes zonas del país. Otros países centroamericanos también son consumidores potenciales de alubia, particularmente países fronterizos como, El Salvador y Costa Rica. Debido a que la actividad agrícola en estos países ha disminuido, la necesidad de importar alubias de Nicaragua ha llevado a los productores nicaragüenses a incrementar la producción para la exportación.

La alubia es una planta anual, herbácea que no soporta las heladas, pero tampoco temperaturas superiores 32°C, ya que se produce el aborto de las flores o la deformación

de las vainas. Debido a estos factores la alubia se cultiva principalmente en el trópico, pero también en la zona templada de los hemisferios norte y sur, en altitudes que varían desde el nivel del mar hasta los 3.000 m, dependiendo de la latitud.

1.2.1.1. Morfología

En general el sistema radical de la alubia es superficial, encontrándose el mayor volumen de la raíz en los primeros 20 cm de profundidad, y tiende a ser fasciculado, aunque existe una gran variabilidad incluso dentro de la misma variedad, por lo que el tipo pivotante auténtico se puede presentar, aunque en un porcentaje muy bajo.

Esta especie, como todos los miembros de la subfamilia *Papilionoideae*, presenta nódulos distribuidos en la parte superior y media del sistema radical, que son colonizados por bacterias del género *Rhizobium*, las cuales fijan el nitrógeno atmosférico y de este modo ayudan a satisfacer los requerimientos de la plantas de este elemento.

El tallo presenta generalmente un diámetro mayor que las ramas y puede ser erecto, semipostrado o postrado según el hábito de crecimiento de la variedad.

Las hojas de la alubia están insertadas en los nudos del tallo y de las ramas, donde también se encuentran las estípulas que son bífidas. Las hojas son de dos tipos, simples o compuestas. Las hojas simples son opuestas, cordiformes, unifoliadas, auriculadas y acuminadas que se caen antes de finalizar el



Fig. 1.5. *Phaseolus vulgaris*

total desarrollo de la planta. Las compuestas son trifolioladas; los folíolos son enteros, con forma ovalada o triangular, cordiformes, pero sin aurículas, glabros o subglabros. Tienen peciólulos y estípulas en su base. En la inserción de estas hojas hay un par de estípulas de forma triangular y de inserción basi-fija (Fig. 1.5).



Fig. 1.6. Flor de *Phaseolus*

Las inflorescencias se consideran botánicamente como racimos de racimos, originados a partir de las tres yemas que se encuentran en las axilas formadas por las brácteas primarias y la prolongación del raquis. Se pueden encontrar en posición axilar o terminal. Las flores son típicamente papilionáceas (Fig. 1.6).

El fruto es una vaina con dos valvas unidas por dos suturas la dorsal y la ventral. Pueden ser fuertemente dehiscentes, cultivadas para grano secos; débilmente dehiscente, usadas para consumo verde o en grano, los frutos indehiscentes son consumidos únicamente verde.

Dependiendo de las variedades, las semillas pueden ser diversas. El número de semillas oscila de 4-10. Las reservas nutritivas en la semilla se concentran en los cotiledones. Se originan a partir de un óvulo compilótropo y su forma puede ser variable dependiendo de las variedades (cilíndricas, de riñón, truncadas, redondeadas, etc.). El color también es variable (blanca, morada o vinoso, pintas, negras, rojas), al igual que el tamaño (Fig. 1.7).

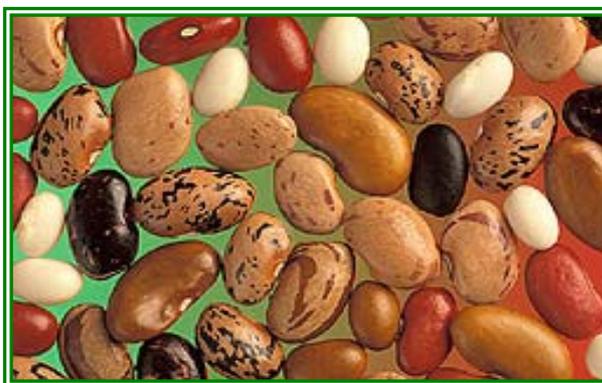


Fig. 1.7. Semillas de *Phaseolus*

1.2.1.2. Germinación

Para que el proceso de germinación tenga lugar (Fig. 1.8.), es necesario que se den una serie de condiciones ambientales favorables como son: un sustrato húmedo, suficiente disponibilidad de oxígeno que permita la respiración aerobia y, una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos y para el desarrollo de la plántula.

La absorción de agua por la semilla desencadena una secuencia de cambios metabólicos, que incluyen la respiración, la síntesis proteica y la movilización de reservas. A su vez la división y el alargamiento celular en el embrión, provoca la rotura de las cubiertas seminales, que generalmente se produce por la emergencia de la radícula.

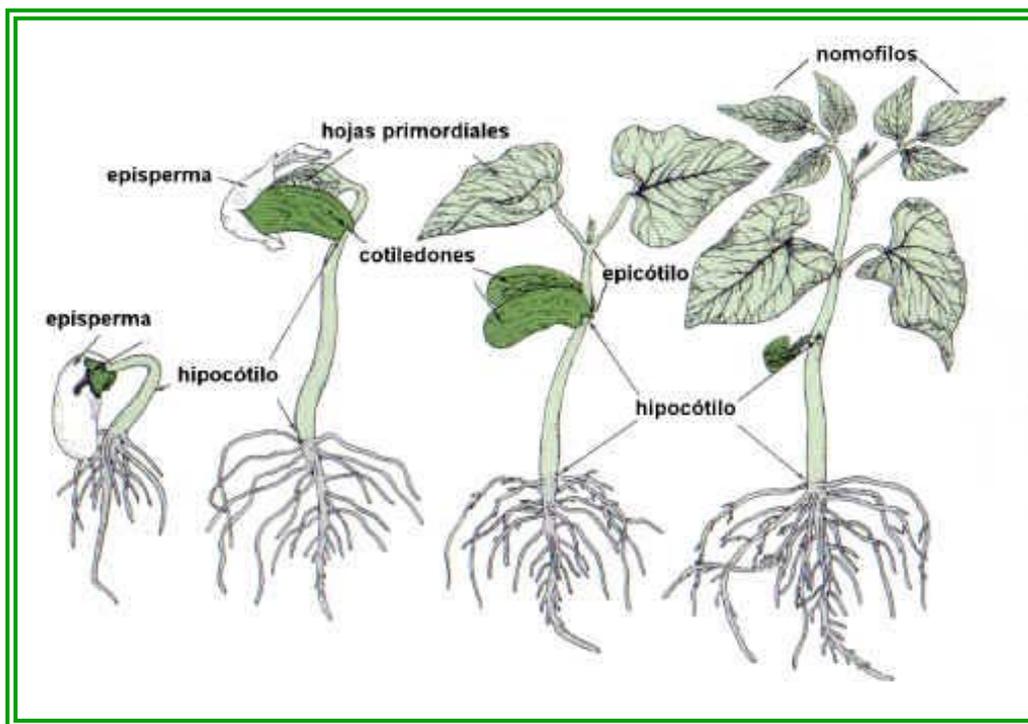


Fig.1.8: Proceso de germinación y crecimiento de una semilla de *Phaseolus*.

1.2.1.3. Agronomía

La alubia se considera un cultivo de áreas subtropicales, cuyo crecimiento óptimo está entre los 15 y 27°C. La germinación es lenta en condiciones de temperatura menores que 15°C, así mismo el crecimiento es lento cuando la temperatura es inferior a 20°C. Se adaptan mejor a terrenos bien drenados y de naturaleza ligera, no salinos, con pH entre 5.8 y 7.0, ricos en materia orgánica y donde no sea factor limitante la humedad. La falta de agua (estrés hídrico), especialmente durante la floración, reduce la cosecha. Las plantas de alubias demandan, en importante cantidad, los elementos fertilizantes (K, N, Ca, P) y son sensibles a las carencias de cobre, molibdeno (en suelos ácidos), manganeso (en suelos básicos) y, especialmente, de zinc; además, son sensibles al exceso de boro y cloro. El ciclo del cultivo, o período transcurrido entre la siembra y la recolección, para las variedades locales cultivadas varía de 90 y 150 días.

1.2.1.4. Plagas y Enfermedades

Entre las diferentes plagas que atacan a *Phaseolus vulgaris* se encuentra *Phyllofago* spp., *Empoasca Kraemer*, *Diabrotica* sp., *Ceremetoma* sp., *Vaginelus plebeius*, *Sarasinula plabeia*, *Bemisia tabaci*, *Apion Godmani*, *Estigmene acrea* y *Zabrotes subfaciatus* entre otros. También existen diferentes enfermedades que afectan los cultivos de *Phaseolus vulgaris* entre los cuales está la mancha angular (*Phaseoisariopsis griseola*), la roya (*Uromyces phaseoli*), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) y mustia hilachosa (*Thenatephorus cocumeris*).

1.2.1.5. Utilización y aprovechamiento

La producción de *P. vulgaris* tiene múltiples utilidades, aprovechando las distintas estructuras de la planta. Se cultiva para la alimentación humana, consumiéndose sus vainas verdes (judías o fréjoles verdes), los granos tiernos o los granos secos (alubias o frijoles). En algunos países de Latinoamérica y África también se consumen las hojas y flores jóvenes como vegetales frescos. Además, las hojas verdes, los tallos y las vainas son alimento para el ganado al igual que los rastrojos de las plantas secas. También son usados como abono verde y en países pobres como combustible para cocinar.

Estudios clínicos demuestran que el consumo regular de alubia ayuda en la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades del tubo digestivo, reduciendo el nivel de colesterol y glucosa en sangre (Singh, 1992). Esto es debido a que en su piel se encuentran gran cantidad de flavonoides que tienen además poder antioxidante. Los principales componentes del grano de alubia son glúcidos, proteínas, lípidos, sustancias minerales y fibra. Además destaca su alto contenido en calcio y hierro y vitaminas como tiamina (B1) y ácido fólico (Rodríguez-Castillo et al, 2003; Gómez, 1983; Lareo, 1988 y Santalla, 1995).

1.2.2. El cacahuete (*Arachis hypogaea*)

El término cacahuete viene del náhuatl *tlālcacahuatl*, que significa cacao de la tierra; compuesto por *tlalli* –tierra, suelo– y *cacahuatl* –granos de cacao– porque la vaina de sus semillas está bajo tierra. La planta y su fruto se conocen en México como cacahuete, mientras que España ha adoptado el término cacahuete. En casi todos los

demás países de habla hispana se emplea el vocablo taíno maní. Imprecisamente a veces se le llama nuez o avellana, que en realidad corresponden a otros vegetales (Fig. 1.9).

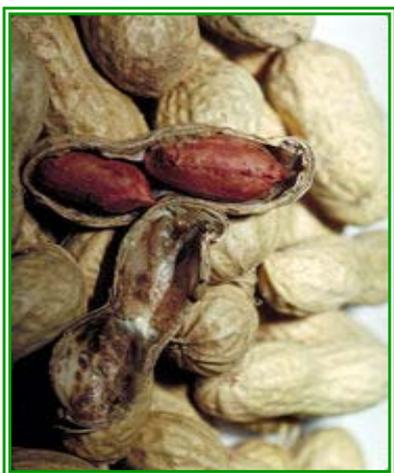


Fig. 1.9. Fruto de *Arachis*.

Arachis hypogaea, que es de origen americano, ha sido cultivada para el aprovechamiento de sus semillas desde hace 4000 ó 5000 años. Los conquistadores españoles observaron su consumo en México-Tenochtitlan, la capital del imperio azteca; en el siglo XVI fue llevado por los españoles al continente Africano donde se desarrolló un segundo centro genético (ICRISAT) y de domesticación de esta planta, y posteriormente lo distribuyeron por Europa y el resto del mundo.

El cultivo de cacahuete se ha extendido ampliamente por diferentes regiones de Asia y África. No obstante, y a pesar de que algunos países asiáticos como China e India son productores aproximadamente de las dos terceras partes de la cosecha mundial, el cacahuete es importante como fuente de aceite para cocinar principalmente en los países tropicales de América. Las cáscaras del fruto son un subproducto que se emplea como combustible.

Existen diferentes especies como *Arachis correntina*, *A. durannensis*, *A. monticola*, *A. batizocoi*, y *A. cardenasii*, en América del Sur originarias de Bolivia, norte de Argentina, Perú y Brasil, países donde se explota esta planta comercialmente para producir aceite vegetal. Entre las variedades que existen está la Florunner, Georgina Runner, Virginia NC-2, Sulamic, TATU, Blanco Manfredi-68, Colorado irradiado². En Nicaragua, la variedad que se cultiva es la Florunner, de la familia Runner. Esta variedad es reconocida por su alto rendimiento de SMK (Sound Mature Kemel), que permite la obtención de una buena calidad de aceite y posee excelentes características para su proceso industrial (Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, 2006).

En Nicaragua, el cacahuete es en la actualidad uno de los cultivos de mayor importancia agroeconómica de la región debido al papel que ha desempeñado en los últimos años en la economía nacional tras la caída del precio del algodón. La mayor

parte de la producción de este rubro se destina a la industria alimentaria y exportación generando importantes ingresos a nivel nacional y local por la creación de empleos.

El cacahuete es una planta anual, herbácea, erecta, ascendente, de 15 a 70 cm de alto, tallos ligeramente pilosos con ramificaciones desde la base, que desarrolla raíces cuando dichas ramas tocan el suelo. Se reconocen dos grupos principales de variedades, las de planta erecta y las de tipo rastrero. Casi todas las formas que se cultivan comercialmente pertenecen al primer grupo.

1.2.2.1. Morfología

Las hojas son uniformemente pinnadas con 2 pares de folíolos oblongos –ovados u ovoaovados de 4-8 cm. de largo, obtusos o ligeramente puntiagudos en el ápice, con márgenes completos; las estípulas son lineares puntiagudas, grandes, prominentes, y llegan hasta la base del pecíolo (Fig. 1.10).



Fig. 1.10. Plantas de *A. hypogaea*



Fig. 1.11. Flores sésiles de *A. hypogaea*.

Las flores son ostentosas, sésiles al inicio que nacen después en unas cuantas inflorescencias cortas, densas y axilares. El tubo del cáliz es de forma tubular. La corola es de color amarillo brillante de 0.9 – 1.4 cm. de diámetro y el estandarte que es de tamaño grande frecuentemente presenta manchas moradas. Las alas son libres de la quilla puntiaguda y de tamaño más grande (Fig.1.11).

Después de que las flores han sido fertilizadas, el pedicelo verdadero se desarrolla en un tallo o estaquilla de 3-10 cm. de longitud que gradualmente empuja el ovario dentro del suelo. Tan pronto como las flores producen la estaquilla que va al suelo, las flores desaparecen los frutos maduran y estarán listos para su cosecha en un período de tiempo que dura de 8 a 10 semanas (Fig. 1.12).



Fig. 1.12. Proceso de formación del fruto de cacahuete *A. hypogaea* . 1: Flor, 2: Estaquilla, 3, 4: Frutos inmaduro.

Las vainas se encuentran enterradas de 3-10 cm. debajo de la superficie. Son de 1-7 cm. de largo, de forma abultada de 1-4 semillas, de color marrón, con bordes prominentes reticulados y más o menos deprimidos entre las semillas. La testa es de color rojo claro o rojo oscuro.

La planta tiene una raíz pivotante compacta, bien desarrollada, que posee numerosas raíces laterales que crecen hacia abajo en la parte inferior. Las raíces principales y laterales forman asociaciones con micorrizas y especies del género *Rhizobium* que forman pequeños nódulos redondeados o lobulados.

1.2.2.2. Germinación

El proceso de germinación del cacahuete desde semilla a planta, al igual que en otras leguminosas como la alubia (*Phaseolus vulgaris*) y el altramuz (*Lupinus sp*) se lleva a cabo en 3 fases: hidratación, germinación y crecimiento. El cacahuete también es una especie con una germinación epígea, lo que determina que los cotiledones sean conducidos por el hipocotilo sobre el nivel del suelo, volviéndose los primeros órganos verdes fotosintetizadores.

1.2.2.3. Agronomía

La planta se desarrolla en climas cálidos, siendo susceptibles a las heladas. El cacahuete es muy adaptable y se cultiva en regiones continentales con veranos cálidos hasta los 45° de latitud norte y 40° de latitud sur. El tiempo de crecimiento y el ciclo vegetativo está determinado principalmente por la temperatura ambiental. El óptimo para la germinación es 30-34°C (máx. 45°C, min. 20°C). Para el crecimiento vegetativo

el óptimo es de 25-30°C, y temperaturas por encima de 34°C son nocivas para la inducción floral. El óptimo de temperatura influye en la tasa fotosintética neta, la inducción floral y el desarrollo de las vainas y por lo tanto es determinante para mejores rendimientos fuera de las zonas cálidas tropicales. Las temperaturas nocturnas no deberían ser inferiores a 10°C durante la maduración del fruto. Su ciclo dura alrededor de 4 meses hasta la maduración del fruto. El requerimiento óptimo de agua durante el ciclo vegetativo es de 500 mm, mientras que las necesidades mínimas varían entre 250 y 300 mm para las variedades precoces.

A diferencia de otras leguminosas, el cacahuete es muy particular en lo que respecta a sus requerimientos del suelo. Éste debe ser de estructura suelta, fértil, bien drenado, con alto contenido de calcio, fósforo y potasio; con pH entre 6 y 7. Las plantas extraen grandes cantidades de nutrientes cuando se cosecha no sólo el fruto sino también la planta entera para fines de forraje, de tal manera que obliga a fertilizar los cultivos siguientes. No obstante el maní tiene propiedades de mejorador del suelo para cultivos de no leguminosas y es un excelente cultivo precedente para cereales. Los residuos del precultivo deberán ser en gran parte descompuestos para la siembra. Cultivos adecuados dentro de la rotación son en especial cereales, sorgo, mijo perlero, maíz, arroz, además sésamo, saflor, algodón, camote (batata) y leguminosas de grano como *Vigna mungo*, o *Vigna unguiculata*.

1.2.2.4. Plaga y Enfermedades

Entre las plagas que afectan a *Arachis hypogaeae* están los Trips (*Frankliniella tritici*), arañas o los ácaros (*Tetranychus* y otras especies), los heloterios o belloterios (*Heliothis* spp.) las lagartas militares (*Spodoptera*, *Pseudaetia*), escarabajos (*Epicauta* spp.), áfidos (*Aphis croccivora*) disemina el virus de la roseta, un problema serio en África., gorgojo del cacahuete (*Caryedon* spp.).

La enfermedad más seria que afecta al cacahuete en los países tropicales, principalmente en las zonas húmedas, es la marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*). La mancha de la hoja (*Cercospora personata* y *C. arachidicola*), y hongos de suelo como *Rhizoctonia* spp, también tiene efectos muy perjudiciales.

1.2.2.5. Utilización y Aprovechamiento

Con frecuencia los cacahuetses se cultivan para utilizarse como forraje, heno, pastura o ensilado, en cuyo caso las plantas deben cosecharse antes de su floración. Los pequeños brotes también pueden utilizarse en la alimentación como legumbres. Son ricos en proteínas y calcio, pero si se consumen en grandes cantidades, pueden causar desarreglos en la digestión, por la presencia de compuestos como la aflatoxina.

Los cacahuetses se utilizan tostados o cocidos, los granos enteros o fraccionados se utilizan en dulces, pasteles, galletas y otras confecciones. Los granos frescos contienen del 32-35% de proteínas y del 40-50% de grasa y además cistina, tiamina, riboflavina y niacina, son por lo tanto muy nutritivos. Por su alto contenido en proteína tienen un papel importante en la dieta de millones de personas que no pueden adquirir proteínas y grasas animales.

1.2.3. El Lupino o altramuz (*Lupinus spp.*)

El lupino o altramuz es una planta nueva y antigua a la vez. Nueva respecto al reciente interés en el cultivo de variedades mejoradas; y antigua, porque ya se tiene conocimiento de su cultivo en suelos pobres desde hace 2000 años, empleándolo a su vez para la mejora de los suelos y abonado verde.



Fig. 1.13: Planta de *Lupinus*

El género comprende cientos de especies, de las cuales solamente una docena proceden de Europa y África, el resto principalmente de América (Gladstones, 1970).

Así como el lupino blanco (*Lupinus albus*) se cultivó hace ya muchos años en Europa, otras especies han sido cultivadas durante varios siglos en las cordilleras andinas de América del sur, siendo la base de la alimentación proteica de las poblaciones indígenas (Fig. 1.13).

La reciente historia del altramuz se refiere a la mejora genética de estas especies. Durante la segunda guerra mundial investigadores alemanes centraron su interés en la producción de esta planta para la obtención de proteínas. R. Von Sengbusch fue el

primero en obtener semillas libres de alcaloides, que han sido el punto de partida de las variedades denominadas dulces que actualmente se cultivan.

Actualmente la producción y el comercio mundial se concentra en este tipo de lupino dulce, siendo producido como forraje o leguminosa de grano mayoritariamente en Australia, seguida por países de la ex Unión Soviética, Polonia y Alemania. En España se ha observado un incremento en la superficie cultivada, pasando de las 2.700 hectáreas en el año 1985, hasta las 5.794 hectáreas cultivadas en el año 2006, siendo actualmente la Comunidad de Castilla y León el mayor productor, seguida de Extremadura (MAPA, 2007).

En el lupino existen especies de distinta procedencia, anuales y perennes, de tipo herbáceo y arbustivo. El nombre lupino proviene del latín *lupus* “lobo”, debido a la asociación con este animal y debido a la creencia que dicha planta empobrecía el suelo con su voracidad.

1.2.3.1. Morfología

Según M. Box (1961), el sistema radicular es pivotante y profundo, con diferencia entre especies en cuanto a su longitud. Tallo ramificado, glabro o pubescente, alcanzando alturas de más de un metro. Las ramificaciones laterales son de hasta cuarto orden, variando el punto de inserción en las especies.



Fig. 1.14. Inflorescencia de *Lupinus*.

Las hojas son compuestas, digitadas, increpadas en un largo pecíolo. Los folíolos son ovoides o lanceolados, según las especies, y su número varía de 5 y 12, siendo entre 7 y 9 lo más frecuente.

La inflorescencia es en racimo, compuesta de numerosas flores que pueden ser desde 4 hasta 30 como máximo. El color de las flores varía de blanco, amarillo, naranja, rosa, rojo, azul, verde, violeta y marrón. Es frecuente la existencia de floraciones sucesivas, hasta tres o cuatro (Fig.1.14).

Las vainas pueden contener de dos a nueve semillas, el número más frecuente está entre tres y seis. La dehiscencia de las vainas es un carácter propio de las especies silvestres, como mecanismo de reproducción.

Las semillas presentan formas y tamaños muy variados. El peso de 1.000 semillas es variable según la especie: de 240 a 600 g en el *L. albus* o de 130 a 200 g en *L. angustifolius*.

1.2.3.2. Germinación

La germinación se inicia con la imbibición de la semilla y continúa con la aparición de la radícula; ésta última presenta una gran elongación antes de que aparezca el hipocotilo. El lupino, a diferencia de otras leguminosas, es una especie de germinación epígea, lo que determina que los cotiledones sean conducidos por el hipocotilo sobre el nivel del suelo. Al terminar el crecimiento del hipocotilo, y a partir del punto en que se presenta insertos los cotiledones, se genera el crecimiento del epicotilo, el cual presenta una mínima elongación antes de dar paso a la primera hoja. La radícula, luego de la emergencia de las plántulas, va profundizando y creciendo rápidamente hasta transformarse en una fuerte raíz pivotante. Ésta presenta múltiples ramificaciones y gran cantidad de raicillas y pelos radicales, originándose un sistema radical de gran crecimiento. (Fig. 1.15).

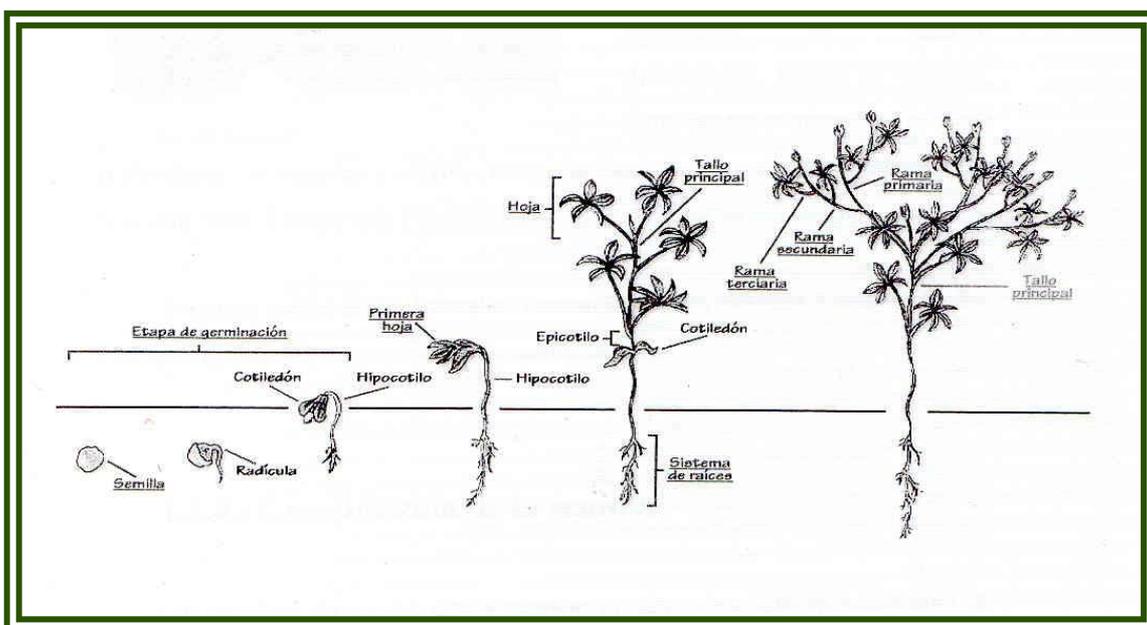


Fig. 1.15. Proceso de germinación de *Lupinus*

1.2.3.3. Agronomía

Los lupinos son plantas herbáceas anuales de porte erecto, que viven normalmente en terrenos sin carbonatos, de pH neutro a ácido, en tierras pobres. (Jambrina, 1993).

Lupinus albus (lupinus blanco) es el más cultivado desde tiempo remotos. Se ha utilizado como alimento para ganado, principalmente cerdos en montanera y ovino en pastoreo (Fig.1.16).



Fig. 1.16. Planta, cultivo y semillas de *Lupinus albus*.

Se cultiva en pequeñas parcelas al oeste de la provincia de Salamanca, en época de otoño; y al norte de las provincias de León y Palencia, en época de primavera. De semilla blanca-crema, más bien plana y con un contenido de proteínas sobre el 40%. Es la especie más productiva pero también la más exigente en cuanto a fertilidad y humedad, sobre todo en período crítico como la floración.

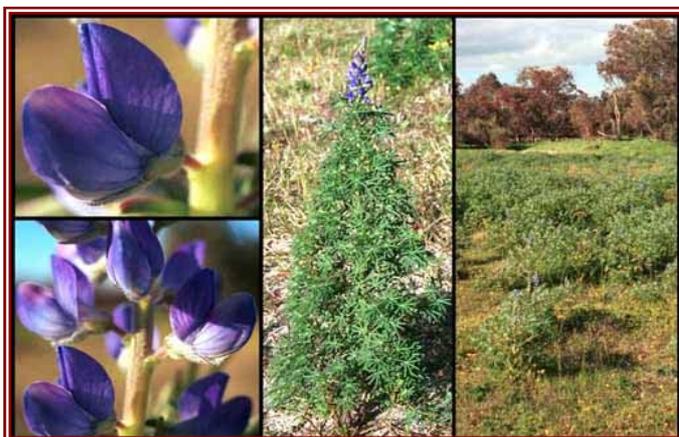


Fig. 1.17. Flor y cultivo de *L. angustifolius*

Lupinus angustifolius (lupinus de hoja estrecha) de manera espontánea tiene una distribución más plástica y abundante en la península, tanto en lo que se refiere al clima como a suelos, que lo mismo aparece en caminos y carreteras que entre jarales y pinares, tanto en terrenos costeros térmicos

arenosos, como en terrenos más o menos arcillosos y de pizarras del interior (Fig.1.17).

Prefiere suelos ligeramente ácidos o neutros, con buen drenaje, ricos en nutrientes, en especial cobalto, fósforo y potasio. No se desarrolla bien sin temperaturas moderadas

durante la fase vegetativa, y tolera bien las heladas. Exige una pluviosidad de entre 250 y 1.500 mm al año.

Se cultiva en la región septentrional de Europa, así como en Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Estados Unidos, rindiendo entre 500 y 2500 kg/ha según la riqueza del suelo. *Lupinus angustifolius* tiene un ciclo corto, en cambio *Lupinus albus* es de periodo largo.

1.2.3.4. Plagas y Enfermedades

Entre las principales plagas que afecta a *Lupinus* spp. están el gusano alambre (*Phorbia platura*), pulgones (*Sitona ssp.*), chinches (*Oxythyrea funesta*) y mosca (*Phorbia platura*).

Entre las enfermedades mas destacadas se encuentran la manchas marrones (*Pleiochaetae setosa*), oidio o moldeo pulverento (*Erysiphe poligoni*), hongo de raíz y cuello (*Phythium ssp.*) y hongo causante de la lupinosis (*Phomosis leptotromiformi*).

1.2.3.5. Utilización y aprovechamiento

El lupino cuenta con grandes cualidades como producto, principalmente por su contenido proteico además de sus alcaloides, que le confieren usos actuales y potenciales interesantes, más allá de los problemas que le implican como alimento.

El aprovechamiento del grano se dirige fundamentalmente a la alimentación del ganado, como complemento proteico de los cereales. El lupino dulce, puede sustituir a la harina de soja (*Glycine max*) en la alimentación de ovejas, y en cierta proporción en la de vacas y pollos. Recientemente está siendo introducido como fuente de proteína vegetal en granjas piscícolas dedicadas a la cría de mariscos (Chien, 2003).

La especie de mayor potencial productivo es *Lupinus albus*; aunque en función de diferentes condiciones edáficas, climáticas y aprovechamientos la especie *L. angustifolius* puede ser usado para grano y forraje.

El empleo del altramuz en la alimentación humana se destina a fines nutritivos y fruitivos. La forma amarga del altramuz es puntualmente consumida como aperitivo,

pero son los productos derivados de la semilla dulce los consumidos ampliamente en forma de harinas. Su composición nutricional presenta cualidades que superan a la soja (*Glycine max*), puesto que su baja proporción en fitatos y lectinas mejoran su digestibilidad; y su alto contenido en fibras solubles e insolubles y grasas insaturadas, lo hacen óptimo en dietas hicolesterolemiantes. Por todo ello, el lupino se presenta como un atractivo sustituto de la soja y de las alubias secas (*Phaseolus vulgaris*) (Mubarak, 2001).

Aparte de los usos alimentarios, tiene buen potencial de uso como abono verde, en cuyo caso, además de los beneficios generales sobre la calidad física y biológica del suelo que supone esta técnica agrícola, la simbiosis de lupino con bacterias del suelo pertenecientes generalmente al género *Bradyrhizobium* (Barrera *et al.*, 1997), promueve la fijación de nitrógeno y su incorporación al suelo. El lupino presenta una capacidad fijadora de nitrógeno de 150-200 Kg de N por hectárea, por lo que en cultivo rotatorio, podría disminuir la utilización de fertilizantes químicos (Robinson y Beyene, 2000).

1.3. ACTINOBACTERIAS

Las actinobacterias son microorganismos Gram positivos, con un contenido de guanina-citosina (GC) superior al 50% en su ADN. Presentan desde una morfología unicelular hasta filamentosa, la mayoría son aerobios (metabolismo oxidativo), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (Magarvey *et al.*, 2004; Stackebrant y Schumann, 2006).

Constituyen el orden *Actinomycetales*, de la clase *Actinobacteria*. Dicho orden está compuesto por más de 220 géneros y cientos de especies que constantemente son descritas (www.bacterio.citc.fr).

Casi todos sus miembros desarrollan un micelio filamentoso que puede permanecer unido a la superficie del sustrato, al cual se le denomina micelio vegetativo, o bien puede desarrollarse hacia la parte externa, en cuyo caso se denomina micelio aéreo. Los filamentos individuales o hifas del micelio se subdividen en unidades, como producto del crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de esta estructura. A este proceso se le denomina septación y cada una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN (Holt *et al.*, 1994).

Una característica particular de muchas actinobacterias es la formación de esporas que son producidas en hifas especializadas, muchas de las cuales se desarrollan sobre el micelio aéreo. De manera general, estas estructuras carecen de movilidad aunque algunos géneros producen esporas flageladas. Las esporas producidas por la mayoría de las especies no son resistentes al calor y, la forma, número y disposición de éstas, es una característica específica en muchos géneros (Stackebrant y Schumann, 2006).

La mayoría de los géneros descritos corresponden a bacterias aisladas de suelos, sin embargo, en muchos casos no se ha estudiado cómo crecen y sobreviven en el medio ambiente. Son capaces de formar micelio sobre sustratos orgánicos asequibles, pero una vez agotados los nutrientes, inician nuevamente su diferenciación y la producción de esporas. La dispersión de las esporas por el ambiente va a depender de su forma e hidrofobicidad, de los artrópodos presentes en el suelo y del movimiento del agua intersticial. Así, las esporas hidrofílicas del género *Micromonospora* se separan y dispersan en el agua más fácilmente que las cadenas de esporas hidrófobas del género *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1984).

Las actinobacterias se encuentran distribuidas en diferentes hábitats, sin embargo su reservorio natural es el suelo donde conforman aproximadamente el 20-60% de la población microbiana. En el suelo su función ecológica principal es la descomposición de la materia orgánica a través de las enzimas que producen y que les permiten hidrolizar diversos compuestos. Las actinobacterias son capaces de descomponer la lignocelulosa y se han descrito algunas especies productoras de celulasas, xilanasas o proteasas (Rivas *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2004 a, b, c, d). El olor característico a tierra húmeda se debe a su actividad metabólica, a la producción de compuestos terpenoides (geosminas). Algunas especies son patógenos de humanos, animales o plantas, mientras que otras son fijadoras de nitrógeno (Williams *et al.*, 1984; Stackebrant y Schumann, 2006).

Además de la función ecológica, las actinobacterias han demostrado que son una fuente principal de metabolitos secundarios tales como antimicrobianos, antivirales, anticancerígenos, anticoagulantes, e inmunomoduladores entre otros (Bull *et al.*, 2000; Mincer *et al.*, 2002). Se estima que aproximadamente el 68% de estos productos son sintetizados por actinobacterias del género *Streptomyces*. Sin embargo, otros géneros

entre los que destacan *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Nocardia*, y *Streptoverticillium* son fuentes valiosas de metabolitos bioactivos de aplicación terapéutica y agroquímica (Omura, 1992; Horan, 1994; Kokare *et al.*, 2004).

1.4. EL GÉNERO *MICROMONOSPORA*

Micromonospora (*Mikros* = pequeño, *mono* = una y *spora* = espora), es un género de bacterias pertenecientes al Orden *Actinomycetales* caracterizadas por poseer esporas únicas y carecer de micelio aéreo.

Las colonias que crecen en medios sólidos inicialmente tienen un color amarillo o naranja claro, que va cambiando a naranja, rojo, marrón, azul-verdoso o morado. Al madurar las colonias adquieren un color progresivamente más oscuro con la producción de esporas marrón-negras, verde-negras, o negras y se vuelven mucosas.

La formación de esporas únicas en el micelio de sustrato es uno de los criterios que definen el género *Micromonospora* (Fig. 1.18), pero el crecimiento del micelio y la morfología de las esporas tienen poco valor diagnóstico para las especies. En ocasiones aparecen esporas en parejas de forma longitudinal y más raramente de forma múltiple y longitudinal (Luedemann y Casmer, 1973).

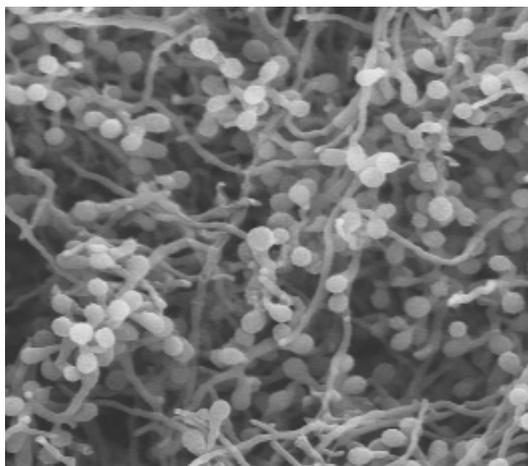


Figura 1.18. Morfología del género *Micromonospora*

Algunas especies producen pigmentos, sin embargo, éstos también carecen de valor diagnóstico a la hora de reconocer especies. Hay dos pigmentos de micelio característicos conocidos como indicadores de pH, el pigmento marrón-morado de *Micromonospora echinospora* y el pigmento azul-verdoso de *Micromonospora*

coerulea. También existen otros pigmentos difusibles característicos que son producidos por otras especies (Kawamoto, 1989).

Muchas cepas son altamente proteolíticas y celulolíticas. La tolerancia media al cloruro sódico es del 3% y el máximo es del 5%. No existe crecimiento por debajo de pH de 5,5 ni por encima de 9,5 y la mayoría de las cepas son incapaces de crecer a 45°C.

Las cepas de *Micromonospora* se caracterizan por una pared celular de tipo II. El peptidoglicano de la pared celular contiene ácido *meso*-diaminopimélico y ácido murámico, mientras que es frecuente la presencia de los azúcares glucosa, xilosa, arabinosa, galactosa y manosa en hidrolizados totales celulares. El perfil de fosfolípidos de casi todas las especies de *Micromonospora* corresponde al tipo II (Lechevalier *et al.*, 1977).

1.4.1. Clasificación taxonómica

El género *Micromonospora* fue descrito por primera vez en 1923 por Ørskov. En las Listas Aprobadas de Nomenclatura de 1980 (Skerman *et al.*), el género incluía 12 especies y siete subespecies que posteriormente fueron variando. Durante esa década se añadieron dos especies más, *Micromonospora olivasterospora* (Kawamoto *et al.* 1983) y *Micromonospora rosaria* (Horan y Brodsky, 1986); se unificó la especie de *Micromonospora brunnea* en *Micromonospora purpureochromogenes* y se combinó *Micromonospora carbonacea subsp. carbonacea* y *Micromonospora carbonacea subsp. aurantiaca* en *Micromonospora carbonacea* (Szabó y Fernández, 1984).

En los años noventa se incluyó *Micromonospora chersina* (Tomita *et al.*, 1992) y el género *Catellatospora matsumotoense* se transfirió al género *Micromonospora* como *Micromonospora matsumotoense* basándose en el análisis del gen ARN ribosómico 16S (Lee *et al.*, 1999).

Ya en el inicio de la década siguiente se llevó a cabo una reclasificación del género (Kasai *et al.*, 2000), basada en los análisis de la secuencia del gen de la girasa B (*gyrB*) y los experimentos de hibridación ADN-ADN, de modo que las subespecies *Micromonospora echinospora subsp. pallida* y *Micromonospora halophytica subsp. nigra* se redefinieron como especies, *Micromonospora pallida* y *Micromonospora nigra*

respectivamente; y las especies *Micromonospora echinospora* subsp. *ferruginea*, *Micromonospora rhodorangea* y *Micromonospora purpurea* quedaron dentro de la especie *Micromonospora echinospora*.

En el año 2004 se describieron las especies *Micromonospora endolithica* (Hirsch *et al.*, 2004), y *Micromonospora aurantionigra* (Thawai *et al.*, 2004), que fue renombrada en su validación como *Micromonospora auratinigra* y durante 2005 se describieron once especies más, *Micromonospora mirobrigensis* (Trujillo *et al.*, 2005), *Micromonospora citrea*, *Micromonospora echinaurantiaca*, *Micromonospora echinofusca*, *Micromonospora fulviviridis*, *Micromonospora inyonensis*, *Micromonospora peucetia*, *Micromonospora sagamiensis*, *Micromonospora viridifaciens* (Kroppenstedt *et al.*, 2005) y *Micromonospora eburnea* (Thawai *et al.*, 2005).

Durante el año 2006 otras dos nuevas especies se incorporaron al género, *Micromonospora siamensis* (Thawai *et al.*, 2006) y *Micromonospora coriariae* (Trujillo *et al.*, 2006). Posteriormente, las especies *Micromonospora chokoriensis*, *Micromonospora coxensis*, *Micromonospora lupini*, *Micromonospora saelicensis*, *Micromonospora narathiwatensis* fueron descritas (Ara and kudo., 2007, Trujillo *et al.*, 2007 y Thawai *et al.*, 2007). Recientemente este año se ha descrito cuatro especies nuevas *Micromonospora rifamycinica* y *Micromonospora chaiyapumensis*, *Micromonospora krabiensis* y *Micromonospora pattaloongensis* (Thawai *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2008 y Jongrugruangchok *et al.*, 2008a b). En la actualidad se conocen 37 especies del género *Micromonospora* (Tabla 1.4).

1.4.2. Hábitat

Los organismos pertenecientes al género *Micromonospora* aparecen con cierta frecuencia en suelos, pero lo hacen en cifras relativamente elevadas en hábitats acuáticos, como lagos, lodos y sedimentos fluviales (Leiva *et al.*, 2004, Thawai *et al.*, 2005, Trujillo *et al.*, 2005) y recientemente se han aislado de turba de bosque (Thawai *et al.*, 2007). El primero que los describió en suelo fue Jensen (1932) en Australia y posteriormente Kriss (1939) en suelos rusos. Solo el 2,5% de 5000 aislados de 16 muestras de suelos fueron cepas de *Micromonospora* (Lechevalier, 1964), pero el género comprende el 14% del total de actinomicetos aislados de arrozales de Japón

(Ishizawa *et al.*, 1969). Se han descrito así mismo, cepas del género *Micromonospora* aisladas de muestras de roca arenisca de la antártida (Hirsch *et al.*, 2004).

Cepas de este género se han aislado también de ambientes marinos, como arenas de playa (Watson y Williams, 1974, Zhao *et al.*, 2004), sedimentos de las profundidades marinas (Weyland, 1969), sedimentos del mar blanco y el mar negro (Solovieva, 1972, Solovieva y Singal, 1972), de esponjas marinas (Zhang *et al.*, 2006), de sustrato arenoso de cascadas (Ara and kudo., 2007) y recientemente se ha descrito una nueva especie proveniente de sedimentos de manglar (Huang *et al.*, 2008).

Se han encontrado además algunas cepas de *Micromonospora* en el tracto intestinal de termitas (Hungate, 1946, Sebald y Prevot, 1962), y de la panza de ovejas (Maluszynska y Janoto-Bassalik, 1974), estas cepas son anaerobias y su función en el hospedador no se conoce bien.

Más recientemente, el género *Micromonospora* se ha descrito como endófito de diversas especies vegetales, aislándose a partir de tejidos de diferentes plantas herbáceas (raíz, tallo y hojas) (Taechowisan *et al.*, 2003), y cepas estrechamente relacionadas con las especies “*Micromonospora yugolensis*” (Coombs y Franco, 2003), “*Micromonospora peucetica*” o *Micromonospora endolithica* (Conn y Franco, 2004), han sido aisladas de raíces de trigo (*Triticum aestivum*).

En estudios recientes, se ha observado de forma frecuente, que al realizar aislamientos de bacterias (tipo *Rhizobium*) a partir de nódulos de leguminosas, aparecían colonias en las placas de aislamiento que presentaban una morfología típica del género *Micromonospora*. En concreto, en muestras de *Lupinus angustifolius* se ha conseguido aislar a partir de los tejidos de nódulos fijadores de nitrógeno, diversas cepas del género *Micromonospora*, (Fernández-Molinero, 2005). También se han aislado cepas relacionadas con “*Micromonospora aurantinigra*” en nódulos de *Casuarina equisetifolia* (Niner *et al.*, 1996, Valdés *et al.*, 2005) y, a partir de nódulos de *Coriaria myrtifolia* se ha descrito una nueva especie de este género, *Micromonospora coriariae* (Trujillo *et al.*, 2006). Recientemente se han descrito dos nuevas especies aisladas a partir de nódulos de *Lupinus angustifolius*, *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis* (Trujillo *et al.*, 2007).

Estos resultados plantean la posibilidad de que estos microorganismos habiten en los nódulos de la planta y aporten un beneficio mediante la producción de metabolitos secundarios con actividad protectora frente a patógenos, o bien como promotores del crecimiento vegetal, siendo los nódulos de leguminosas además una posible fuente de nuevas especies de *Micromonospora* (Trujillo *et al.*, 2006; 2007).

Tabla 1.4: Especies del género *Micromonospora* descritas actualmente con sus códigos de acceso y sus fuentes de origen.

ESPECIE	CÓDIGO	ORIGEN	AUTOR Y AÑO
<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 ^T	Suelo, aire y medios acuáticos	(Foulerton 1905) Orskov 1923
<i>Micromonospora purpureochromogenes</i>	DSM 43821 ^T	suelo	(Waksman y Curtis 1916) Luedemann 1971
<i>Micromonospora coerulea</i>	DSM 43143 ^T	suelo	Jensen 1932
<i>Micromonospora echinospora</i>	DSM 43816 ^T	suelo	Luedemann y Brodsky 1964 emend. Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora pallida</i>	DSM 43817 ^T	suelo	(Luedemann y Brodsky 1964) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora carbonacea</i>	DSM 43168 ^T	suelo	Luedemann y Brodsky 1965
<i>Micromonospora halophytica</i>	DSM 43171 ^T	charca salina	Weinstein <i>et al.</i> 1968
<i>Micromonospora nigra</i>	DSM 43818 ^T	charca salina	(Weinstein <i>et al.</i> 1968) Kasai <i>et al.</i> 2000
<i>Micromonospora aurantiaca</i>	DSM 43813 ^T	suelo	Sveshnikova <i>et al.</i> 1969
<i>Micromonospora inositola</i>	DSM 43819 ^T	suelo forestal	Kawamoto <i>et al.</i> 1974
<i>Micromonospora olivasterospora</i>	DSM 43868 ^T	arrozal	Kawamoto <i>et al.</i> 1983
<i>Micromonospora rosaria</i>	DSM 803 ^T	-	Horan y Brodsky 1986
<i>Micromonospora matsumotoense</i>	IMSNU 220013 ^T	suelo forestal	(Asano <i>et al.</i> 1989) Lee <i>et al.</i> 1999
<i>Micromonospora chersina</i>	DSM 44151 ^T	suelo	Tomita <i>et al.</i> 1992
<i>Micromonospora endolithica</i>	DSM 44398 ^T	arenisca de terraza (1600 m)	Hirsch <i>et al.</i> 2004
<i>Micromonospora auratinigra</i>	DSM 44815 ^T	suelo	Thawai <i>et al.</i> 2004
<i>Micromonospora mirobrigensis</i>	DSM 44830 ^T	agua	Trujillo <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora inyonensis</i>	DSM 46123 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora sagamiensis</i>	DSM 43912 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora fulviviridis</i>	DSM 43906 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora viridifaciens</i>	DSM 43909 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora echinaurantiaca</i>	DSM 43904 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 ^T	suelo	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora citrea</i>	DSM 43903 ^T	fango de lago	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora echinofusca</i>	DSM 43913 ^T	excremento de chukar	Kroppenstedt <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora eburnea</i>	DSM 44814 ^T	suelo	Thawai <i>et al.</i> 2005
<i>Micromonospora siamensis</i>	TT2-4 ^T	turba de bosque pantanoso	Thawai <i>et al.</i> 2006
<i>Micromonospora coriariae</i>	DSM 44875 ^T	nódulos de <i>Coriaria sp.</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2006
<i>Micromonospora chokoriensis</i>	JCM 13247 ^T	Suelo arenoso	Ara and Kudo 2007
<i>Micromonospora coxensis</i>	JCM 13248 ^T	Suelo arenoso	Ara and Kudo 2007
<i>Micromonospora lupini</i>	DSM 44874 ^T	nódulos de <i>Lupinus</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2007
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	DSM 44871 ^T	nódulos de <i>Lupinus</i>	Trujillo <i>et al.</i> 2007
<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	BTG4-1 ^T	fango de pantano	Thawai <i>et al.</i> 2007
<i>Micromonospora rifamycinica</i>	AM105 ^T	suelo de manglar	Huang <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	MC5-1 ^T	suelo	Jonggruangchok <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora krabiensis</i>	JMC 12869 ^T	suelo	Jonggruangchok <i>et al.</i> 2008
<i>Micromonospora pattaloongensis</i>	TJ2-2 ^T	manglar	Thawai <i>et al.</i> 2008

1.4.3. Importancia del género

Una de las características que distinguen a los actinomicetos del resto de las bacterias, es la capacidad de producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores, inhibidores enzimáticos, etc.

Bacterias pertenecientes al género *Micromonospora* poseen un elevado potencial de producción de metabolitos secundarios (Fiedler *et al.*, 2005, Goodwin, 2005). A partir de cepas de este género se han obtenido importantes antibióticos tales como aminociclitoles (gentamicinas y sisomicinas), macrólidos (mycinamicina y rosamicina) y antibióticos polisacáridos (everninomicina) (Lazzarini *et al.*, 2000). La gentamicina se obtuvo de *Micromonospora purpurea* en 1958 y la sisomicina de “*Micromonospora inyoensis*” en 1978. Entre las sustancias pertenecientes al grupo de los antitumorales se encuentran ejemplos como la calicheamicina, aislada de la bacteria *Micromonospora echinospora* subsp. *calichensis*, encontrada en una muestra de suelo calizo proveniente de Texas (EEUU) (Lee *et al.*, 1987, Maiese *et al.*, 1989), o la dinemicina A, que fue aislada en 1989 de la bacteria *Micromonospora chersina* por el grupo Myers Squibbs (Miyoshi-Saitoh *et al.*, 1991) y recientemente se ha descrito una especie nueva, *Micromonospora lupini*, productora de una sustancia (lupinadicina) a la que se le atribuye la capacidad de inhibir el crecimiento de células tumorales de colon (Igarashi *et al.*, 2007).

Se ha descrito también el aislamiento de especies de *Micromonospora* con potencial para el control biológico debido a su capacidad para suprimir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Pythium* spp. y *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (El-Tarabily *et al.* 1997, Coombs *et al.* 2004).

Por otro lado, los datos aportados recientemente por Valdés *et al.* (2005) sobre la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre de una cepa aislada de nódulos de *Casuarina equisetifolia* e identificada como *Micromonospora* sp. sugieren la posibilidad de que un grupo muy selecto de actinomicetos, además de *Frankia*, sean capaces de fijar nitrógeno en interacción con plantas.

1.5. BIODIVERSIDAD BACTERIANA Y TAXONOMÍA

Se sabe muy poco sobre la diversidad de los microorganismos que constituyen los ecosistemas naturales. La imposibilidad de cultivar la gran mayoría de los microorganismos que existen en la naturaleza (>99%) mediante las técnicas estándar ha constituido una de las principales limitaciones en el estudio de la diversidad microbiana. Sin embargo, las nuevas técnicas de identificación y clasificación moleculares han permitido superar muchas de estas barreras, haciendo posible el estudio ecológico de las comunidades microbianas (Stahl, 1995).

La taxonomía se define como la ciencia que se ocupa de los principios, métodos y fines de la clasificación biológica. La clasificación de la gran diversidad de organismos vivos existente en el planeta en grupos establecidos en función de sus semejanzas es imprescindible para poder trabajar con ellos y comunicarnos de forma eficiente, organizar los conocimientos existentes sobre los mismos, y hacer predicciones y formular hipótesis para nuevas investigaciones.

La taxonomía bacteriana se divide en tres partes independientes pero interrelacionadas: clasificación, nomenclatura e identificación. La clasificación es la estructuración de los microorganismos en grupos (taxones), en función de sus similitudes o parentesco evolutivo. La nomenclatura es la asignación de nombres a los grupos taxonómicos de acuerdo con las reglas internacionales (International Code of Nomenclature of Bacteria) (Sneath, 1973). La identificación es el lado práctico de la taxonomía, consiste en determinar la identidad de un aislado como miembro de un taxón establecido.

Aunque la taxonomía numérica convencional ha sido el método más efectivo a la hora de establecer relaciones dentro del género, la taxonomía basada en las propiedades químicas, morfológicas y fisiológicas dio como resultado la asignación de bacterias a grupos supragenéricos de los cuales se demostró posteriormente una composición heterogénea (Goodfellow, 1989). De hecho, fue sólo a partir de la introducción de estudios de ácidos nucleicos cuando la clasificación supragenérica fue posible. Esta clasificación agrupa a los organismos en base a sus relaciones evolutivas formando un sistema filogenético. Desde la aparición en 1859 de “El origen de las especies” de Darwin, los biólogos comenzaron a desarrollar sistemas de clasificación filogenéticos

los cuales se basan en las relaciones evolutivas en lugar de la apariencia general. En un principio este sistema resultó de difícil aplicación para bacterias y otros microorganismos, principalmente debido a la falta de un buen registro fósil. Sin embargo, la comparación directa tanto del material genético y los productos génicos, como del ARN y las proteínas, permite superar muchos de estos problemas. Una clasificación basada en relaciones genómicas presenta una serie de ventajas, como la estabilidad del sistema de clasificación, su eficacia como sistema de identificación y la obtención de información útil que permita entender cómo han evolucionado varios grupos de bacterias y cómo pueden ser clasificados según sus relaciones ancestrales.

Taxonomía polifásica es el término acuñado por Colwell en 1970 y que designa al método taxonómico que clasifica, nombra e identifica los organismos recogiendo toda la información procedente de los métodos tradicionales de cultivo y de las nuevas tecnologías de biología molecular (Vandamme *et al.*, 1996).

La aplicación de la taxonomía polifásica ha provocado profundos cambios en la sistemática bacteriana, especialmente en lo que respecta a grupos bacterianos de especial interés industrial como los actinomicetos. La reclasificación de algunos taxones de actinomicetos como *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, etc., y la delineación de nuevos géneros de actinomicetos como *Beutenbergia* o *Tessaracoccus* son resultado del estudio polifásico.

Este tipo de taxonomía multidimensional está ampliamente establecida, aunque por el momento no existe un protocolo de pruebas y metodología. Es por ello que los estudios de taxonomía polifásica tienden a reflejar el interés individual del equipo de trabajo o el material de que se dispone (Bull *et al.*, 2000).

En cualquier caso, la identificación y clasificación de un aislado siempre integrará sus caracteres genotípicos, filogenéticos y fenotípicos.

1.5.1. Métodos de genotipado para analizar la diversidad bacteriana

Basadas en la PCR, se han desarrollado numerosas técnicas para determinar la diversidad genética de microorganismos aislados de muestras ambientales. En conjunto se denominan métodos de genotipado. En todas ellas, a continuación de la amplificación

enzimática, los productos de PCR obtenidos son visualizados sobre un gel de agarosa tras ser sometidos a una separación electroforética. De este modo se obtienen huellas moleculares que permiten agrupar a los microorganismos altamente relacionados y conocer así la variabilidad intraespecífica (Welsh y McClelland, 1990, Caetano-Anolles *et al.*, 1991).

La diversidad de métodos de genotipado es muy amplia y su elección en muchos casos dependerá del grupo bacteriano que se desee analizar. A continuación se señalan los más utilizados para el análisis de actinomicetos incluido el género *Micromonospora*.

Los RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990), AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) (Welsh y McClelland, 1990) y DAF (DNA Amplified Fingerprinting) (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Bassam *et al.*, 1992) consisten en la amplificación al azar de fragmentos del genoma con la única diferencia de la longitud de los oligonucleótidos empleados que en el primer caso es de 10 nucleótidos, 20 en el segundo y 5 en el tercero. Estos perfiles han sido utilizados para analizar cepas de *Actinomadura* (Trujillo y Goodfellow, 1997).

Las técnicas de rep-PCR (repetitive PCR), no consisten en amplificaciones al azar sino en la amplificación de regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (Versalovic *et al.*, 1991). Dependiendo de los elementos repetidos que se amplifiquen, podemos distinguir tres tipos de rep-PCR, en cada uno de los cuales se utiliza un oligonucléido diferente. La primera, REP-PCR (Repetitive extragenic palindromic) que es una secuencia de entre 35 y 40 pares de bases de elementos palindrómicos repetidos, la segunda, ERIC-PCR (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) que es una secuencia de entre 124 y 127 pares de bases que están diseñados a partir de elementos consenso intergénicos repetitivos de enterobacterias y la tercera, BOX-PCR, que son elementos de 154 pares de bases repetidos en el genoma bacteriano. En cada caso se realiza una amplificación selectiva de las distintas regiones genómicas localizadas entre las secuencias de REP, ERIC o BOX. (Bruijn *et al.*, 1996).

En concreto, la técnica de BOX-PCR se ha utilizado con éxito en el estudio de un género tan complejo como es *Streptomyces*, resultando una técnica rápida y altamente reproducible a la hora de reducir el número de cepas que representan diferentes especies siendo realmente una misma especie de este género. Estos resultados además han sido

ampliamente confirmados mediante estudios de hibridación ADN-ADN (Lanoot *et al.*, 2004). Así mismo, los perfiles de BOX-PCR han sido muy eficaces para analizar poblaciones de *Micromonospora* aisladas de diversas muestras ambientales (Carro, 2007; Maldonado *et al.*, 2008).

La técnica denominada micro/minisatelites (MSP-PCR), se basa en la amplificación de regiones de ADN repetidas y adyacentes denominadas microsátélites (repeticiones de 2 - 10 nucleótidos) o minisátélites (de 15 - 30 nucleótidos), las que se encuentran típicamente distribuidas a lo largo del genoma de los organismos eucariotas (Tautz, 1989) y procariotas (Zane *et al.*, 2002). Numerosos trabajos han demostrado la utilidad de la MSP-PCR para estudios de diversidad genética de diferentes géneros y especies. Fueron inicialmente descritos para estudiar enfermedades en humanos (Epplen *et al.*, 1997) y se han utilizado como marcadores en estudios de plantas (Rosselló *et al.*, 2001) y de microorganismos (Schwarzenbach, 2007). Los microsátélites tienen la particularidad de que el número de repeticiones de los motivos básicos que la conforma es muy variable y puede diferir de un individuo a otro, lo cual los constituye en una excelente herramienta cuando se quiere caracterizar cepas que representan la misma especie (Zane *et al.*, 2002).

El ribotipado es un método en el que el ADN se digiere mediante enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos son transferidos a una membrana en la que se hibridan con una sonda de ARNr marcado. Los patrones resultantes son característicos de cada especie (Grimont y Grimont, 1986). Recientemente, Trujillo *et al.* (2007) emplearon esta técnica para diferenciar entre dos nuevas especies del género *Micromonospora* aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno, *Micromonospora lupini* y *Micromonospora saelicesensis*.

1.5.2. La importancia del gen ARNr 16S en taxonomía bacteriana

El desarrollo de herramientas de identificación basadas en la detección de secuencias específicas para grupos taxonómicos logró un punto de inflexión en la determinación de la evolución y filogenia de los procariotas. Los genes ribosómicos son los más estudiados y los más abundantes en las bases de datos de secuencias debido a su importancia taxonómica.

El operón ribosómico se transcribe en un pre-ARN que incluye los siguientes componentes en el orden (5' → 3'): ARNr 16S, ARNr 23S, y el ARNr 5S. Se comenzó estudiando la molécula ARNr 5S y, tras los estudios de Woese y Olsen (1986) sobre evolución de microorganismos, se empezó a utilizar el gen ARNr 16S y el gen ARNr 23S para el estudio de la taxonomía y la filogenia bacteriana. Sin embargo, el ARN ribosómico 5S se ve limitado por su pequeño tamaño a la hora establecer relaciones filogenéticas (120 nucleótidos), mientras que los 3000 pares de bases del ARN ribosómico 23S dificultan su manejo. Así, la molécula intermedia (1500 pares de bases) que resulta más adecuada como cronómetro evolutivo es el ARN ribosómico 16S. Esta molécula presenta una serie de características adecuadas para esta función: gran cantidad de ARNr en las células, amplificación en una sola etapa, funcionalidad constante, un rango muy conservado y la gran disponibilidad de bases de datos para el análisis comparativo de la secuencia.

Sin embargo, con la acumulación de secuencias diferentes de los operones ribosómicos de distintos organismos, se ha cuestionado la homogeneidad de estos genes. Hay cepas que en los experimentos de reasociación ADN-ADN presentan un grado de homología suficientemente bajo como para justificar la existencia de dos especies diferentes y que, por el contrario, tras el análisis de las secuencias de sus ARNr 16S, éstas resultan idénticas (Fox *et al.*, 1992). Estos resultados apoyan que una alta similitud de las secuencias del ARNr 16S puede no ser necesariamente un criterio válido que garantice que dos microorganismos pertenezcan a la misma especie. Por lo tanto, si bien las secuencias del ARN 16S pueden ser utilizadas rutinariamente para distinguir y establecer relaciones entre géneros y especies bien definidas, en el caso de especies cuya divergencia es muy reciente estas diferencias pueden no ser reconocidas.

El análisis filogenético ha tenido cada vez mayor peso en taxonomía, y en 1997, Stackebrandt *et al.* proponen una nueva clasificación jerárquica para actinomicetos basada únicamente en relaciones filogenéticas. En lugar de utilizar una amplia variedad de propiedades quimiotaxonómicas, morfológicas y fisiológicas, la clasificación se fundamenta únicamente en las agrupaciones filogenéticas basadas en las secuencias del gen ARNr 16S. Definiendo así una nueva clasificación de los géneros filogenéticamente cercanos que se agrupan en familias, subórdenes, órdenes, y subclases hasta llegar a una

nueva jerarquía, la clase *Actinobacteria*, independientemente de las características fenotípicas sobre las que se basó la clasificación del taxón en el pasado.

Actualmente la definición de un nuevo género o especie requiere la obtención de la secuencia de la molécula ARNr 16S completa o casi completa, el alineamiento de dicha secuencia con secuencias de referencia y la determinación de la relación filogenética del taxón con el que el organismo se agrupe.

La pertenencia de una nueva cepa a la clase *Actinobacteria* requiere valores de similitud de la secuencia del ARNr 16S superiores al 80%. Esto deriva del sistema de clasificación, y por lo tanto se determina por los organismos que están presentes en cada grupo. La realización de nuevos estudios a partir de otros genes conservados en los organismos que se agrupan mediante el análisis del ARNr 16S, permitirá validar la nueva estructura jerárquica propuesta.

1.5.3. La caracterización fenotípica como complemento de los estudios moleculares

Los métodos fenotípicos comprenden aquellos métodos que no están directamente relacionados con los ácidos nucleicos. Mientras que los datos genotípicos son utilizados para la localización de un taxón en un árbol filogenético, así como para el diseño general de un sistema taxonómico, los datos fenotípicos generan una clasificación práctica que permite la identificación de un determinado taxón.

Las pruebas fenotípicas clásicas estudian las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria. El estudio morfológico incluye una dimensión celular de aspectos como, forma, presencia de flagelos, tinción de Gram, etc., y una dimensión colonial, color, brillo, tamaño, etc. Los estudios fisiológicos y bioquímicos aportan información sobre el crecimiento del microorganismo sometido a diferentes condiciones de temperatura, valores de pH, concentración de sales, presencia de determinadas sustancias químicas como agentes microbianos; así como presencia o actividad de diversas enzimas, y capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno.

Existen otro tipo de pruebas fenotípicas, basadas en el estudio de determinados constituyentes químicos de la bacteria. Estas técnicas de quimiotaxonomía analizan entre otros, diversos componentes de las envolturas celulares, peptidoglicanos, lípidos

de membrana en su fracción polar, lipopolisacáridos o la estructura química de los ácidos grasos que los componen. Técnicas quimiotaxonómicas como la obtención de los perfiles de proteínas totales, consiguen rangos de identificación similares a los obtenidos por hibridación ADN-ADN (Vandamme *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

En el presente trabajo se plantea el aislamiento, caracterización e identificación de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de las leguminosas tropicales *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* recogidas en Nicaragua y que son de importancia agrícola en toda América Latina. Posteriormente se realizarán experimentos de reinoculación en planta con el fin de ampliar nuestros conocimientos sobre el papel que pueden desempeñar estos microorganismos en la nodulación y fijación de nitrógeno de las plantas hospedadoras.

Objetivos específicos:

1. Caracterización genotípica y fenotípica de actinomicetos endófitos del género *Micromonospora* aislados de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* cultivadas en la región de occidente de Nicaragua en Centro América.
2. Evaluar la capacidad de los aislados del género *Micromonospora* de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* de crecer en medios de cultivos libre de Nitrógeno.
3. Determinar la presencia del gen *nifH* involucrado en la fijación de Nitrógeno en cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Lupinus angustifolius*.
4. Evaluar la relación entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas con microorganismos fijadores de Nitrógeno para determinar la compatibilidad entre ambos microorganismos.
5. Evaluar el efecto en la nodulación de cepas del género *Micromonospora* coinoculadas con fijadores naturales de Nitrógeno en plantas de leguminosas.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Micromonospora* DE LEGUMINOSAS TROPICALES

2.1. INTRODUCCIÓN

La asociación planta-actinomiceto más conocida es la formada por el género *Frankia*, capaz de inducir la formación de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico en algunas especies de angiospermas conocidas como plantas actinorrícicas. Sin embargo, en los últimos años, se han descrito actinomicetos endofitos pertenecientes a diversos géneros como *Streptomyces*, *Streptosporangium*, o *Microbispora* aislados de plantas sanas (Sardi *et al.*, 1992; Coombs & Franco, 2003; Tokala *et al.*, 2002) y se ha sugerido que esta endobiota posee una actividad antimicrobiana muy importante (De Araujo *et al.*, 2000). De esta forma, se ha demostrado que algunas especies de actinomicetos que están presentes en la rizosfera de diversas plantas, son antagonistas efectivos de hongos patógenos (Crawford *et al.*, 1993; El-Tarabily *et al.*, 1997; El-Tarabily & Soliman, 2000).

Recientemente, el género *Micromonospora* ha sido descrito como endofito de diversas especies vegetales. En concreto, varias cepas aisladas de raíces de trigo (*Triticum aestivum*) fueron tentativamente identificadas como “*Micromonospora yulongensis*” y *Micromonospora endolithica* (Coombs & Franco, 2003; Conn & Franco, 2004). También se ha descrito el aislamiento de especies de *Micromonospora* con potencial para el control biológico debido a su capacidad para suprimir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Pythium* spp. y *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, (El-Tarabily *et al.*, 1997; Coombs *et al.*, 2004).

El nombre genérico *Micromonospora*, sugerido por Ørskov (1923) para su grupo III de actinomicetos hace referencia a la existencia de pequeñas (micros) esporas únicas (monos). Este género agrupa a aquellos actinomicetos que presentan esporas únicas sobre el micelio de sustrato, y que carecen de micelio aéreo. En medios de cultivos sólidos, las colonias que en principio son amarillas o anaranjadas, oscurecen con la producción de esporas de color marrón, verde oscuro o negro. Con frecuencia los hábitats acuáticos como lodos y aguas fluviales, sedimentos marinos y arenas costeras se consideran como fuentes naturales del género *Micromonospora*. Sin embargo, este

género también ha sido aislado de muestras terrestres (Hayakawa *et al.*, 1991) y charcas cercanas a minas de uranio (Trujillo *et al.*, 2005a).

Estudios recientes (Fernández-Molinero, 2005; Carro, 2007; Trujillo *et al.*, 2007) han informado acerca del aislamiento de poblaciones de *Micromonospora* a partir de nódulos fijadores de nitrógeno de leguminosas cultivadas en climas templados, demostrando que números significativos de este actinomiceto habitan este nicho. Por otro lado, los datos aportados recientemente por Valdés *et al.* (2005) sobre la capacidad de fijar nitrógeno en vida libre de una cepa aislada de nódulos de *Casuarina equisetifolia* e identificada como *Micromonospora* sp. sugieren la posibilidad de que un grupo muy selecto de actinomicetos, además de *Frankia*, sean capaces de fijar nitrógeno en interacción con plantas. Estos resultados llevaron a plantearnos la posibilidad de que estos microorganismos habiten en los nódulos de plantas cultivadas en zonas tropicales.

En América Latina las leguminosas son de gran interés en el ámbito agroforestal y económico entre las que podemos destacar las especies *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* L. Ambas especies son cultivadas en diferentes países de la geografía latinoamericana por ser parte de la dieta de la mayoría de la población, por su capacidad de fijar nitrógeno y por el papel que desempeñan en la recuperación de suelos erosionados.

Así pues, teniendo en cuenta el elevado índice de recuperación de cepas de *Micromonospora* sp. de nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus angustifolius* (Fernández-Molinero, 2005; Trujillo *et al.*, 2007), de *Pisum sativum* (Carro, 2007) y los resultados presentados por Valdés *et al.* (2005) consideramos que el conocimiento sobre la diversidad de especies en un nicho tan específico y el papel ecológico que puedan jugar estos microorganismos en los tejidos de las plantas merece ser estudiada y comprendida en detalle. Por otra parte, son cada vez más frecuentes los trabajos publicados que han demostrado que los procesos de fijación y nodulación en leguminosas no es exclusivo de las bacterias pertenecientes al grupo de los rhizobia (Moulin *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2005b).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1.1. Recogida de las Muestras

Las cepas utilizadas para la realización del siguiente estudio se aislaron a partir de nódulos de alubia (*Phaseolus vulgaris*) y cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) cultivadas en el Departamento de León que se encuentra localizado a 20 Km de la Costa Pacífica y a 90 Km de Managua (Fig. 2.1), su posición geográfica es 12° 26' al Norte y 86° 53' al Oeste, a una altitud sobre el nivel del mar de aproximadamente de 109.21 mts en la República de Nicaragua (Centro America).

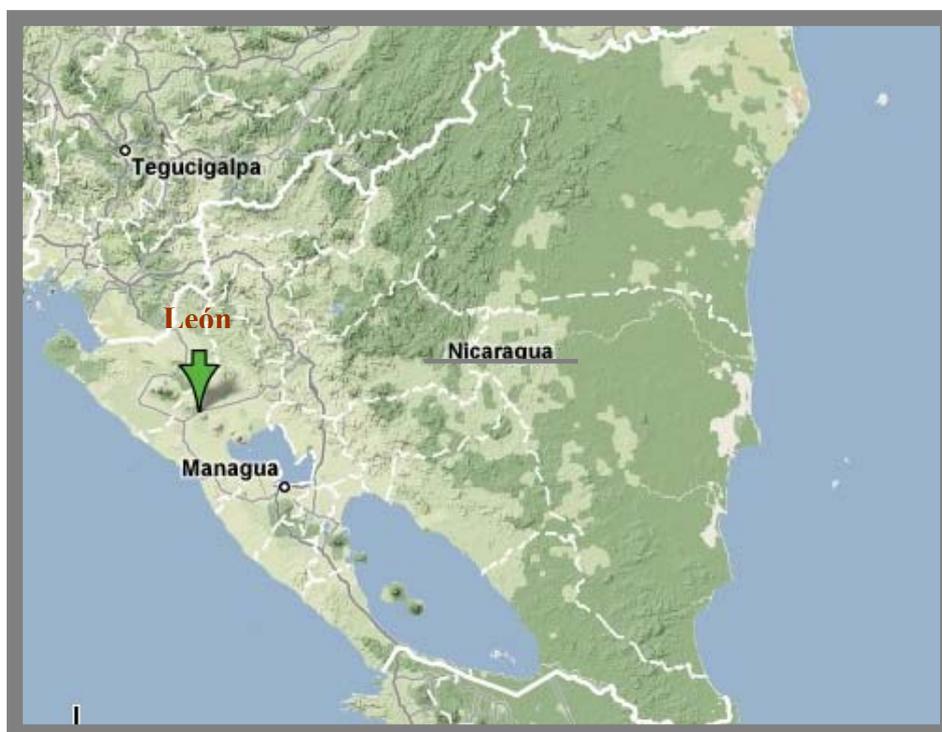


Figura 2.1. Mapa de localización de la toma de muestras utilizadas para los aislamientos de microorganismos de plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*.

La variedad de alubia empleada y que históricamente se cultiva en las zonas agrícolas del país es la criolla, por ser una de las variedades de mayor demanda comercial y de preferencia en la dieta alimentaria de la población (Fig. 2.2).

La variedad de cacahuete empleada en este trabajo es florunner, cultivada ampliamente por los productores agrícolas del país, debido a su alto rendimiento en la

producción, la obtención de aceite de calidad y la excelente característica que posee al momento de su proceso industrial.

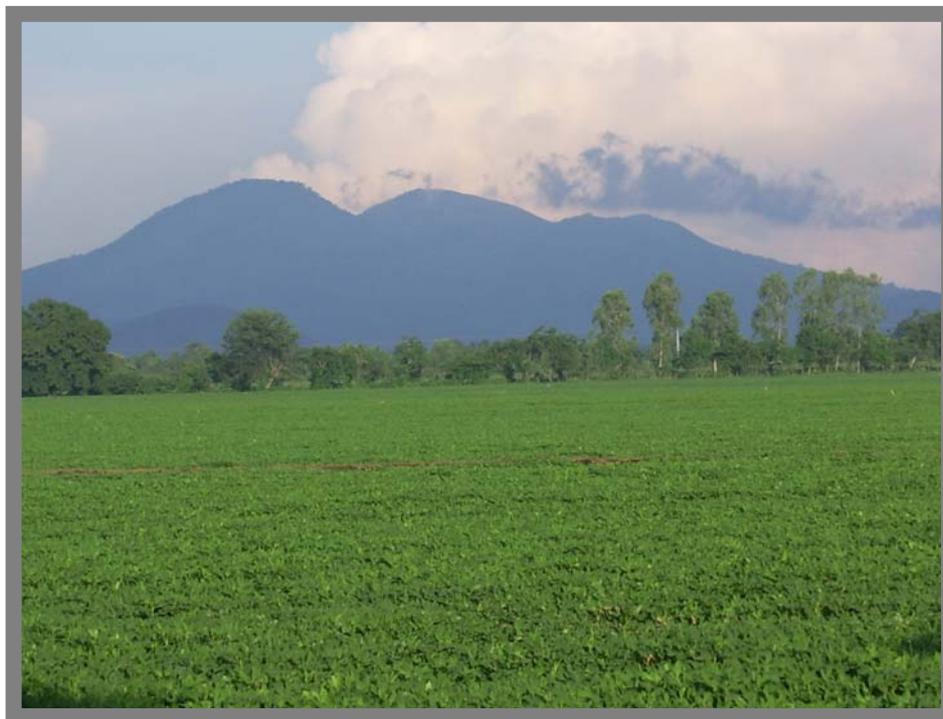


Fig. 2.2. Cultivo de plantas de *Phaseolus vulgaris* localizadas en las laderas de los volcanes de León, Nicaragua.

2.2.1.2. Aislamiento y obtención de cultivos puros de cepas a partir de nódulos

A partir de las plantas recogidas se realizó una selección de nódulos típicos rosados. Dichos nódulos se lavaron en agua destilada estéril para eliminar los restos de suelo y se esterilizaron en superficie sumergiéndolos en una solución de HgCl_2 al 2,5% (p/v) durante dos minutos. Posteriormente, en condiciones asépticas, se lavaron cinco veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de HgCl_2 . Los nódulos esterilizados se trituraron de uno en uno y su extracto fue sembrado con un asa de vidrio estéril en placas con medio de cultivo YMA (Vincent, 1970) (Anexo I, Tabla 2.1).

Las placas se incubaron a 28°C de cuatro a seis semanas al cabo de las cuales se produjo el crecimiento de bacterias del interior del nódulo. A partir de las colonias formadas por dichas bacterias se seleccionaron aquellas que presentaban una morfología característica del género *Micromonospora*.

Las colonias seleccionadas se sembraron por agotamiento en estría en placas con medio SA1 (Anexo I, Tabla 2.2) con el fin de obtener cultivos puros (Trujillo *et al.*, 2005).

2.2.1.3. Mantenimiento y conservación de cepas

Las cepas seleccionadas se sembraron en placas de medio SA1, las cuales, unas vez crecidas, se mantenían a 4°C para el uso rutinario. La conservación de las cepas a largo plazo se realizó por congelación a -80°C, utilizando como agente crioprotector una solución acuosa de glicerol al 20% (v/v).

2.2.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

2.2.2.1. Obtención de células

Las cepas aisladas se sembraron en medio SA1 y se incubaron durante 7 días a 28°C. Posteriormente, las células se recogieron en 500 µl de agua milli-Q estéril y se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos (Centrifuge 5417C Eppendorf). El sobrenadante fue eliminado y las células se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta su utilización.

2.2.2.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se empleó el Kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA con el siguiente protocolo:

1. Se utilizaron tubos Eppendorf , se añadieron 80 µl de la solución de extracción y se resuspendieron las células.
2. Incubamos a 95°C durante 10 minutos para provocar la lisis celular.
3. En el Eppendorf con las células se añadieron seguidamente 80 µl de la solución de dilución.

4. Agregamos 100 µl de solución de fenol-cloroformo-isoamílico (en proporción 25:24:1). Se mezclaron hasta conseguir una suspensión homogénea de color lechoso y se centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos.
5. Se recogieron 100 µl del sobrenadante y se añadieron 100 µl de solución de cloroformo-isoamílico (en proporción 24:1), mezclando bien hasta obtener una sola fase homogénea.
6. Se centrifugaron a 13.000 rpm. durante 5 minutos y se recogieron 80 µl del sobrenadante (ADN bacteriano).
7. Las muestras se conservan a -20°C.

2.2.2.3. Caracterización mediante microsatélites

Para la obtención de los perfiles de microsatélites, se realizó una amplificación enzimática del ADN de las cepas aisladas utilizando el primer CSM13 (Isogen) cuya secuencia es:

CSM13: 5' -GAGGGTGGCGGTTCT- 3'

Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 20 µl tal y como se describe en el Anexo III, Tabla 2.15. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones descritas en el Anexo IV, Fig. 2.3.

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando como tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA) a pH 8,5 (Anexo II, Tabla 2.14) en una cubeta de 15 x 20 cm (Bio Rad®) a 120 V durante 2 h, para así separar las diferentes bandas amplificadas. Como fuente eléctrica se utilizó el equipo Power PAC 300 (Bio Rad®).

Se obtuvo la imagen digital de los geles teñidos utilizando el equipo Gel Doc 2000 (Bio-Rad®) mediante luz ultravioleta. Los análisis de cada uno de los perfiles se realizó empleando el programa Bionumerics (Applied Math®, Kortrijk, Belgium). Los análisis de agrupamiento se realizaron aplicando el coeficiente de Pearson y el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

2.2.2.4. Caracterización mediante BOX-PCR

La amplificación de regiones de interés de ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En este caso se empleó el oligonucleótido universal BOXA1R diseñado para amplificar de forma selectiva las distintas regiones genómicas localizadas entre las secuencias de BOX y que ya ha sido utilizado en el estudio del género *Streptomyces* (Lanoot *et al.*, 2004) y en la caracterización de *Micromonospora* de ambientes acuáticos (Maldonado *et al.*, 2008).

La secuencia del oligonucleótido empleado fue:

BOXA1R: 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl tal y como se describe en el Anexo III, Tabla 2.16. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Singapore) empleando las condiciones descritas en el Anexo IV, Fig. 2.4.

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado en tampón TBE 1X (Tris-borato EDTA) a pH 8,5 (Anexo II, Tabla 2.14.) en una cubeta (Bio Rad®) de 15 x 20 cm a 120 V durante 2 h para así separar las diferentes bandas amplificadas. Como marcador de referencia se utilizó el "DNA Molecular Weight Marker XIV" (Roche®). Los resultados obtenidos se analizaron con los mismos equipos y sistemas de análisis que se describen en el apartado 2.2.2.3.

2.2.2.5. Secuenciación del gen ribosómico 16S

Amplificación del ADN

Se amplificó la secuencia comprendida entre las posiciones 27-1525 del ADN que codifica para el gen ARNr 16S, siguiendo la metodología descrita por Trujillo *et al.* (2007) y mediante el empleo de los oligonucleótidos SF1 y SR5 (Isogen), cuya secuencia es la siguiente:

SF1: 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG – 3'

SR5: 5'- AAGGAGGTGATCCA (AGCT) CC (AG) CA-3'

Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl empleando el kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR kit” siguiendo las instrucciones del fabricante. Los reactivos y concentraciones de la mezcla de reacción se describen en el Anexo III, Tabla 2.17. La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones descritas en el Anexo IV, Fig. 2.5.

Electroforesis del ADN

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando como tampón TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore®,) en una cubeta (Bio Rad®) de 15 x 20 cm a 80 V durante 1 h. Como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad®). Como marcador de referencia se empleó el patrón VI (Roche®). Las bandas amplificadas se observaron en el transluminador y se cortaron para su posterior purificación.

Purificación de los productos de PCR

Las bandas obtenidas y cortadas al separar los fragmentos amplificados mediante electroforesis se purificaron siguiendo el protocolo del kit comercial “QIAquick” (gel extraction kit) de QIAGEN®, y que se describe a continuación:

1. Se le añade Tampón QG en una proporción 3:1 a cada una de las bandas cortadas.
2. Se incuba a 50°C hasta disolver la agarosa (agitando cada minuto). Una vez disuelta la agarosa el color debe ser amarillo.
3. Se pasa la mezcla a la columna de purificación, siendo el volumen máximo de la columna de 800 µl, y se centrifuga a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) durante 1 minuto.
4. Se elimina el líquido del fondo de la columna.
5. Se añaden 500 µl de Tampón QG y se centrifuga a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) durante 1 minuto.
6. Se elimina el líquido del fondo de la columna.
7. Se añaden 750 µl de Tampón PE y se espera 5 minutos, luego se centrifuga a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) durante 1 minuto.
8. Se elimina el líquido del fondo de la columna y se centrifuga de nuevo 1 minuto a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) (para limpiar la membrana).
9. Se transfiere la membrana a un tubo de eppendorf.
10. Se añaden 50 µl de Tampón EB (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) directamente sobre la membrana, se espera 5 minutos y se centrifuga a 14.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5417C) durante 5 minutos.

El ADN purificado se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) utilizando como tampón TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore, USA) en una cubeta de 6 x 10 cm a 70 V durante 1 h para determinar la cantidad necesaria para la secuenciación directa del fragmento.

Secuenciación de los productos de PCR purificados

Para la secuenciación completa del gen ribosómico 16S se utilizaron los oligonucleótidos SR2, SR3, SR4 y SR5, basados en zonas universales del gen ribosómico 16S.

- SR2: 5'- GWATTACCGCGGCKGCTG – 3' (posición 519R de *E. coli*)
SR3: 5'- CCGTCAATTCMTTTRAGTTT -3' (posición 907R de *E. coli*)
SR4: 5'- GGGTTGCGCTCGTTG – 3' (posición 1100R de *E. coli*)
SR5: 5'- AAGGAGGTGWTCCARCC – 3' (posición 1522R de *E. coli*)

Se preparó una mezcla con 100 ng de ADN y 3 picomoles del oligonucleótido para cada reacción de PCR de secuenciación, cada una de ellas se llevó a un volumen de 8 µl totales con agua milli-Q. La secuenciación automática de cada fragmento se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, en un secuenciador capilar ABI PRISM (Applied Biosystems), empleando “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems).

Análisis de los fragmentos secuenciados

Para corregir las secuencias obtenidas en el secuenciador automático se utilizó el programa Chromas, mientras que el ensamblaje de la secuencia completa de cada gen se realizó con el programa Seqman II, incluido en el paquete de programas DNA Star (Lasergene). Las secuencias obtenidas se analizaron a través del programa BLASTn, versión 2.0, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquellas que presentan una mayor similitud (Brenner, 1995). Las secuencias obtenidas se alinearon posteriormente utilizando el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998).

Finalmente se utilizó el programa Mega 3.0 (Kumar *et al.*, 2001) para realizar los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas y para la construcción de árboles filogenéticos, utilizando el método de Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987) y seleccionando un “bootstrap” de 1000 réplicas.

2.2.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

2.2.3.1. Morfología

Para determinar el tipo de pared celular se realizó la tinción de la pared celular mediante la tinción de Gram. Para ello se tomó una muestra de un cultivo joven, de aproximadamente una semana de crecimiento. La tinción se realizó de acuerdo al protocolo de Doetch (1981). La preparación se examinó en un microscopio óptico CTRMIC (Leica®, Germany) con el objetivo de inmersión en aceite (100X).

2.2.3.2. Crecimiento en diferentes medios de cultivo

Para evaluar el crecimiento de las cepas en diferentes medios de cultivo se utilizó medio SA1, una vez crecidas se prepararon suspensiones en NaCl (0,85%) estéril y de esta suspensión de 10^9 u.f.c/ml se tomaron 10 μ l que se inocularon sobre el medio correspondiente a cada prueba.

Las condiciones óptimas de crecimiento, las características morfológicas y la pigmentación de las colonias se observaron en diferentes medios de cultivo: YMA, SA1, Avena, Bennett's y M65 (Anexo I), siguiendo la metodología descrita por Carro (2007). Las lecturas de los resultados se realizaron a los 7, 14 y 21 días.

2.2.3.3. Características bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos aislados

Tolerancia a pH

La capacidad de las cepas para crecer a diferentes pH: 4.5, 5.5, 8 y 9, se evaluó utilizando como medio base SA1 y ajustando a los diferentes valores de pH mediante tampones (Anexo II, Tabla 2.12). El medio SA1 concentrado (2X) se prepara de forma que al añadir el tampón se obtiene la concentración de nutrientes recomendada. El medio SA1 (2X) y los tampones se esterilizaron por separado y se mezclaron de forma aséptica justo antes de servir las placas. Si se produce crecimiento en la placa se

considera un resultado positivo, mientras que la ausencia de crecimiento indica un resultado negativo, siempre y cuando haya un correcto crecimiento en la placa control, que debe estar a un pH de 7.2. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

Tolerancia a la temperatura

La capacidad de crecimiento de los microorganismos a diferentes temperaturas (4, 12, 28, 37 y 45°C), se evaluó en medio de cultivo SA1. La temperatura considerada control fue la de 28°C. El crecimiento en las placas se observó a los 7, 14 y 21 días.

Tolerancia a la salinidad

La tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro sódico se evaluó en medio SA1 adicionado con 1, 3, 5, 7 y 8% de NaCl (p/v). Se utilizó como control positivo el medio SA1 sin NaCl. La presencia de crecimiento en las placas se considera un resultado positivo. Los resultados fueron registrados a los 7, 14 y 21 días después de la siembra.

Utilización de fuentes de carbono

Para evaluar la capacidad de los microorganismos para utilizar diversas fuentes de carbono, se siguió la metodología de Williams *et al.* (1983). Se preparó medio basal de Stevenson (Anexo I, Tabla 2.6).

Previamente las fuentes de carbono se prepararon como soluciones acuosas esterilizadas por tindalización a 100°C durante 10 minutos, tres días consecutivos. El control positivo consistió en añadir glucosa como fuente de carbono y en el caso del control negativo no se agregó ninguna fuente de carbono.

Para la lectura de los resultados se consideró un resultado positivo siempre que existiera un crecimiento igual o superior al del control positivo, y se considero negativo siempre que existiera un crecimiento igual o inferior al control negativo. Los resultados se analizaron a los 7, 14 y 21 días.

Hidrólisis de almidón

La hidrólisis de almidón se analizó en el medio SA1 suplementado con almidón. Se sembraron las cepas en placas con el medio que contenía almidón en una proporción de 10 g/l y se incubaron durante 14 días a 28°C. La actividad hidrolítica se detectó mediante tinción con lugol. El almidón se tiñe de azul, la aparición de zonas claras no teñidas alrededor de la colonia bacteriana indica una hidrólisis del almidón.

Hidrólisis de esculina

Para la realización de la prueba se utilizó el medio base según Williams *et al.* (1983) (Anexo I, Tabla 2.7) al que se le adicionó 1g/l de esculina. Si se obtiene el color negro el resultado es positivo, si el tubo permanece del color inicial el resultado es negativo. Como control se utiliza el mismo medio base sin esculina en el que se debe observar crecimiento del microorganismo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de arbutina

Para comprobar la capacidad de la degradación de un glucósido como es la arbutina, se utilizó el medio base según Williams *et al.* (1983) (Anexo I, Tabla 2.7) al que se le adicionó 1g/l de arbutina. Si el medio permanece del mismo color el resultado de la prueba es negativo, si se ennegrece el tubo se interpretaría como un resultado positivo. Como control se utilizó el mismo medio base sin arbutina en el que se debe observar crecimiento del microorganismo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de caseína

Para este estudio se utilizó el medio base SA1 estéril al que se le adicionó en forma aséptica una suspensión de 100 ml de caseína al 10 % (p/v) previamente esterilizada a 110°C durante 10 minutos, para alcanzar una concentración final de 1% (p/v). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, si a pesar de que haya crecimiento no se observa halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de xilano

En este estudio se inocularon las cepas en medio base SA1 al que se había añadido una suspensión de xilano en una proporción de 4 g/l para alcanzar una concentración final de 0.4% (p/v). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano. Si a pesar de que haya crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de gelatina

Para determinar la capacidad de los microorganismos de degradar la gelatina se utiliza el medio SA1 al que se le había añadido una suspensión de gelatina en una proporción de 4 g/l para una concentración final de 0.4% (p/v). Para poder observar el resultado de la prueba, se revela cubriendo las placas con una solución de HgCl_2 (Anexo II, Tabla 2.13). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor de la colonia bacteriana, si a pesar de que hay crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. En esta prueba se realiza una sola lectura a los 14 días.

Degradación de L-tirosina

Para comprobar la capacidad de los aislados de degradar la L-tirosina se inocularon en medio SA1 al que se le había añadido una suspensión de L-tirosina en una proporción de 4 g/l para alcanzar una concentración final de 0.5% (p/v). El resultado de la prueba es positivo si se observa la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano. Si a pesar de que hay crecimiento no se observa el halo, el resultado es negativo. Se hicieron lecturas de resultados a los 7, 14 y 21 días.

Degradación de urea

Se prepararon tubos con 2 ml de caldo de urea (Anexo I, Tabla 2.8). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó una suspensión que contenía 3.87 g del caldo de urea deshidratado en 100 ml de agua destilada a temperatura ambiente y esterilizada por filtración, se hicieron alícuotas en tubos pequeños estériles de 2 ml en cada tubos. Los tubos se inocularon con las cepas aisladas, y empleando *Proteus mirabilis* y *Escherichia*

coli como controles positivo y negativo respectivamente, y se incubaron durante 15 días a 28°C. Un resultado positivo se observa cuando se lleva a cabo la degradación de la urea a amoníaco, la cual produce un viraje de color inicial del medio rosa a un color púrpura indicador de la existencia de la hidrólisis.

Degradación de tween

La capacidad de los microorganismos de degradar el tween 20 y 80 por la actividad de las lipasas se evaluó en el medio basal descrito por Sierra (1957) (Anexo I, Tabla 2.9). El tween se esterilizó separadamente a 110°C por 20 minutos y se adicionó al medio basal (Sierra, 1957) para una concentración final de 1.0% (v/v). Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el tween aparece en el medio de cultivo un precipitado alrededor de las colonias debido a la combinación de Ca^{2+} y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no posee la capacidad para hidrolizar el tween no se observa ningún tipo de precipitado. Los resultados fueron registrados a los 7, 14 y 21 días después de la siembra.

Producción de Catalasa

La catalasa degrada el peróxido de hidrógeno hasta agua y oxígeno. Los aislados se cultivaron en medio de agar nutritivo SA1, sobre las colonias crecidas se añadieron unas gotas de H_2O_2 de 30 volúmenes (Panreac®, España). La reacción se considera positiva cuando aparecen burbujas de oxígeno. Es negativa si no se forman burbujas.

Producción de Oxidasa

La citocromo C oxidasa interviene en reacciones de oxidación de la cadena respiratoria (Kovacs, 1956). Los aislados se cultivaron en medio SA1, sobre las colonias crecidas se añadieron unas gotas de una suspensión al 1% de N, N, N', N'-Tetrametil-1,4-fenilendiamina diclorhidrato (Fluka®, Germany) en agua milli-Q estéril. La reacción se considera positiva cuando se observa la presencia de un color púrpura, producto de la oxidación, en un tiempo menor de 20 seg.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. AISLAMIENTO Y OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS DE CEPAS A PARTIR DE NÓDULOS

Las cepas se aislaron de nódulos de plantas de alubia (*Phaseolus vulgaris* var. Criolla) y de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) cultivada en el occidente de Nicaragua. A partir de los nódulos radicales de estas plantas (Figura 2.6) para el aislamiento de los microorganismos se usó el medio manitol extracto de levadura (YMA). Los códigos empleados son Fri para los aislamientos de nódulos de alubia y Nica para los aislamientos de nódulos de cacahuete. Se aislaron un total de 32 cepas, 22 de nódulos de alubias y 10 procedentes de nódulos de cacahuete. La selección de las colonias de las placas de aislamiento se realizó en base a las características morfológicas típicas del género *Micromonospora* (Figura 2.7). Estas cepas aparecen recogidas en el Tabla 2.18.



Fig. 2.6. Planta de *Phaseolus* (A) y *Arachis* (B)



Fig. 2.7. Raíces, nódulos y placa de aislamiento

Tabla 2.18: Microorganismos aislados de las plantas utilizadas para este estudio.

Código	Planta de Aislamiento		
	Nombre común	Nombre científico	Varietal
Nica 01	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 02A	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 02B	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 03	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 04	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 05A	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 05B	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 06	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 07	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Nica 08	Cacahuete	<i>Arachis hypogaea</i>	florunner
Fri 01	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 02A	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 02B	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 04A	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 05	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 07	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 09A	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 10	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 11	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 12	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 13	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 14	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 15	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 16	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 17	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 18	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 19A	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 19B	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 20A	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 20B	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 22	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla
Fri 24	Alubia	<i>Phaseolus vulgaris</i>	criolla

2.3.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

2.3.2.1. Caracterización mediante microsatélites

La diversidad microbiana obtenida mediante la técnica de microsatélites resulta de las diferencias en el número de unidades repetidas y se cree que estas diferencias son causadas por errores en la replicación del ADN, tales diferencias son detectadas en un gel donde migran a diferentes distancias de acuerdo con su tamaño (Jarne y Lagoda, 1996). Los perfiles obtenidos para cada una de las cepas aisladas indicaron una alta diversidad genética entre ellas (Fig. 2.8 y 2.9). El análisis de estos perfiles mediante el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de Pearson permitieron la diferenciación de las cepas en 4 grupos distintos para el caso de las aisladas de *Phaseolus vulgaris* (Fig. 2.10), y de 2 grupos para las cepas aisladas de *Arachis hypogaea* (Fig. 2.11) teniendo en cuenta una línea de corte con una similitud del 70%.

Según los resultados obtenidos mediante la técnica molecular de microsatélites podemos inferir que en nuestros aislados de alubia y cacahuete existe una diversidad genética significativa. Estos resultados confirman datos anteriores de otros estudios donde se ha aislado *Micromonospora* de las leguminosas *Lupinus angustifolius* (Fernández-Molinero, 2005) y *Pisum sativum* (Carro, 2007) donde también se observó una gran diversidad genética entre las cepas aisladas de plantas muestreadas en una misma zona.

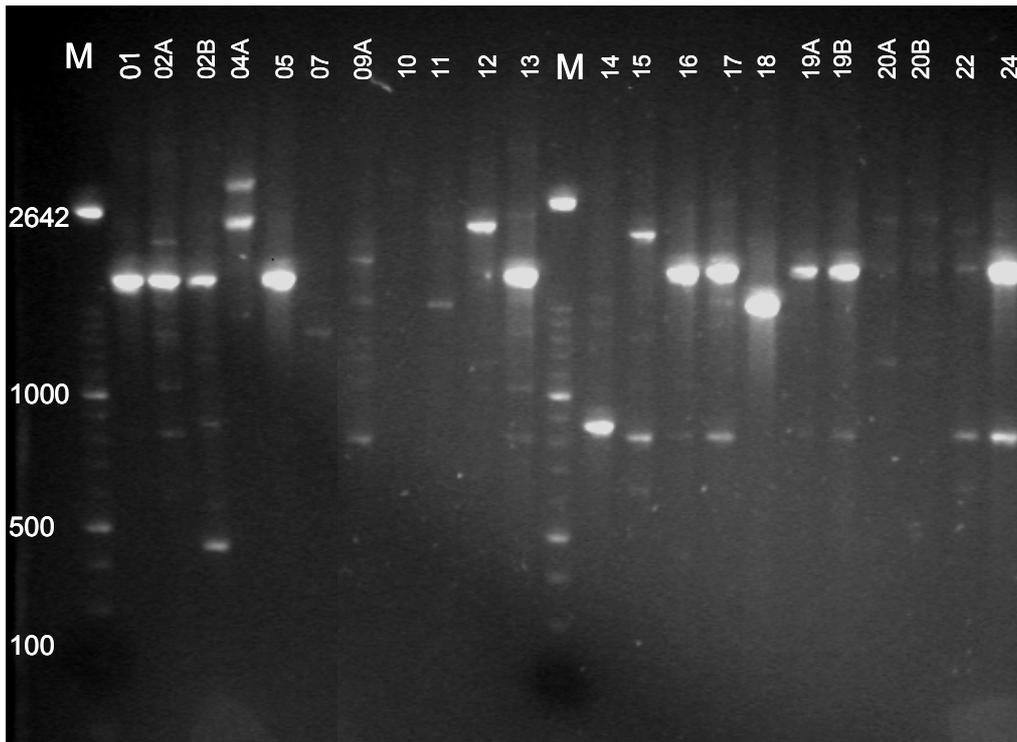


Fig. 2.8. Perfiles de ADN obtenidos mediante la técnica de Microsatélite de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. **M**: Marcador molecular XIV.

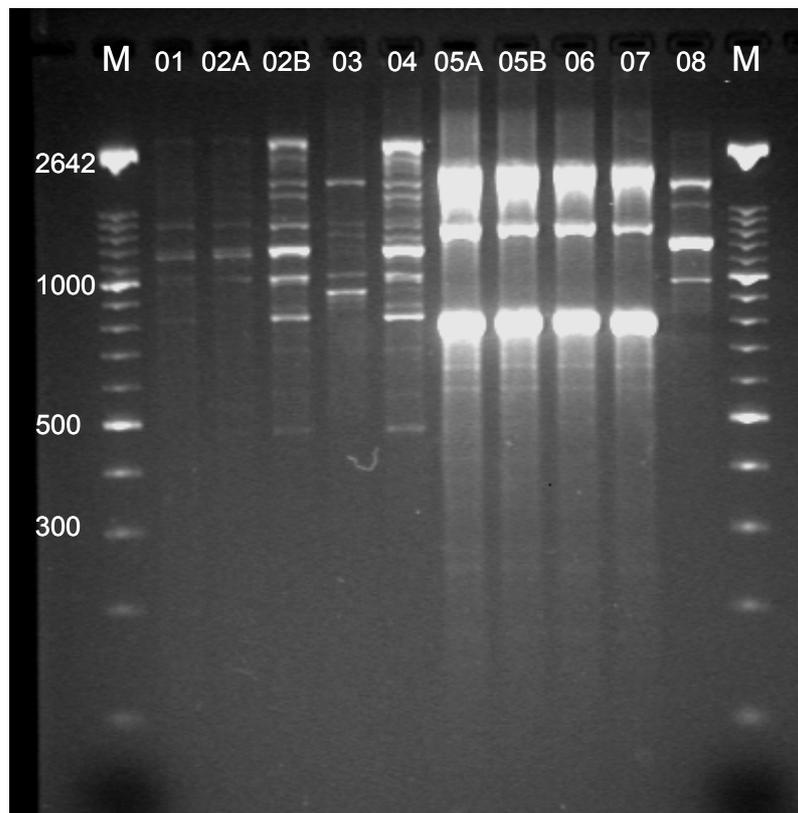


Fig. 2.9. Perfiles de ADN obtenidos mediante la técnica de Microsatélite de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Arachis hypogaea*. **M**: Marcador molecular XIV.

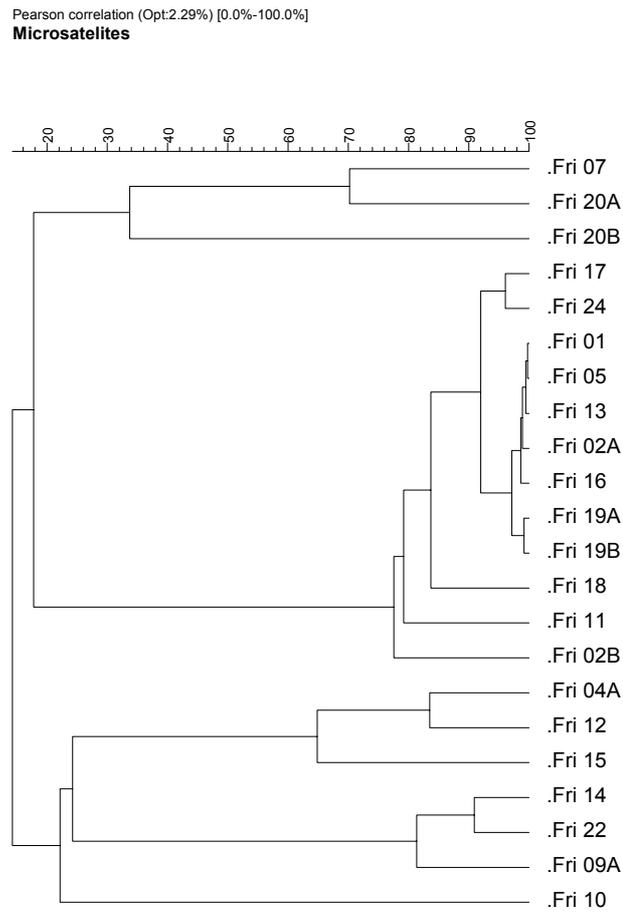


Fig. 2.10. Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de ADN mediante la técnica de PCR-Microsatélites de los aislados de alubia (*Phaseolus vulgaris*).

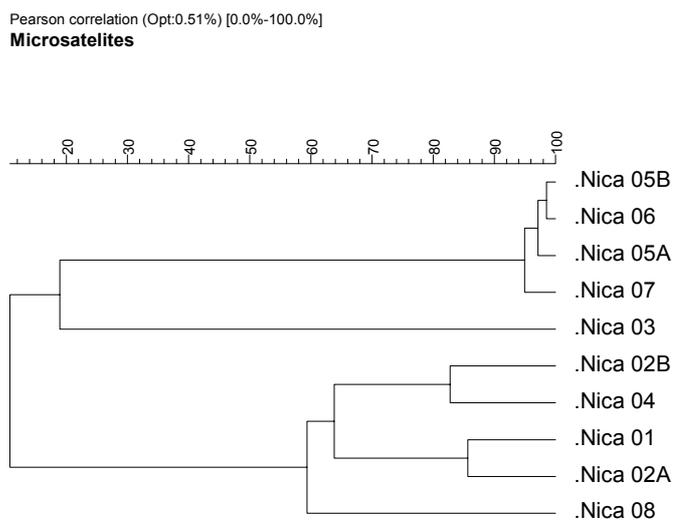


Fig. 2.11. Dendrograma obtenido a partir de los perfiles de ADN mediante la técnica de PCR-Microsatélites de los aislados de cacahuete (*Arachis hypogaea*).

2.3.2.2. Caracterización mediante BOX-PCR

Los aislados de alubia y cacahuete también fueron analizados mediante la técnica de BOX-PCR que consiste en amplificar regiones que aparecen repetidas a lo largo del genoma bacteriano (Versalovic *et. al.*, 1991). Esta técnica ya ha sido empleada en otros actinomicetos para diferenciar cepas de las misma especie dentro del género *Streptomyces* con excelentes resultados (Lanoot *et al.*, 2004).

La técnica de BOX-PCR realizada con todos los aislados, nos indica que existe una amplia diversidad intraespecífica entre las cepas obtenidas a partir de nódulos radiculares, apoyando los resultados obtenidos mediante la caracterización por microsátélites.

La mayoría de los aislados de nódulos de alubia presentaban diferentes patrones de bandas, sin embargo se puede apreciar a simple vista en la Fig. 2.12 la presencia de algunos patrones de bandas similares, como en el caso de las cepas Fri 02A y Fri 02B, así mismo las cepas Fri 20A y Fri 20B.

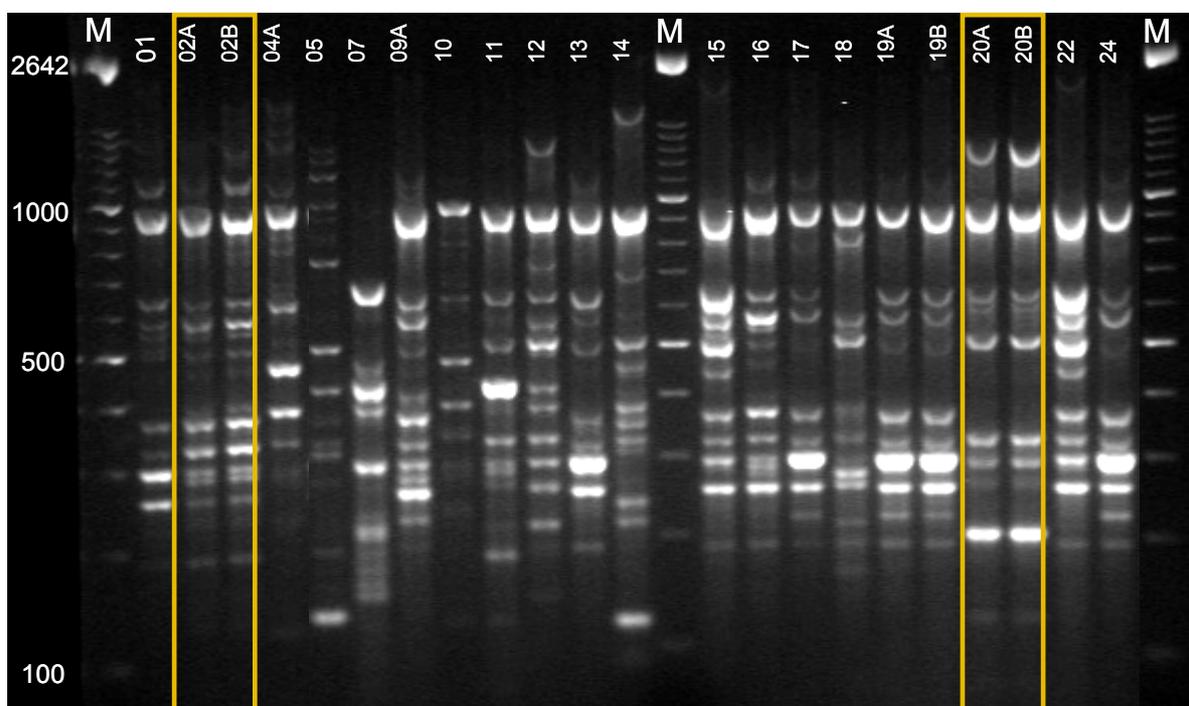


Fig. 2.12. Perfiles de ADN obtenidos mediante la técnica BOX-PCR de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris*. M: Marcador molecular XIV.

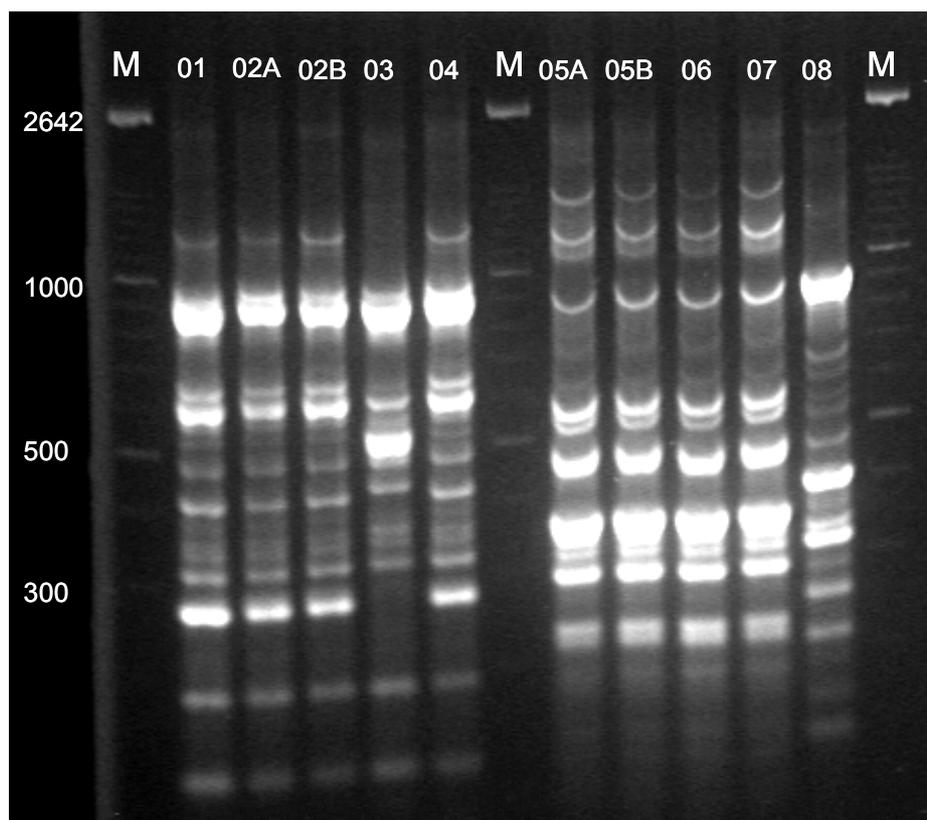


Fig. 2.13. Perfiles de ADN obtenidos mediante la técnica BOX-PCR de las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Arachis hypogaea*. **M**: Marcador molecular XIV.

Haciendo uso del programa Bionumerics (Applied Math, Kortrijk, Belgium), los resultados de los perfiles de BOX-PCR de los aislados de alubia y cacahuete fueron analizados usando el método de agrupamiento UPGMA, y el coeficiente de Pearson. A partir de los análisis efectuados a los aislados obtenidos de nódulos de alubia, se generó un dendrograma, en el cual se pueden apreciar claramente 5 tipos de perfiles moleculares teniendo como base una similitud del 60% (Fig. 2.14).

En el caso de los análisis realizados a los distintos aislados de cacahuete, el dendrograma resultante se dividió en 3 grupos de perfiles, basado en un 60% de similitud (Fig. 2.15)

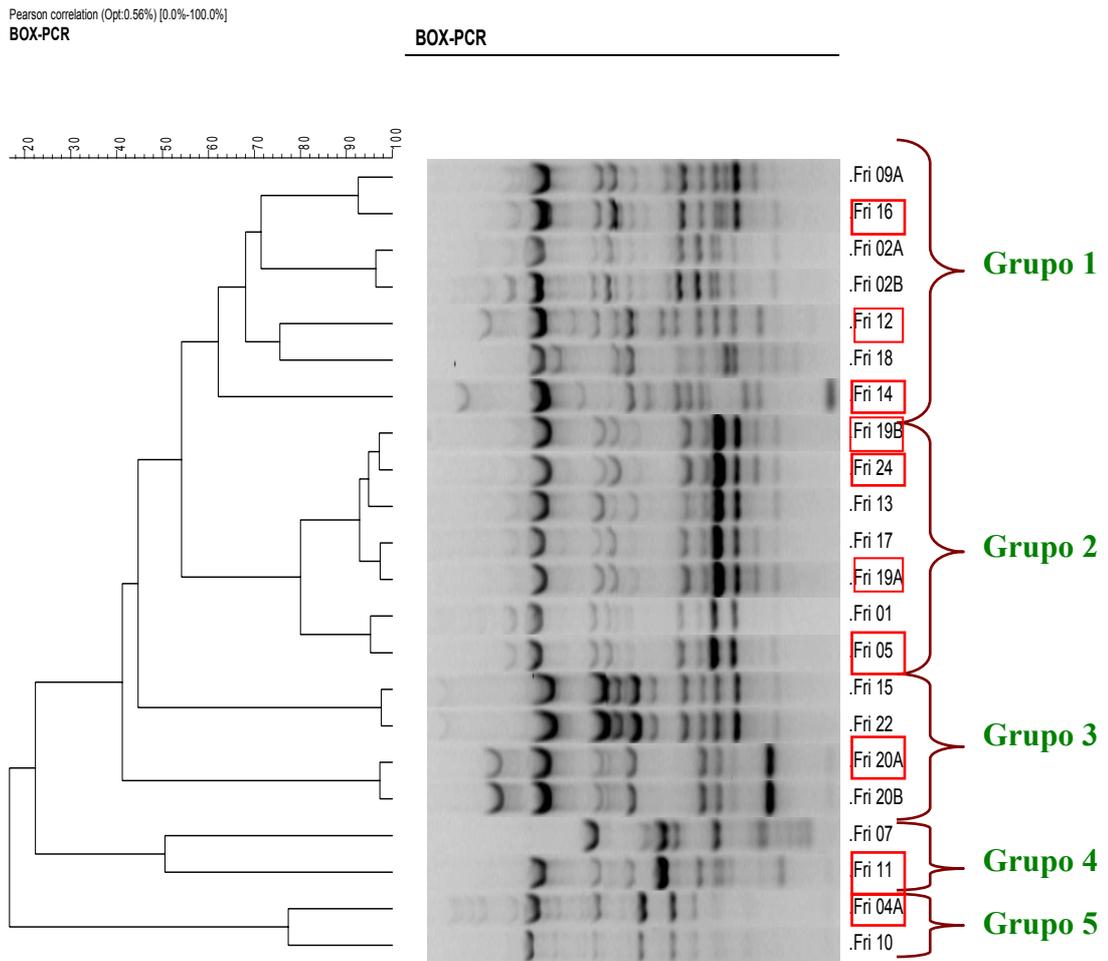


Fig. 2.14. Dendrograma obtenido empleando el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson de los aislados de nódulos de alubia (*Phaseolus vulgaris*).

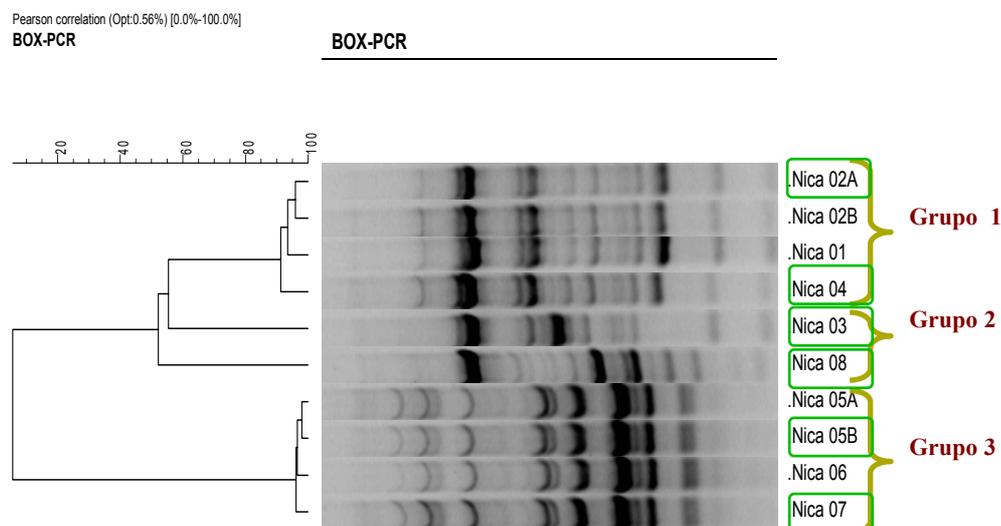


Fig. 2.15. Dendrograma obtenido empleando el método de agrupación UPGMA y el coeficiente de Pearson de los aislados de nódulos de cacahuete (*Arachis hypogaea*).

Los resultados obtenidos de los análisis del BOX-PCR indican la presencia de poblaciones heterogéneas de *Micromonospora* ya que la mayoría de los microorganismos aislados representan cepas diferentes. Estos resultados sugieren que los nódulos de plantas de alubia y cacahuete cultivadas en América Latina son una fuente potencial para el aislamiento de poblaciones del género *Micromonospora*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Fernández-Molinero (2005) y Carro (2007) en los respectivos estudios de aislamiento y caracterización de *Micromonospora* de leguminosas cultivadas en España.

2.3.2.3. Secuenciación del gen ribosómico 16S

Tras el análisis de la diversidad de los aislados de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* empleando las técnicas de microsatélites y BOX-PCR, se seleccionaron 16 cepas para la amplificación y secuenciación del gen ribosómico 16S, con el fin de identificar y confirmar que las cepas pertenecían al género *Micromonospora*.

De los aislados de nódulos de alubia se seleccionaron 10 cepas, Fri 04A, Fri 05, Fri 11, Fri 12, Fri 14, Fri 16, Fri 19A, Fri 19B, Fri 20A, Fri 24, de igual manera se seleccionaron 6 cepas aisladas de nódulos de cacahuete, Nica 02A, Nica 03, Nica 04, Nica 5B, Nica 07, Nica 08 (Fig. 2.14 y 2.15, cuadro rojos y verdes, respectivamente).

En la Tabla 2.19, se muestra tanto la longitud de la secuencia como el porcentaje de similitud obtenido entre las secuencias de los microorganismos seleccionados y las cepas más próximas depositadas en las bases de datos públicas (EMBL, Genbank y NCBI).

Tabla 2.19: Resultados obtenidos de la comparación de las secuencias del gen ribosómico 16S de los aislados con las secuencias depositadas en la bases de datos públicas.

Cepa	Identificación	Longitud de la Secuencia	Similitud %
Fri 04A	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1421	99.36
Fri 05	<i>M. endolithica</i>	1421	99.50
Fri 11	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1436	99.93
Fri 12	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1438	99.01
Fri 14	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1438	99.29
Fri 16	<i>M. endolithica</i>	1447	99.51
Fri 19A	<i>M. chersina</i>	1400	99.43
Fri 19B	<i>M. endolithica</i>	1412	99.50
Fri 20A	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1448	99.72
Fri 24	<i>M. endolithica</i>	1441	99.30
Nica 02A	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1420	99.57
Nica 03	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1407	99.64
Nica 04	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1453	99.58
Nica 05B	<i>M. endolithica</i>	1421	99.00
Nica 07	<i>M. endolithica</i>	1421	99.15
Nica 08	<i>M. chaiyaphumensis</i>	1442	98.80

Los resultados obtenidos confirman la idea previa de selección de los microorganismos en las placas de aislamiento que de acuerdo con su morfología pertenecían al género *Micromonospora*. Como se puede apreciar en la Tabla 2.19, los microorganismos secuenciados presentaron un índice de similitud entre 98.8% y

99.93% con las especies *Micromonospora chaiyaphumensis* y *Micromonospora endolithica*. En concreto, las cepas Fri 04A, Fri11, Fri 12, Fri 14, Fri 20A, Nica 02A, Nica 03, Nica 04, y Nica 08 se relacionaron con *Micromonospora chaiyaphumensis* que fue aislada de suelo y ha sido descrita recientemente (Jongrungruangchok *et al.*, 2008). Por otra parte, los aislados de alubia y cacahuete, Fri 05, Fri 16, Fri 24, Fri 19B, Nica 05B y Nica 07, presentaron una similitud del 99% con la especie *Micromonospora endolithica*, aislada de una muestra de piedra. Únicamente la cepa Fri 19A presentó una similitud a una especie distinta, *Micromonospora chersina*, con un valor de 99.43%.

Las secuencias obtenidas de cada una de las cepas seleccionadas sirvieron para llevar a cabo análisis filogenéticos en los que fueron incluidas todas las especies del género *Micromonospora* descritas hasta el momento de escritura de esta memoria. Para ello se utilizó el programa informático MEGA 3 (Kumar *et al.*, 2001), con el que se calcularon las distancias evolutivas de las secuencias y se construyeron los árboles filogenéticos. El programa permite el análisis de los datos empleando varios métodos y algoritmos, pudiendo así comparar los árboles obtenidos con cada método y determinar de esta manera si la topología presentada era estable. Estos resultados se muestran en la Figura 2.16.

En concreto, las cepas Fri 16, Fri 19A, Fri 19B, Fri 05 y Fri 24 aparecieron en una rama independiente con una estabilidad del 93% de acuerdo a la prueba de “bootstrap”. Estos microorganismos presentaron una similitud entre 99.5% y 99.9%. En este caso, la especie más próxima fue *Micromonospora endolithica* representada por la cepa *M. endolithica* DSM 44398^T.

Separadas del grupo anterior aparecen la cepa Fri 14 relacionada con la cepa *Micromonospora rosaria* DSM 803^T, con la cual comparte un 98.8% de similitud, mientras que la cepa Fri 04 forma una rama independiente de todas las demás cepas representadas en el árbol.

Por su parte, las cepas Nica 02A, Nica 04, Nica 03 aparecen formando un grupo muy compacto que a su vez se une a las cepas Fri 12 y Nica 08 para formar una rama con 5 cepas en total. Es interesante destacar que en este grupo 4 de los microorganismos fueron aislados de *Arachis hypogaea* mientras que la cepa Fri 12 fue aislada de

Phaseolus vulgaris. Sin embargo, este es el único caso en el que cepas de las distintas plantas estudiadas parecen estar estrechamente relacionadas desde el punto de vista filogenético. Además la ubicación de las 5 cepas en el árbol filogenético sugiere que este grupo posiblemente represente una nueva especie de *Micromonospora*.

Las cepas Fri 11 y Fri 20A aparecen estrechamente relacionadas con *Micromonospora chaiyapumensis* (MC5-1^T), especie descrita recientemente (Jongrungruangchok *et al.*, 2008), y cuya cepa representante fue aislada de una muestra de suelo en Tailandia. Teniendo en cuenta la similitud compartida entre estas 3 cepas, es probable que Fri 11 y Fri 20A pertenezcan a la especie *M. chaiyapumensis*, aunque estos resultados también deben ser confirmados mediante pruebas de hibridación de ADN.

Finalmente las cepas Nica 05B y Nica 07 forman un clado monofilético independiente cuya posición también sugiere que estos microorganismos representen especies todavía no descritas.

Los resultados del análisis filogenético nos indican que las 16 cepas secuenciadas posiblemente representan 5 especies nuevas del género *Micromonospora*, pues excepto en el caso de las cepas Fri 11 y Fri 20A, en el resto de las cepas no se observa una estrecha relación con las especies ya descritas. Sin embargo para poder confirmar estos resultados es necesario llevar a cabo estudios de hibridación de ADN, teniendo en cuenta que en algunos casos el porcentaje de similitud es del 99%.

Los resultados anteriormente expuestos confirman los trabajos presentados por Fernández-Molinero, (2005); Carro, (2007) y Trujillo *et al.* (2007) y confirman la presencia de poblaciones de *Micromonospora* en el interior de nódulos fijadores de nitrógeno en otras leguminosas. Nuestros resultados amplían estos hallazgos confirmando la presencia de *Micromonospora* en leguminosas cultivadas en zonas tropicales. En el futuro será necesario comprender el papel ecológico que realizan estas actinobacterias en relación con los nódulos y el posible beneficio aportado a las plantas que las hospedan.

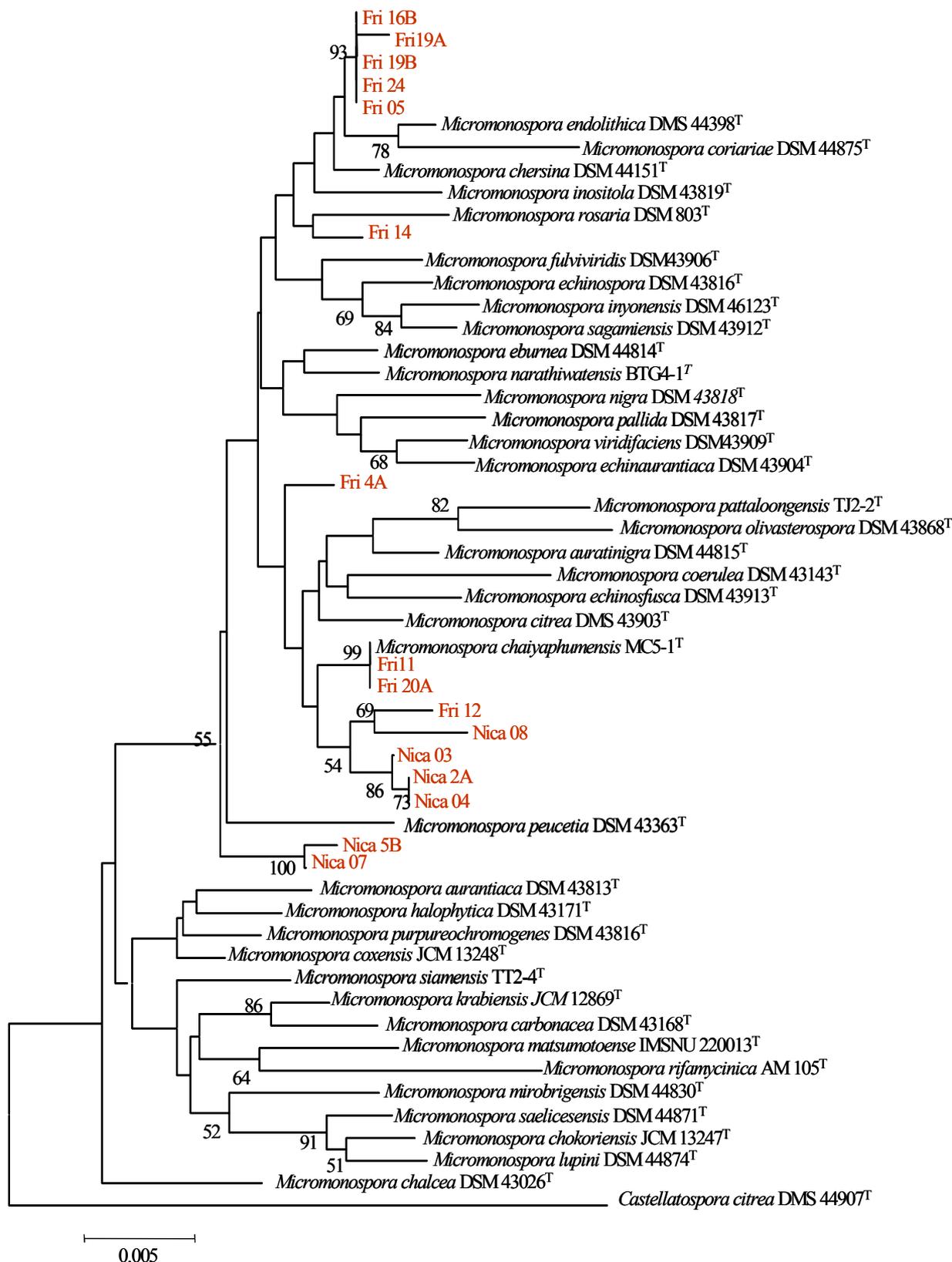


Fig. 2.16. Árbol filogenético construido con las secuencias del gen ARNr 16S mostrando la relación entre las cepas aisladas de alubia y cacahuete con las especies validadas de *Micromonospora*.

2.3.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

2.3.3.1. Morfología

Los microorganismos aislados de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*, se sembraron en placas de SA1, observando que las colonias presentaban un micelio de color anaranjado, marrón, gris y negro cambiando a tonos más oscuros debido a la producción de esporas. Después de tres o cuatro semanas de incubación se realizaron observaciones en el microscopio de contraste de fases (Zeiss®) con un objetivo 100X (Leica CTR Mic), se hicieron preparaciones en fresco de todos los microorganismos donde se observó la formación de un micelio ramificado y la presencia de un gran número de esporas sencillas (Fig. 2.17). Todas las cepas eran Gram positivas de acuerdo a los resultados de la tinción de Gram (Doetch, 1981).

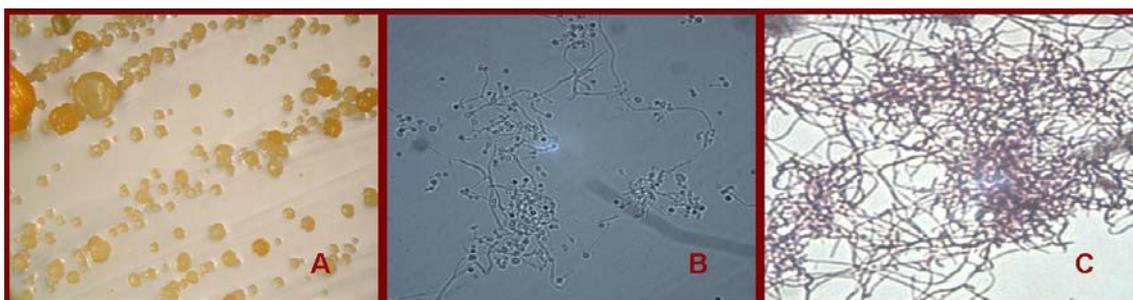


Fig. 2.17. Microfotografía del aislado Fri 09A. Colonias vista a la lupa (A). Frotis al fresco (B). Tinción Gram (C)

2.3.3.2. Crecimiento en diferentes medios de cultivos

El medio SA1 resultó ser óptimo para el buen crecimiento de todas las cepas aisladas, mientras que crecieron de forma moderada en los medios M65 y Bennett's, siendo en el medio de YMA y Avena donde el crecimiento fue más lento y menos abundante.

En las diferentes cepas aisladas tanto de alubia como de cacahuete la textura de las colonias variaba de unas a otras cepas, sin embargo todas ellas aparecían adheridas al medio de cultivo de forma moderada o fuerte (Fig. 2.18). Al inicio de su crecimiento las colonias presentaban un micelio vegetativo de color naranja, marrón, gris ó negro con

ciertas variaciones en la intensidad del color. Todas las cepas, a medida que pasaba el tiempo de incubación se volvían de color oscuro, algunas presentaban incluso una consistencia mucosa. También se pudo observar que el color variaba de acuerdo al tipo de medio donde crecían, siendo en el medio de Avena donde la mayor parte de las cepas presentaban un tono oscuro y un color más claro en los medios SA1, Bennett y M65 (Tabla 2.20 y 2.21). Después de 3 o 4 semanas de incubación la formación de esporas en el micelio vegetativo era abundante. Ninguna de las cepas de este estudio presentó formación de micelio aéreo o producción alguna de pigmentos.

El estudio de los microorganismos en los distintos medios de cultivo (Tablas 2.21 y 2.22), permitió observar una gran diversidad morfológica, en las poblaciones bacterianas recuperadas de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*.

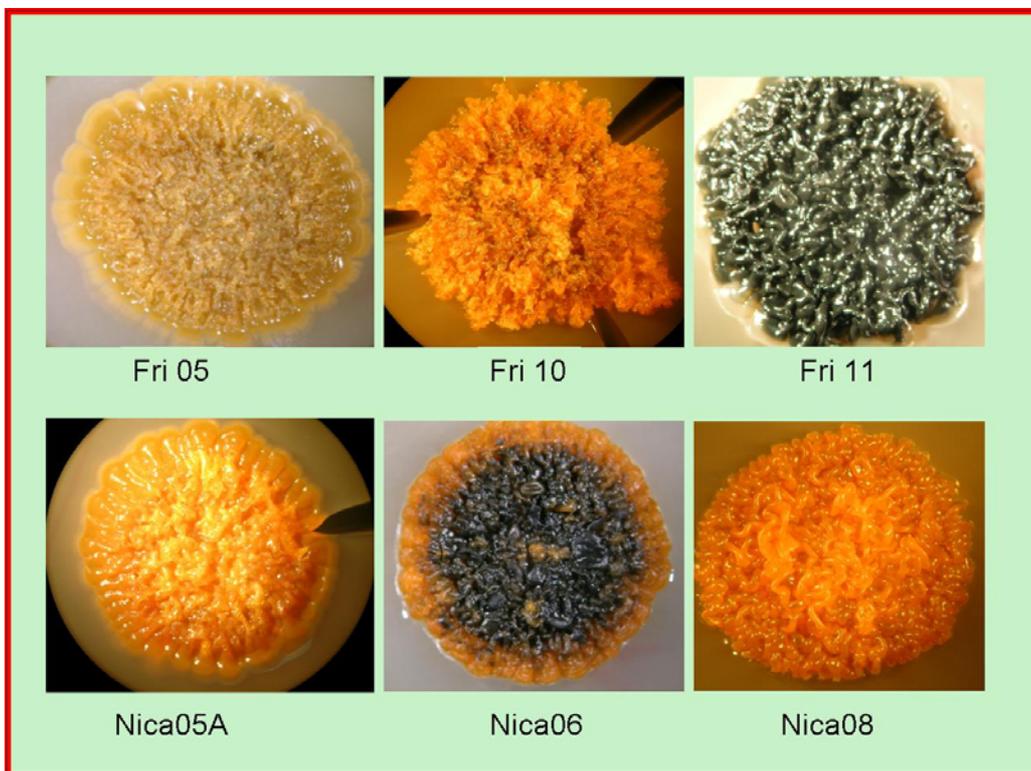
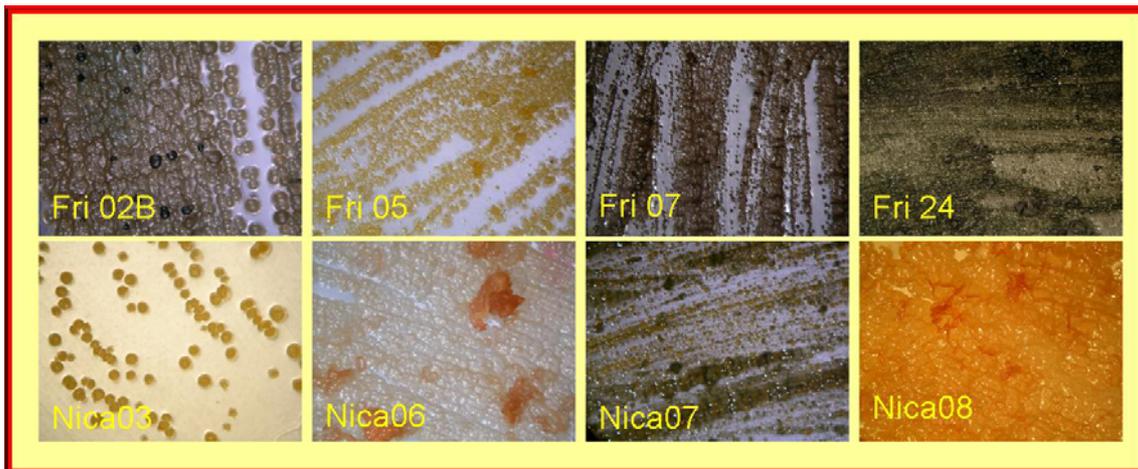


Fig. 2.18. Arriba: Cepas aisladas de alubia y cacahuete donde se observa el crecimiento de las colonias. Debajo: Morfología de las colonias observada en el microscopio estereoscópico.

Tabla 2.20: Características morfológicas de las cepas aisladas de alubia (*Phaseolus vulgaris*) en diferentes medios de cultivo.

Características morfológicas	Medios	Fri 01	Fri 02A	Fri 02B	Fri 04A	Fri 05	Fri 07	Fri 09A	Fri 10	Fri 11	Fri 12	Fri 13	Fri 14	Fri 15	Fri 16	Fri 17	Fri 18	Fri 19A	Fri 19B	Fri 20A	Fri 20B	Fri 22	Fri 24		
Crecimiento en:	SA1	+++	+++	+++	++	+++	+	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	
	YMA	++	++	++	++	++	-	++	+	++	+	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++	
	M65	+++	+++	+++	+++	++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	+++	+++	++
	Avena	+++	+++	+++	++	++	-	+++	+++	+	+	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Bennett's	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	
Color de micelio sustrato	SA1	ne	ne	ne	ma	ni	ma	ne	ma	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne									
	YMA	g	ne	g	g	nc	-	ne	g	ne	g	ne	ne	ne	g	g	g	g	g	g	gc	g	ne	mc	
	M65	ne	ne	ne	ni	ni	-	ne	ni	ne	ma	ne	ne	ne	ne	ma	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
	Avena	ne	ne	ne	g	nc	-	go	g	gc	gc	ne	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	
	Bennett's	ne	ne	ne	ni	ni	-	ne	ni	ne	ne	ne	ne	g	g	g	mc	ne	ne	mc	mc	mc	g	g	
Micelio aéreo/color	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett's	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Pigmento difusible /color	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Bennett's	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+ = escaso; ++ = moderado; +++ = abundante; - = inexistente

ne = negro; nc = naranja claro; ni = naranja intenso; g = gris; gc = gris claro; go = gris oscuro; ma = marrón; mc = marrón claro

Tabla 2.21: Características morfológicas de las cepas aisladas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) en diferentes medios de cultivo.

Características morfológicas	Medios	Nica 01	Nica 02A	Nica 02B	Nica 03	Nica 04	Nica 05A	Nica 05B	Nica 06	Nica 07	Nica 08
Crecimiento en:	SA1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+
	YMA	++	-	++	-	++	+	+	+	+	+
	M65	+++	+	+++	++	+++	+++	++	+++	++	+++
	Avena	+++	-	+++	-	+++	+	+	+	+	+
	Bennett's	+++	-	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	+
Color de micelio sustrato	SA1	ma	ma	ma	nc	ma	ni	m	r	ma	ma
	YMA	ma	-	ma	-	ma	nc	nc	nc	nc	nc
	M65	ma	ma	ma	nc	ma	ma	ma	ma	ma	ma
	Avena	ne	-	g	-	g	nc	nc	nc	nc	nc
	Bennett's	ma	-	ma	-	ma	r	ma	r	ma	ni
Micelio aéreo/color	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett's	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmento difusible / color	SA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YMA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Avena	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bennett's	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = escaso; ++ = moderado; +++ = abundante; - = inexistente

ne = negro; nc = naranja claro; ni = naranja intenso; g = gris; r = rojo; ma = marrón; mc = marrón claro

2.3.3.3. Características bioquímicas y fisiológicas de los microorganismos aislados

Tolerancia al pH

Las cepas de alubia y cacahuete crecidas en medio SA1 preparado a distintos pH, fueron incubadas durante tres semanas, realizando observaciones cada siete días, donde se observó que el 100% de las cepas crecían a pH 8.0 y 9.0. Dicha característica también se ha descrito en las especies *Micromonospora chokoriensis*, *Micromonospora coxensis*, y *Micromonospora chaiyaphumensis*. Sin embargo, un porcentaje mínimo (2.72%) de las cepas aisladas de alubia presentaron un crecimiento débil en los pH 4.5 y 5.5 (Tabla 2.22).

Tolerancia a la temperatura

La capacidad de los microorganismos de este estudio para crecer a distintas temperaturas se presenta en la Tabla 2.22. Las temperaturas óptimas para el crecimiento del 100% de las cepas aisladas fueron las de 28 y 37°C. Sin embargo, un porcentaje alto (92%) de las cepas presentaron un buen crecimiento a las temperaturas de 22 y 44°C, con excepción de las cepas Fri 15, Fri 19A, Fri 20A, Fri 20A, y Nica 03 que no crecieron a esas temperaturas. Solo el 2.27% de las cepas aisladas de alubias crecieron de forma débil a 12°C (Fri 12, Fri 14, Fri 16, Fri 18 y Fri 20B).

Tolerancia a la salinidad

Los microorganismos aislados de alubia y cacahuete fueron cultivados en diferentes condiciones de salinidad. Todas las cepas crecieron en una concentración de NaCl del 1% (p/v). Sin embargo, solamente el 39% del total de las cepas aisladas de alubia y el 60% de las cepas aisladas de cacahuete fueron capaces de crecer en un medio cuya concentración era del 3% (p/v) de NaCl (Tabla 2.22).

Los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de pH, temperatura y salinidad de las cepas aisladas presentan características similares a las descritas para el género *Micromonospora*. Estos resultados además son similares a los obtenidos por otros investigadores (Fernández-Molinero, 2005; Carro, 2007; Trujillo *et al.*, 2007).

Cuadro 2.22: Crecimiento de las diferentes cepas aisladas de alubia (*P. vulgaris*) y cacahuete (*A. hypogaea*) en distintas condiciones.

Cepas	pH				Temperatura						Concentración de NaCl				
	4,5	5,5	8	9	4°C	12°C	22°C	28°C	37°C	45°C	1%	3%	5%	7%	8%
Fri 01	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Fri 02A	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 02B	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 04A	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 05	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 07	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 09A	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	d	-	-	-
Fri 10	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 11	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 12	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 13	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 14	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 15	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 16	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 17	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 18	d	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 19A	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 19B	d	d	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Fri 20A	d	d	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
Fri 20B	d	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 22	d	d	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Fri 24	d	d	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Nica 01	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 02A	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Nica 02B	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 03	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Nica 04	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 05A	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 05B	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 06	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Nica 07	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Nica 08	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ = presencia de crecimiento; d = crecimiento débil; - = crecimiento inexistente

Utilización de Fuentes de Carbono

La capacidad de utilizar diferentes carbohidratos y aminoácidos por los microorganismos aislados como única fuente de carbono fue evaluada por un periodo de 3 semanas. Se pudo observar que un porcentaje alto (entre el 54 y el 100 %) de las cepas aisladas de alubia eran capaces de crecer en la mayoría de las fuentes de carbono a evaluar, siendo las únicas cepas capaces de utilizar en su totalidad las diferentes fuentes de carbono Fri 18. Se puede ver que solo un porcentaje mínimo de aislados de alubia crecía en un número limitado de fuentes de carbono como es el caso de Fri 01 que solo creció en 4 de las 28 fuentes de carbono a evaluadas (Tabla 2.23).

En el caso de los aislados de cacahuete las cepas son más heterogéneas en la utilización de diferentes compuestos como única fuente de carbono. De las cepas de cacahuete la única capaz de emplear el gluconato sódico como fuente de carbono fue la cepa Nica 07, así mismo solo dos cepas, Nica 06 y Nica 07, fueron capaces de emplear como fuente de carbono sorbitol y sorbosa (Tabla 2.23). Como se observa en los resultados, un porcentaje significativo (entre 60 y 90%) de las cepas aisladas de nódulos de cacahuete no crecieron en determinadas fuentes de carbono (almidón, gluconato sódico, ramnosa, sorbitol, sorbosa, xylitol, lisina y valina), destacando el caso de la cepa Nica 03 que únicamente fue capaz de crecer en presencia de glucosa, similar a la especie de *Micromonospora rifamycinica* que es únicamente capaz de crecer en glucosa (Huang *et al.*, 2008).

Según los resultados obtenidos podemos deducir que las cepas aisladas de alubia poseen la capacidad de utilizar el 92% de las distintas fuentes de carbono evaluadas, sin embargo, en el caso de los aislados de cacahuete las cepas fueron capaces de utilizar solo el 71% de las distintas fuentes de carbono.

Cuadro 2.23: Utilización de las fuentes de carbono por los diferentes aislados de Alubia (*Phaseolus vulgaris*) y cacahuete (*Arachis hypogaea*).

CEPAS	ALMIDÓN	ARABINOSA	CELOBIOSA	FRUCTOSA	GALACTOSA	GLUCONATO Na	GLUCOSA	MALTOSA	MANOSA	MELECITOSA	MELIBIOSA	RAFINOSA	RAMNOSA	SACAROSA	SORBITOL	SORBOSA	TREHALOSA	XILOSA	XYLITOL	ALANINA	ARGININA	HISTIDINA	LISINA	PROLINA	SALICINA	SERINA	TIROSINA	VALINA	
Fri 01	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-		
Fri 02A	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Fri 02B	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
Fri 04A	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
Fri 05	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	
Fri 07	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
Fri 09A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fri 10	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
Fri 11	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fri 12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Fri 13	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
Fri 14	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
Fri 15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Fri 16	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fri 17	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Fri 18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Fri 19A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Fri 19B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Fri 20A	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
Fri 20B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Fri 22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Fri 24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Nica 01	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Nica 02A	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nica 02B	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Nica 03	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nica 04	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Nica 05A	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
Nica 05B	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
Nica 06	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
Nica 07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
Nica 08	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	

+ = crecimiento; - = crecimiento inexistente

Hidrólisis de almidón

Algunos microorganismos pueden hidrolizar ciertos compuestos debido a que poseen la capacidad de producir las enzimas responsables de llevar a cabo dicho procesos. Los microorganismos capaces de hidrolizar almidón son de considerable utilidad en industrias donde debe digerirse el almidón, tales como papeleras, textiles etc., por lo que algunos microorganismos son fuentes comerciales de estas enzimas y por consiguiente adquiere gran interés la búsqueda de cepas con un alto potencial como productores de amilasas.

Para determinar la capacidad de las cepas aisladas de nódulos de alubia y cacahuete para hidrolizar almidón, dichas cepas fueron cultivadas en un medio rico en almidón, el cual fue incubado durante 14 días y se reveló con lugol para detectar el almidón hidrolizado y por consiguiente detectar las cepas con capacidad de producir la enzima amilasa (Fig. 2.19). Como se puede observar en los resultados, todas las cepas de alubia (100%) fueron capaces de hidrolizar el almidón, no siendo el caso en los aislados de cacahuete donde solo el 70% de las cepas fueron capaces de hidrolizar este polisacárido. Los resultados globales se muestran en la Tabla 2.24.

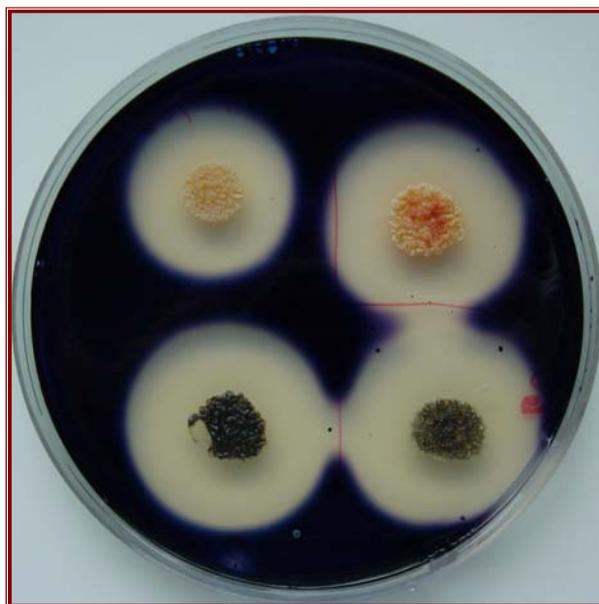


Fig. 2.19. Detección de cepas productoras de amilasas. La presencia alrededor de las cepas de un halo transparente es indicativa del almidón degradado.

Hidrólisis de esculina

De igual forma que algunos microorganismos son capaces de hidrolizar el almidón, otros poseen también la capacidad de hidrolizar la esculina hasta glucosa. Para evaluar la capacidad para hidrolizar esculina, los aislados se cultivaron en un medio que contenía esculina y se incubaron durante tres semanas. El cambio de color a negro indicaba un resultado positivo (Fig. 2.20). Tanto los aislados de alubia como de cacahuete fueron capaces de hidrolizar la esculina, no obstante según se aprecia en la tabla de resultados, las cepas Fri 07 y Nica 03 presentaron una hidrólisis débil (Tabla 2.24).

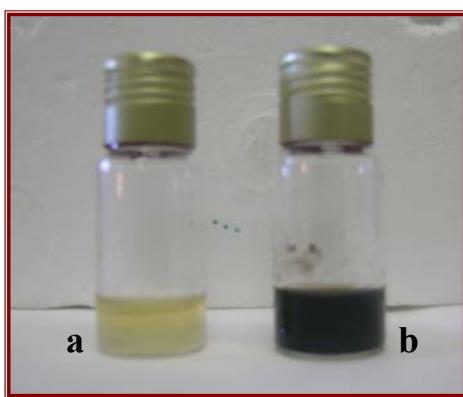
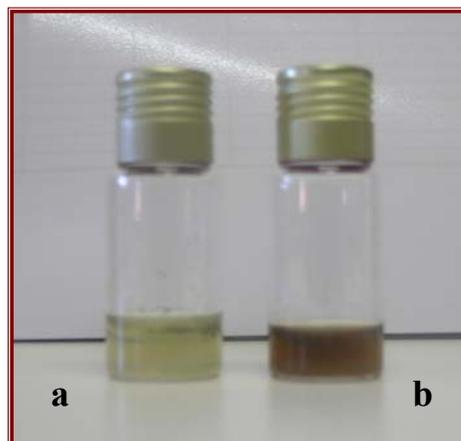


Fig. 2.20. Medio de cultivo control sin esculina(a); medio con esculina hidrolizada (b).

Degradación de arbutina

La capacidad de degradar glucósidos como la arbutina por los microorganismos aislados de alubia y cacahuete, fue también evaluado. Los resultados demuestran que después de 21 días de incubación en un medio con arbutina todas las cepas fueron capaces de degradarla, sin embargo algunas cepas presentaron una variación de color con menor intensidad (Fig. 2.21), por lo cual consideramos que estas cepas realizaban una degradación más débil (Tabla 2.24).

Fig. 2.21. Medio de cultivo control sin arbutina (a); medio con arbutina degradado (b).



Degradación de caseína

La producción de caseinasas por ciertos microorganismos permite que estos puedan degradar la caseína. En el caso de los aislados de alubia y cacahuete, se pudo observar que a los 21 días de incubación de los microorganismos en un medio rico en caseína, la mayoría de los aislados degradaban dicho compuesto (Fig. 2.22), exceptuando a las cepas Fri 07, Fri 17 y Fri 20A aisladas de alubia. De las cepas aisladas de nódulos de cacahuete solamente Nica 03 y Nica 08 no fueron capaces de degradar caseína (Tabla 2.24).



Fig. 2.22. Cepas productoras de caseinasas. La presencia de un halo transparente alrededor de la cepa es una característica propia de un resultado positivo.

Degradación de xilano

Se analizó la capacidad de degradar el xilano por microorganismos aislados a partir de nódulos de plantas, en medio SA1. Se pudo observar que gran parte de las cepas aisladas de las plantas de alubia y de cacahuete presentaron la capacidad de degradar el xilano, solamente cinco (21%) de las 23 cepas de alubia no fueron capaces de llevar a cabo dicha degradación. En el caso de los aislados de cacahuete, cuatro de diez cepas (40%), dieron negativo en la degradación de xilano (Tabla 2.24).

Resultados similares fueron presentados por Carro (2007) y Trujillo *et al.*, (2007), en cepas aisladas de nódulos de *Pisum sativum* y *Lupinus angustifolius*.

Degradación de gelatina

La degradación de gelatina a través de enzimas proteolíticas se lleva a cabo por ciertos microorganismos con la finalidad de transformar la gelatina en aminoácidos simples de fácil asimilación. En el caso de los aislados de alubia y de cacahuete, todas las cepas fueron capaces de degradar la gelatina. (Tabla 2.24 y Fig. 2.23), caso contrario a la especie *Micromonospora rifamycinica* que no degrada la gelatina (Huang *et al.*, 2008).



Fig. 2.23. Cepas productoras de enzimas proteolíticas. Halo transparente alrededor de la cepa es una característica propia de un resultado positivo.

Degradación de L-Tirosina

La asimilación de L-tirosina está determinada por la capacidad de los microorganismos para degradar este compuesto. Sin embargo no todas las cepas aisladas pueden llevarlo a cabo como se observa en los resultados obtenidos (Tabla 2.24). De las 22 cepas aisladas de alubia solamente 12 cepas (54%) fueron capaces de degradar la L- tirosina. En el caso de los aislados de cacahuete 6 cepas (27%) fueron capaces de hidrolizarla (Tabla 2.24). La capacidad o no de degradación de la L- tirosina también ha sido descrita en especies de *Micromonospora* por Trujillo *et al.* (2005) y (2007).

Degradación de urea

De acuerdo con nuestros resultados los aislados de nódulos de alubia y de cacahuete no son capaces de producir la enzima ureasa. Al inocular las distintas cepas en un caldo con urea y después de 15 días, al realizar la lectura de los resultados no se observó en ningún caso el viraje de color a púrpura indicativo de la liberación de amoníaco por la actividad de la ureasa (Tabla 2.24). Dichos resultados coinciden con resultados obtenidos con ciertas cepas aisladas de nódulos de *Lupinus* clasificados como miembros del género *Micromonospora* (Fernández-Molina, 2005).

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los reportados en algunas de las cepas aisladas de *Pisum sativum*, así como de las características descritas para la especie *Micromonospora mirobrigensis*, donde se reporta la capacidad de llevar a cabo la degradación de la urea (Carro, 2007; Trujillo *et al.*, 2005), por lo cual podemos decir que dentro de este género pueden encontrarse cepas que puedan tener o no la capacidad de producir ureasa.

Degradación de tween

La capacidad de degradar tween 20 y 80 por actividad de la lipasa fue evaluada en las diferentes cepas aisladas de alubia y cacahuete (Tabla 2.24). Observándose que solo un determinado número de cepas de alubia (31%) fue capaz de degradar tween 20 (Fri 04A, Fri 05, Fri 09A, Fri 10, Fri 11, Fri 14 y Fri 20B), en el caso de tween 80 un porcentaje bajo (22%) de las cepas fueron capaces de degradarlo (Fri 04A, Fri 09A, Fri 10, Fri 12 y Fri 14). No obstante según los resultados obtenidos se puede observar que en el caso de los aislados de cacahuete solo Nica 05A y Nica 05B fueron capaces de degradar tween 20 y únicamente Nica 05B fue capaz de degradar tween 80.

Producción de Catalasa

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. En el caso de la catalasa todos los microorganismos aislados de nódulos de alubia y cacahuete fueron capaces de producirla (Tabla 2.24). Una característica presente en la mayoría de las cepas investigadas y clasificadas dentro del género

Micromonospora es la capacidad de producir catalasa (Fernández-Molinero, 2005; Carro, 2007).

Producción de Oxidasa

La producción de oxidasa fue observada en el 86% de las cepas de alubia y solamente las cepas, Fri 07, Fri 12 y Fri 20A presentaron una respuesta negativa. En el caso de los aislados de cacahuete un 40% del total de cepas aisladas fueron las únicas que produjeron oxidasa, siendo en este caso las cepas Nica 01, Nica 02B, Nica 04 y Nica 07 (Tabla 2.24).

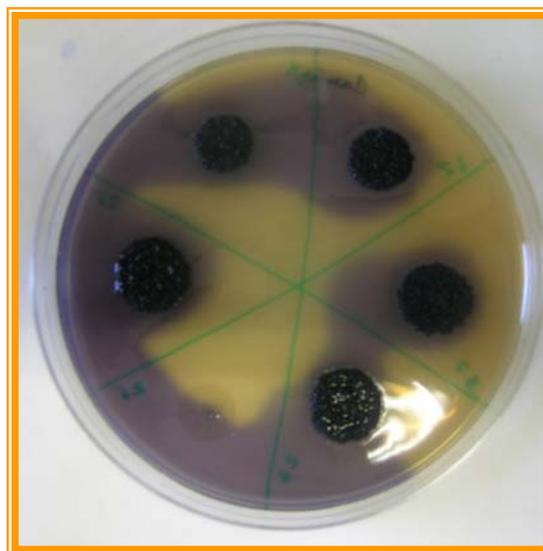


Fig. 2.24. Cepas productoras de oxidasa. El color púrpura alrededor de la cepa es una característica propia de un resultado positivo.

Cuadro 2.24: Capacidad de degradación, oxidación y presencia de catalasa en los diferentes aislados de Alubia (*P. vulgaris*) y cacahuete (*A. hypogaea*).

CEPAS	Degradación										Catalasa	Oxidasa
	Almidón	Urea	Esculina	Twin 20	Twin 80	Caseína	Xilano	L-Tirosina	Arbutina	Gelatina		
Fri 01	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Fri 02A	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+
Fri 02B	+	-	+	-	-	+	+	-	d	+	+	+
Fri 04A	+	-	+	d	d	+	+	+	d	+	+	+
Fri 05	+	-	+	d	-	+	+	-	+	+	+	+
Fri 07	+	-	d	-	-	-	-	-	d	+	+	-
Fri 09A	+	-	+	d	d	+	+	+	+	+	+	+
Fri 10	+	-	+	d	d	+	+	+	d	+	+	+
Fri 11	+	-	+	d	-	+	+	+	d	+	+	+
Fri 12	+	-	+	-	+	+	-	+	d	+	+	-
Fri 13	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+
Fri 14	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Fri 15	+	-	+	-	-	+	+	-	d	+	+	+
Fri 16	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Fri 17	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Fri 18	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Fri 19A	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Fri 19B	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Fri 20A	+	-	+	-	-	-	-	-	d	+	+	-
Fri 20B	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Fri 22	+	-	+	-	-	+	+	-	d	+	+	+
Fri 24	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nica 01	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+
Nica 02A	-	-	+	-	-	+	-	-	d	+	+	-
Nica 02B	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+
Nica 03	-	-	d	-	-	-	-	-	d	+	+	-
Nica 04	+	-	+	-	-	+	+	+	d	+	+	+
Nica 05A	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Nica 05B	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Nica 06	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
Nica 07	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Nica 08	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-

+ = crecimiento; d = crecimiento débil; - = crecimiento inexistente

2.4. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos en esta investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- El género *Micromonospora* está presente en nódulos fijadores de nitrógeno de *Phaseolus vulgaris* y de *Arachis hypogaea*, cultivadas en ambientes tropicales. Se aislaron un total de 32 cepas: 22 de nódulos de alubia y 10 de nódulos de soja.

2.- Los métodos moleculares de tipificación genética BOX-PCR y microsatélites, demostraron ser herramientas útiles para el estudio de la diversidad de poblaciones del género *Micromonospora*.

3.- La técnica de BOX-PCR permitió una mayor diferenciación de los microorganismos aislados demostrando un alta resolución a nivel de cepa.

4.- Los análisis filogenéticos del gen ARNr 16S de las cepas secuenciadas demostraron que las bacterias aisladas pertenecen al género *Micromonospora* y que además representan al menos 5 nuevas especies. Estos resultados deberán ser confirmados mediante experimentos de hibridación ADN-ADN y estudios de quimiotaxonomía.

5.- La existencia del género *Micromonospora* en los nódulos fijadores de nitrógeno en distintas leguminosas, como se demuestra en el presente estudio y aunado a resultados anteriores, nos sugiere que estos microorganismos podrían desempeñar alguna función de importancia ecológica.

CAPÍTULO 3

COINOCULACION DE *Micromonospora* y *Bradyrhizobium* EN *Lupinus albus*

3.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha habido un incremento en investigaciones enfocadas a bacterias que nodulan tejidos de especies leguminosas tropicales. No obstante muchos de los endosimbiontes de leguminosas de climas templados ó tropicales todavía permanecen desconocidos.

El género *Lupinus* agrupa a 200 especies de hierbas y pequeños arbustos, ampliamente distribuido en áreas del Mediterráneo y en el continente Americano, colonizando diferentes ambientes (Ainouche y Bayer, 1999).

Las especies de *Lupinus* que han formado parte de la agricultura tradicional son el lupino blanco (*Lupinus albus*), el lupino azul (*Lupinus angustifolius*), y el lupino amarillo (*Lupinus luteus*). Habitualmente los lupinos han formado parte de la alimentación de personas y animales, o bien se han empleado en la agricultura como abono verde, con la finalidad de conservar o recuperar la productividad de las tierras agrícolas (Fernández-Molinero, 2005).

A pesar del interés agronómico y ecológico de *Lupinus*, no existen muchos estudios sobre microorganismos simbioses. Las plantas del género *Lupinus* son noduladas tanto por rizobios de crecimiento lento como rápido, no obstante los rizobios de crecimiento lento son más frecuentemente aislados de estas leguminosas (Barrera *et al.*, 1997; Bottomley *et al.*, 1994; Kuykendall *et al.*, 1991; Miller and Pepper, 1988).

Los microorganismos endofitos incluyendo bacterias, actinomicetos y hongos también se hallan en muchas especies de plantas, especialmente en plantas crecidas en el campo. Se ha demostrado que los actinomicetos endofitos mejoran y promueven el crecimiento de las plantas hospederas bien sea reduciendo la sintomatología de una enfermedad causada por un patógeno y/o por factores de estrés ambiental. (Hasegawa *et al.*, 2006).

La relación simbiótica existente entre cepas de *Bradyrhizobium* y leguminosas fijadoras de nitrógeno ha sido ampliamente estudiada. No obstante, existen algunas limitaciones al uso de *Bradyrhizobium* como inoculante por la competencia existente entre las cepas de los inóculos con cepas nativas del suelo (Streeter 1994; Sadowsky y Graham, 1963). Sin embargo, se ha observado en estudios recientes de coinoculación en plantas de leguminosas con *Bradyrhizobium* sp. y actinomicetos, que se incrementaba significativamente la nodulación y el contenido de nitrógeno en las plantas estudiadas (Gregor *et al.*, 2003).

Las actinobacterias son un grupo importante de microorganismos debido al papel ecológico que desempeñan en el ambiente natural, pero también debido a su importancia como productores de un gran número de moléculas bioactivas con aplicación médica, agrícola e industrial. El aislamiento de microorganismos de los tejidos de plantas sanas sugiere que los hospedadores obtienen algún tipo de beneficio proveniente de los endofitos, debido a la producción de bactericidas, fungicidas o por la producción de moléculas promotoras del crecimiento. En recientes investigaciones se ha demostrado que cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus angustifolius*, pueden producir, a partir de caldos de fermentación, nuevas moléculas con actividad biológica como la lupinadinas A y B (Igarashi *et al.*, 2007).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Microorganismos usados en este estudio

Los microorganismos empleados en este estudio están recogidos en la siguiente Tabla:

Tabla 3.2. Cepas de *Micromonospora* empleadas en este estudio.

Código	Código
LUPAC 02	LUPAC 07
LUPAC 03A	LUPAC 08
LUPAC 03B	LUPAC 09
LUPAC 04	LUPAC 12
LUPAC 05A	LUPAC 13
LUPAC 05B	LUPAC 14
LUPAC 06	LUPAC 15

Las 14 cepas del presente estudio se aislaron a partir de nódulos de *Lupinus angustifolius* recogidos al suroeste de la provincia de Salamanca (España). Las cepas fueron caracterizadas e identificadas dentro del género *Micromonospora* (Martínez-Molinero, 2005).

3.2.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno

Para determinar la capacidad de las 14 cepas aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius* de crecer en ausencia de nitrógeno, los aislados fueron cultivados en un medio libre de este elemento.

El medio libre de nitrógeno se preparó en tubos que contenían agar noble (Disco) al 1% (p/v) y Yeast Carbon Base (Difco) a una concentración final 1.1% (p/v). La preparación de la solución de Yeast Carbon Base se preparó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El medio de cultivo que sirvió como control positivo se preparó igual que el anterior, excepto que se añadieron 2 g/l de (NH₄)SO₄ como fuente de nitrógeno.

Las 14 cepas se sembraron en medio SA1 y se cultivaron durante 7 días. Posteriormente se prepararon suspensiones (1×10^6 u.f.c./ml) de cada cultivo en NaCl al 0.85% (p/v) y de esta suspensión se inocularon 10 μ l en cada medio de cultivo. La inoculación se hizo por picadura en el fondo del tubo y las muestras se incubaron a 28°C durante 3 semanas. Se hicieron lecturas a los 7, 14 y 21 días.

3.2.3. Amplificación y secuenciación del gen *nifH*

Amplificación de ADN

La amplificación del gen *nifH* se realizó en dos etapas empleando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas y según la metodología previamente descrita por Valdés *et al.* (2005). En todos los casos se utilizó la cepa *Frankia alni* ACN 14a como control positivo en cada PCR. Los oligonucleótidos, IGK, NDR-1 (Valdés *et al.*, 2005), POLF y POLR (Poly *et al.*, 2001) (Isogen), cuyas secuencias son las siguientes fueron empleados para la amplificación parcial del gen *nifH*:

IGK (f) 5'-TACGG(CT)AA(AG)GC(GCT)GG(CT)ATCGG-3'
NDR-1(r) 5'-TTGGAGCCGGC(AG)TA(AGCT)GC(AG)CA-3'
POLF (f) 5'-TGCGA(CT)CC(GC)A(AG)(AG)GC(GCT)GG(CT)ATCGG-3'
POLR (r) 5'-AT(GC)GCCATC AT(CT)TC(AG)CCGGA-3'

La preparación de la mezcla de reacción de PCR para la amplificación del primer segmento de 1.2 Kb, se llevó a cabo haciendo uso del kit "REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit" de SIGMA como se describe en el Anexo III, Tabla 3.1. Para esta primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos IGK y NDR (Valdés *et al.*, 2005) diseñados para amplificar la región que contiene el gen *nifH* flanqueado por el espacio intergénico y el extremo terminal 5' del gen *nifD*.

Condiciones de PCR del segmento 1.2 Kb

La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones descritas en el Anexo IV, Fig. 3.1.

Electroforesis del ADN

Los productos amplificados por PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v), utilizando como tampón TAE 1X (Tris-Acetato EDTA) (Millipore) en una cubeta de 15 x 20 cm a 70V durante 90 minutos. Como fuente eléctrica se utilizó Power PAC 300 (Bio Rad). El Marcador VI fue utilizado como referencia para determinar el tamaño de los productos de PCR. Los productos de PCR se observaron en el transluminador y la banda correspondiente al producto esperado se cortó para su posterior purificación.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados usando la metodología descrita en el capítulo 2 (apartado 2.2.2.5). El ADN purificado se cuantificó (apartado 2.2.2.5) y sirvió como molde para amplificar el segundo fragmento de 454 bp correspondiente al gen *nifH*.

La preparación de la mezcla de reacción de PCR para la amplificación del segundo segmento de 454 pb correspondiente al gen *nifH*, se llevó a cabo haciendo uso del kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA como se describe en el Anexo III, Tabla 3.2. En este caso, los oligonucleótidos POLF y POLR sirvieron para amplificar el segundo fragmento.

Condiciones de PCR del segmento 454 pb

Las condiciones de ampliación están descritas en el Anexo IV, Fig. 3.2, mientras que las condiciones de electroforesis y la purificación de los productos de PCR se llevaron a cabo como ya se ha explicado previamente.

Secuenciación de los productos de PCR purificados

Para la secuenciación del gen *nifH* se utilizó el oligonucleótido:

POLF: 5'-TGCGA(CT)CC(GC)A(AG)(AG)GC(GCT)GG(CT)ATCGG-3'

Se preparó una mezcla con 100 ng de ADN y 3 picomoles del oligonucleótido para cada reacción de PCR. La secuenciación automática del fragmento se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca, en un secuenciador capilar ABI PRISM (Applied Biosystems), empleando “Big Dye Terminador v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems).

Análisis de los fragmentos secuenciados

Las secuencias obtenidas se analizaron a través del programa BLASTn, que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquellas secuencias que presentan una mayor similitud (Zhang *et al.*, 2000).

3.2.4. Ensayo de Antagonismo entre *Micromonospora* y *Bradyrhizobium*

Para determinar si las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus angustifolius*, causaban efectos antagónicos en el crecimiento de *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65, los microorganismos se sembraron siguiendo la metodología de Gregor *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

La cepa de *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 fue crecida en medio YMA durante 5 días a 28°C. Las cepas de *Micromonospora* fueron crecidas en medio SA1 durante una semana a 28°C. De cada cepa cultivada se realizaron suspensiones bacterianas de aproximadamente 1×10^8 u.f.c./ml.

En placas con medio de YMA y en condiciones asépticas con un hisopo estéril se extendió una suspensión en forma de tapiz de *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65, y las placas se dejaron secar. Posteriormente se sembró mediante hisopo la suspensión que contenía a la cepa *Micromonospora* LUPAC 08 en forma de cruz. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28°C.

Se observó el crecimiento de ambos microorganismos y los posibles efectos de antagonismo entre ellos. La presencia de un buen crecimiento de ambos tipos de microorganismos se consideró un resultado positivo.

3.2.5. Efecto de la coinoculación con *Micromonospora* y *Bradyrhizobium* en la nodulación de *Lupinus albus*

La metodología empleada para evaluar el efecto de la coinoculación en plantas de *Lupinus albus* crecidas en cámara climatizada se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos descritos por Trujillo *et al.* (2005).

Las semillas de *Lupinus albus* se esterilizaron en superficie con hipoclorito sódico al 35 % durante 12 minutos, pasados los cuales se realizaron 6 lavados con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas fueron colocadas en condiciones asépticas en placas de Petri estériles que contenían papel de filtro humedecido con agua estéril, para que se llevara a cabo la germinación.

Las semillas germinadas se dispusieron en macetas que contenían vermiculita estéril como soporte del cultivo. Para la esterilización de la vermiculita se la introdujo en autoclave durante una hora a 120°C y una atmósfera de presión, repitiendo la misma operación a las 24 y 48 horas.

Preparación de los inóculos

Bradyrhizobium canariense ISLU 65 fue crecida en medio YMA durante 5 días a 28°C. La cepa de *Micromonospora*, LUPAC 08, fue cultivada en medio SA1 e incubada a 28°C durante una semana. De cada cepa cultivada se realizaron suspensiones bacterianas de 1×10^8 u.f.c/ml en NaCl al 0.85% (p/v).

Cada plántula fue inoculada con 1 ml de suspensión bacteriana de acuerdo a los siguientes tratamientos:

T1: Plántulas sin inocular: control negativo

T2: Inóculo con *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65.

T3: Inóculo con *Micromonospora* LUPAC 08.

T4: Inóculo con *B. canariense* ISLU 65 + *Micromonospora* LUPAC 08.

Se inocularon 5 plantas por cada tratamiento para un total de 20 plantas.

Las plantas se mantuvieron en cámara iluminada con lámparas tipo fluorescentes Gro-Lux F36W/Gro (SYLVANIA) programada para un fotoperiodo de 16 horas durante 6 semanas, con una humedad relativa del 60% y a una temperatura de 25°C durante el día y 20°C durante la noche.

Las plantas se regaron de forma alternada con agua destilada estéril ó una solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud and Puppo, 1975) Anexo II, Tabla 3.3.

Para evaluar el efecto de los tratamientos se recogieron las siguientes variables:

- peso seco y húmedo de la biomasa aérea y radicular
- número de nódulos por planta

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente usando el programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc., 1998). Las variables fueron analizadas mediante las pruebas de ANOVA (varianza de las media) y Tukey.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno

El nitrógeno es un componente de primer orden de las proteínas y los ácidos nucleicos, y constituye casi el 10% del peso seco de la célula bacteriana típica. El nitrógeno puede suministrarse en diversas formas, y los microorganismos varían en su capacidad para asimilarlo, la mayoría de los organismos no puede utilizar nitrógeno en forma molecular, es decir en forma de gas (N_2). Para que las plantas puedan sintetizar proteína tienen que obtener el nitrógeno de compuestos nitrogenados aprovechables para las plantas. La forma más comúnmente utilizada es la de iones de nitrato, NO_3^- . Sin embargo, otras sustancias tales como el amoníaco NH_3 y la urea $(NH_2)_2CO$, resultan ser útiles en sistemas naturales de producción.

Existe un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados que incluyen cianobacterias y bacterias capaces de llevar a cabo el proceso de fijación de N_2 . Las actinobacterias del género *Frankia* poseen la capacidad de infectar las raíces de un amplio rango de angiospermas desarrollando nódulos radiculares y estableciendo relaciones simbióticas que contribuyen en la fijación de nitrógeno (Silvester *et al.*, 1990; Nalin *et al.*, 2000; Todar, 2004). Es conocida también la capacidad de *Streptomyces thermoautotrophicus*, de fijar nitrógeno empleando un sistema de nitrogenasa muy especial (Rubio *et al.*, 2005; Ribbe *et al.*, 1997).

Con la finalidad de determinar si las cepas empleadas en este estudio eran capaces de crecer en medio libre de nitrógeno y fijar el nitrógeno atmosférico, se inocularon en un medio que no contenía este elemento.

Los cultivos fueron incubados durante tres semanas, observando que la mayoría de las cepas inoculadas en medio libre de nitrógeno presentaban un buen crecimiento en comparación al medio control con nitrógeno (Fig. 3.1), por lo cual podemos deducir, que las 14 cepas empleadas en este estudio eran capaces de crecer en ausencia de este elemento y fijar el nitrógeno atmosférico.

La capacidad de las 14 cepas de *Micromonospora* para crecer en medios carentes de nitrógeno al igual que los aislados de *Casuarina equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005), apoyan la idea de que otros actinomicetos además de *Frankia* y *Streptomyces thermoautotrophicus* poseen la capacidad de fijar el nitrógeno de la atmósfera.

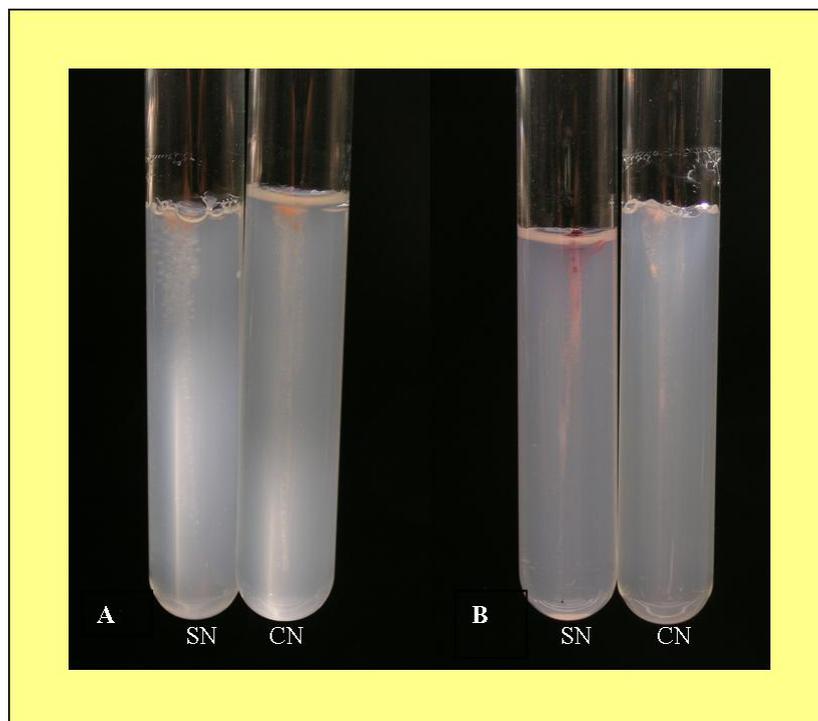


Fig. 3.1: (A) *Micromonospora* LUPAC 08 en medio libre de nitrógeno (SN) y en medio con nitrógeno (CN); (B) LUPAC 03B en medio libre de nitrógeno (SN) y en medio con nitrógeno (CN).

3.3.3. Amplificación y secuenciación de Genes *nifH*

La fijación biológica del nitrógeno atmosférico, consistente en la reducción de N_2 a NH_4^+ por la enzima nitrogenasa es, después de la fotosíntesis, la ruta metabólica más importante para el mantenimiento de la vida en la Biosfera. Curiosamente, este proceso crucial sólo puede ser llevado a cabo por unos pocos grupos de seres vivos, todos ellos procariontes (Sprent y Sprent, 1990). Los microorganismos fijadores de nitrógeno no constituyen un grupo taxonómico homogéneo, la única característica que comparten es la presencia de la enzima nitrogenasa (Zehr *et al.*, 2003; Cole *et al.*, 1979).

Kirsthein *et al.* (1991) argumentan que posiblemente el número de fijadores de nitrógeno y su impacto en la productividad primaria esta infravalorado. En el estudio de comunidades diazotróficas sería un error estimar la población mediante la fijación de nitrógeno ya que puede conllevar a resultados sesgados, puesto que la fijación puede depender de si la nitrogenasa esta activa en el momento de muestreo.

Basados en la capacidad presentada por las cepas de *Micromonospora* aisladas de *Lupinus angustifolius* de crecer en medio libre de nitrógeno, nos planteamos la interrogante de si estos microorganismos poseen en su genoma el operón *nif*, responsable de llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno atmosférico.

Así, partiendo del ADN extraído a cepas seleccionadas de *Micromonospora* (LUPAC: 02, 06, 07 y 08) llevamos a cabo la amplificación del ADN, empleando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas y previamente empleados en la amplificación del gen *nifH* en cepas aisladas de *Casuarina equisetifolia* (Valdés *et al.*, 2005).

Los fragmentos amplificados en la primera PCR empleando los cebadores IGK y NDR-1, se muestra en la Figura 3.2. La presencia de fragmentos del tamaño deseado fueron localizados en dos cepas, concretamente en la cepa *Micromonospora* LUPAC 08 y en la cepa control *Frankia alni* ACN14a. Las bandas fueron cortadas y purificadas de acuerdo a lo ya descrito anteriormente (sección 3.2.3) y utilizadas como molde para la segunda PCR con los oligonucleótidos universales POLF y POLR como se describe en el apartado 3.2.3.

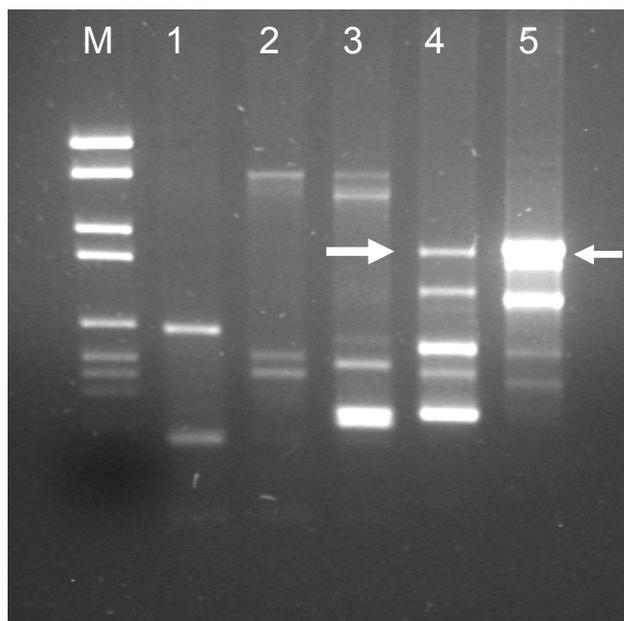


Fig. 3.2. Primera PCR amplificando un fragmento de 1.2 kb del gen *nifH* (indicado por la flecha), usando los oligonucleótido IGK- NDR-1. Marcador VI (M), cepas: LUPAC 02 (1), LUPAC 06 (2), LUPAC 07 (3), LUPAC 08 (4), *Frankia alni* ACN 14a (5).

En la segunda PCR, se obtuvo una única banda de aproximadamente 454 bp tanto en la cepa *Micromonospora* LUPAC 08 y en la cepa control, *Frankia alni* ACN 14a (Figura 3.3).

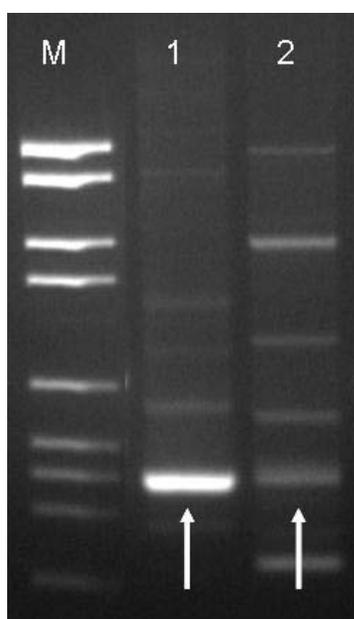


Fig. 3.3. Segunda PCR amplificando un fragmento de 454 bp gen *nifH* (indicado por la flecha), usando los oligonucleótidos POLF y POLR. 1. Marcador VI (M), cepas: (1) *Frankia alni* ACN 14a, (2), *Micromonospora* LUPAC 08.

El fragmento de aproximadamente 454 bp fue secuenciado y comparado con secuencias depositadas en las bases de datos públicas mostrando una alta similitud con secuencias del gen *nifH* de *Frankia*, específicamente, nuestra cepa mostró una similitud de un 99% con *Frankia alni* ACN 14a.

Con la finalidad de determinar la posición filogenética de la secuencia parcial del gen *nifH* obtenida de la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08, la secuencia fue alineada con otras secuencias obtenidas de la base de datos GenBank y posteriormente se realizaron los análisis filogenéticos tal y como se describió en el apartado 2.2.2.5. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3.4.

En el árbol filogenético (Fig. 3.4) se observa que la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08 esta estrechamente relacionada con las cepas *Frankia alni* ACN 14a y *Frankia alni* ArI3 formando un clado con rangos de similitud entre el 97% y el 99%. Estos resultados sugieren una transferencia horizontal entre ambos microorganismos.

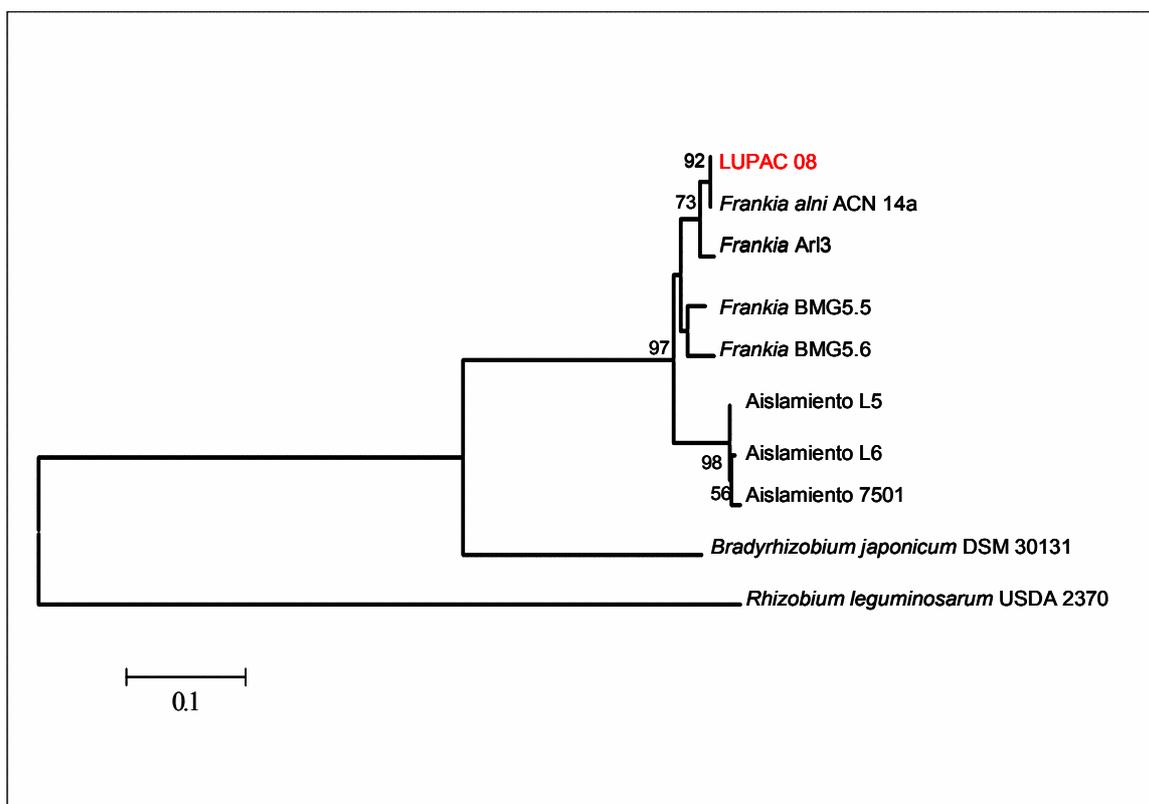


Fig. 3.4. Árbol filogenético basado en el método Neighbor-joining y derivado de secuencias parciales de nucleótidos del gen *nifH* de la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08 y secuencias de nucleótidos de genes de *nifH* de otras bacterias fijadoras de nitrógeno.

Finalmente, la secuencia parcial obtenida fue traducida a una secuencia de aminoácidos que indicaba que el producto final correspondería al componente férrico II de la nitrogenasa.

La presencia en el genoma bacteriano de los genes *nif* es esencial en algunos ecosistemas para el mantenimiento de la fertilidad del suelo mediante la fijación de nitrógeno atmosférico (Elbeltagy *et. al.*, 2008). La localización del gen *nifH* en *Micromonospora* LUPAC 08 relacionada filogenéticamente con *Frankia alni*, amplía los resultados obtenidos por Valdés *et al.* (2005) sin embargo, es importante tener en cuenta que en el trabajo realizado por estos autores los microorganismos fueron aislados de nódulos de *Casuarina equisetifolia* y no de una leguminosa como es nuestro caso.

3.3.4. Ensayo de Antagonismo entre *Micromonospora* y *Bradyrhizobium*

El papel ecológico de la producción de antibióticos por los actinomicetos del suelo todavía no está claramente definido. Sin embargo es posible que este proceso metabólico forme parte de mecanismos de defensa para competir en nichos donde la presencia de nutrientes es escasa y la competencia con otras poblaciones bacterianas es alta (Huddleston *et al.*, 1997).

Con la finalidad de determinar si las cepas aisladas de *Lupinus angustifolius* tenían un efecto antagónico con *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 y viceversa, se llevó a cabo la inoculación y el crecimiento conjunto en la misma placa con medio YMA de *B. canariense* ISLU 65 y las distintas cepas de *Micromonospora* de este estudio.

Las placas inoculadas fueron incubadas durante 7 días, pasado ese tiempo se pudo observar que en todos los casos se apreciaba un crecimiento óptimo de *B. canariense* ISLU 65 y de las diferentes cepas de *Micromonospora* (Fig. 3.5), por lo que podemos concluir que las cepas de *Micromonospora* del presente estudio no inhiben el crecimiento a *B. canariense* ISLU65 y viceversa. De igual manera se ha demostrado que ciertos actinomicetos distintos de *Frankia* pueden crecer simultáneamente con otros microorganismos fijadores de nitrógeno aislados de soja sin tener efectos antagónicos (Gregor *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos indican que el crecimiento simultáneo de *B. canariense* ISLU 65 y las distintas cepas de *Micromonospora* seleccionadas es posible dentro de un mismo nicho, en este caso en las raíces de *Lupinus*, por lo cual suponemos que al ser coinoculadas en la planta la coexistencia de ambos microorganismos puede tener incluso un efecto positivo.



Fig. 3.5. Crecimiento en medio YMA de la cepa *B. canariense* ISLU 65 (crecimiento en tapiz) y la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08 (siembra en forma de cruz).

3.3.5. Efecto de la coinoculación con *Micromonospora* y *Bradyrhizobium* en la nodulación de *Lupinus albus*

El interés originado en los últimos años sobre el papel que desempeñan cierto número de actinomicetos aislados de diferentes tejidos de plantas sanas cultivadas en el campo, ha suscitado el incremento de las investigaciones encaminadas a evaluar los efectos de estos microorganismos en el desarrollo de la planta.

Debido al gran número de aislados perteneciente al género *Micromonospora* que han sido obtenidos a partir de nódulos de leguminosas, así como por su capacidad de

crecer en medio libre de nitrógeno y por la presencia de una secuencia correspondiente al gen *nifH*, nos planteamos la interrogante sobre el papel que desempeñan estos microorganismos en el interior del nódulo de las leguminosas y su relación con otros fijadores de nitrógeno como *Bradyrhizobium*.

Para determinar el efecto en la nodulación, diseñamos un ensayo de inoculación en *Lupinus albus* con la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08 aislada de *Lupinus* y la cepa *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65. La selección de *Bradyrhizobium* se basa en la capacidad de este género para nodular y fijar nitrógeno con plantas de *Lupinus*. Los resultados fueron recogidos a las 6 semanas de crecimiento en cámara climatizada. En el caso del control negativo no se observó la presencia de nódulos en las raíces, por lo cual podemos decir que la esterilización de las semillas fue efectiva y que los resultados obtenidos en las plantas inoculadas no fue producto de una contaminación de las mismas.

Las plantas inoculadas únicamente con la cepa *Micromonospora* LUPAC 08 (*Micromonospora*) tampoco presentaron formación de nódulos en sus raíces, indicando que aunque estos microorganismos sean capaces de fijar nitrógeno atmosférico posiblemente no son capaces de producir nódulos en las plantas a diferencia de otras actinobacterias como *Frankia*.

En el caso de las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65, el control positivo, estas presentaron numerosos nódulos de forma redonda, de color rosado y localizados generalmente entre las raíces primaria y secundarias, en la parte superior de la raíz (proxima al tallo), presentando por lo tanto una nodulación que se puede considerar típica del género *Bradyrhizobium*.

Con respecto a las plantas coinoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 la formación de nódulos fue mayor que en las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65, observando un incremento en la nodulación en las plantas coinoculadas de un 86% con respecto a las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65 como se puede apreciar en la Tabla 3.3 y en las Figuras 3.6 y 3.7.

Los análisis de comparación de la media del número de nódulos obtenido (prueba de Tukey) indican que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65 y las plantas inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08. Estos resultados sugieren un efecto sinérgico entre las dos bacterias y un beneficio en el desarrollo de las plantas inoculadas. Además, estos resultados están en gran concordancia con los resultados presentados anteriormente, donde se describe la interacción tri-partita entre las bacterias *Rhizobium-Streptomyces* y la leguminosa *Pisum sativum* (Tokala *et al.*, 2003).

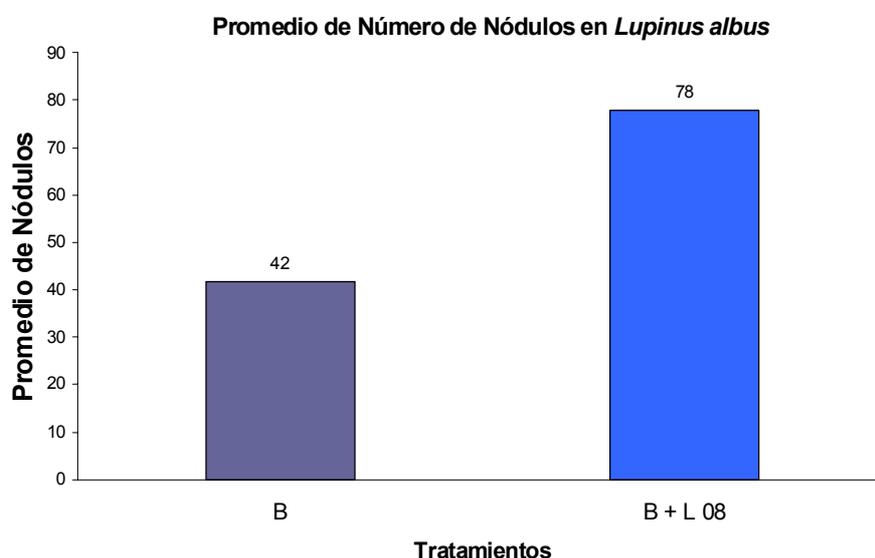


Fig. 3.6. Gráfico del promedio de nódulos obtenidos en plantas de *Lupinus albus*. B: Plantas tratadas únicamente con cepa *B. canariense* ISLU 65, B + L 08: Plantas inoculadas con las cepas *Micromonospora* LUPAC 08 y *B. canariense*. El número de observaciones fueron cinco plantas por tratamiento.

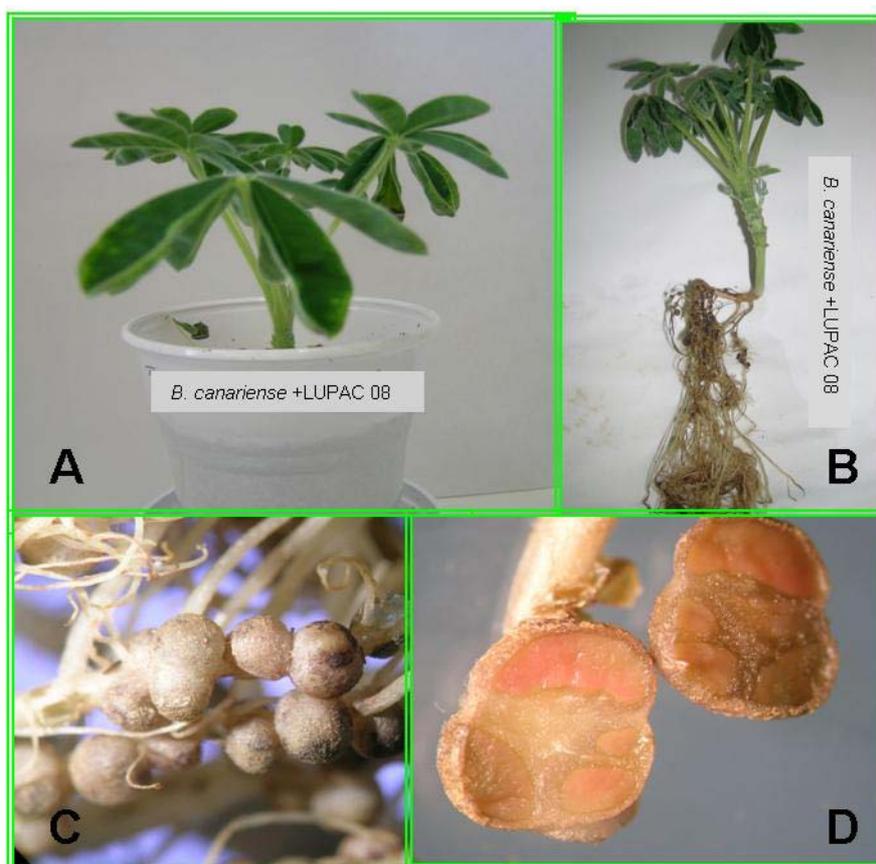


Fig. 3.7. Planta de *Lupinus albus* coinoculada con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08. A: planta en el vaso de siembra, B: Planta completa con raíces descubiertas, C: Aglomerado de nódulos, D: Corte longitudinal de un nódulo.

Según los resultados obtenidos en la variable de peso húmedo foliar en los diferentes tratamientos (Tabla 3.3 y Fig. 3.9), en el caso de las plantas pertenecientes al control negativo fueron las que presentaron un promedio menor (2,740 g).

En el caso de las plantas inoculadas con *Micromonospora* el promedio obtenido fue levemente superior que las plantas del control negativo (Tabla 3.3 y Figura 3.8), siendo esta diferencia estadísticamente no significativa ($P > 0.05$). Sin embargo, se ha observado en anteriores investigaciones que ciertos actinomicetos pueden contribuir de forma directa en el crecimiento de algunas plantas ya sea acelerando la emergencia y elongación de las raíces adventicias por la segregación directa de un tipo de hormona de

crecimiento. Lo que da una ventaja práctica para acortar el periodo de aclimatización de los tejidos de cultivos en ambientes calurosos y húmedos, disminuyendo el riesgo de enfermedades infecciosas en la plántula (Meguro *et al.*, 2006; Igarashi *et al.*, 2002; Manulis *et al.*, 1994).

Las plantas inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 presentaron un valor mayor en el peso húmedo foliar que el control negativo y el tratamiento inoculado con la cepa *Micromonospora* LUPAC 08, observando que existe una diferencia significativa estadísticamente ($P < 0.05$) entre estos dos tratamientos (Tabla 3.3 y Figura 3.9), este resultado es esperable teniendo en cuenta que la relación simbiótica entre *Bradyrhizobium* y *Lupinus* es ampliamente conocida.

En las plantas coinoculadas con la cepa de *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 fue donde se obtuvo el promedio más alto con respecto a los demás tratamientos en el peso húmedo foliar (Tabla 3.3 y Figs. 3.7 y 3.9). El análisis estadístico de comparación de medias del peso húmedo foliar nos dió como resultado que existe diferencia significativa tanto con el control negativo como con las plantas inoculadas con *Micromonospora* LUPAC 08 ($P < 0.05$). Sin embargo, a pesar de que en el tratamiento con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 presentó un promedio más alto con respecto al inoculado únicamente con *B. canariense* ISLU 65, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

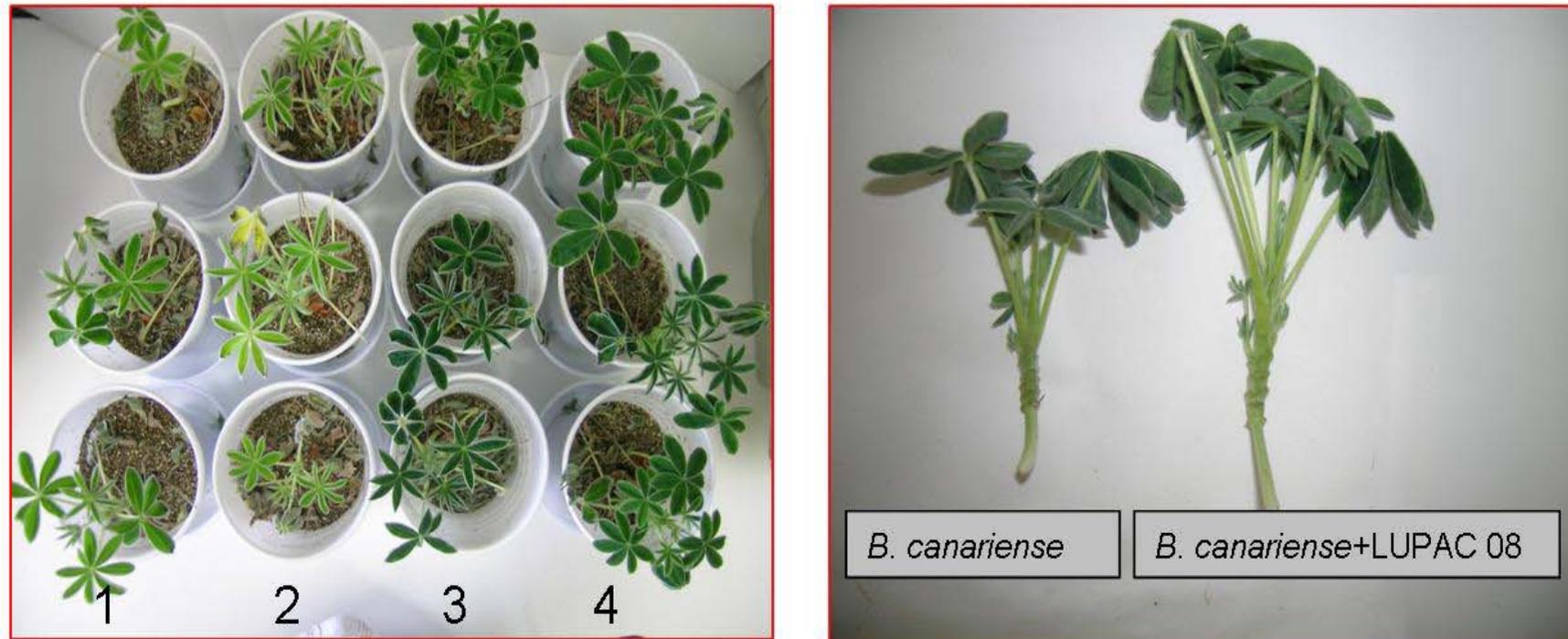


Fig. 3.8. A: Plantas de los cuatro tratamientos 1: control negativo, 2: *Micromonospora* LUPAC 08, 3: *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65, 4: *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08. B: Área foliar de tratamiento inoculado con *B. canariense* ISLU 65 y tratamiento coinoculado con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08.

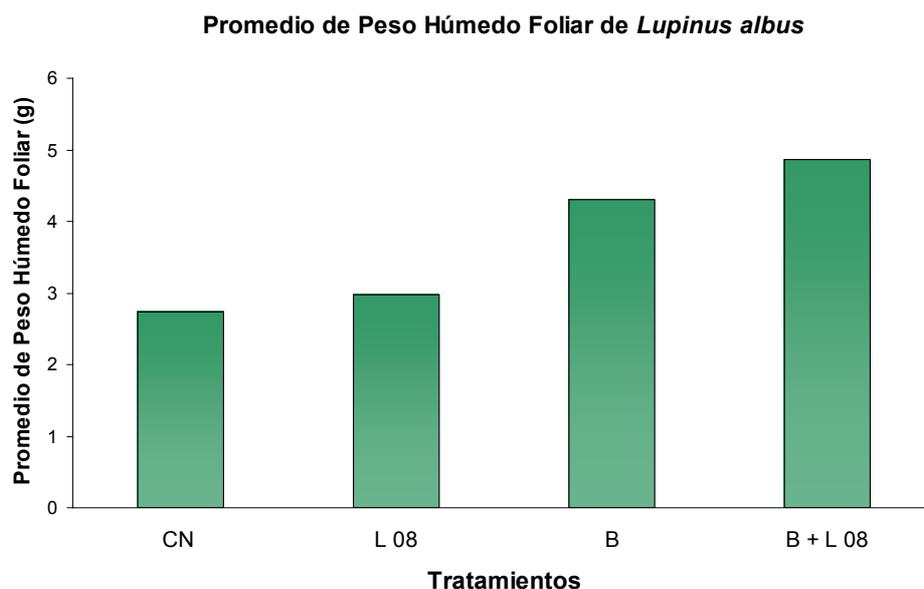


Fig. 3.9. Gráfico del promedio del peso húmedo foliar obtenidos en plantas de *Lupinus albus*. CN: control negativo; L 08: Plantas tratadas únicamente con la cepa *Micromonospora* LUPAC 08; B: Plantas tratadas únicamente con la cepa *B. canariense* ISLU 65; B + L 08: Plantas inoculadas con las cepas *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08. El número de observaciones fueron cinco plantas por tratamiento.

Después de cortadas y secadas las plantas de los diferentes tratamientos se procedió a pesar y analizar los resultados del peso seco foliar (Tabla 3.3 y Fig. 3.10). De manera similar, se pudo observar que al igual que en el peso húmedo foliar las plantas del control negativo presentaron el menor valor 0,394 g con respecto a los demás tratamientos.

Las plantas inoculadas únicamente con *Micromonospora* LUPAC 08, presentaron un valor más alto que las plantas del control negativo pero menor que los otros tratamientos. La diferencia en peso seco foliar de las plantas inoculadas con respecto al control negativo fue según la prueba de Tukey, no significativa ($P > 0.05$).

Las plantas inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 tuvieron un promedio de peso seco foliar mayor que el del control negativo y el tratamiento inoculado con *Micromonospora* LUPAC 08, pero menor que el del tratamiento inoculado con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08, obteniendo en todos los casos diferencia estadísticamente no significativa ($P>0.05$).

Finalmente, en el tratamiento donde las plantas fueron coinoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08, los valores promedio del peso seco foliar fueron mayores que los demás tratamientos, siendo significativamente diferente según la prueba de Tukey ($P<0.05$) con respecto al control negativo. No obstante, a pesar de que el valor promedio de las plantas de *Lupinus albus* inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 fue un promedio más alto que las inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65 (Figura. 3.10), dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ($P>0.05$).

Los resultados de peso seco foliar en las plantas inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 coinciden con los datos obtenidos también en peso húmedo foliar, siendo en ambos casos el mayor valor obtenido con respecto a los demás tratamientos, lo que nos hace coincidir nuevamente en el planteamiento de que existe una relación sinérgica entre la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08 y la cepa *B. canariense* ISLU 65 y que dicha interacción es positiva ya que beneficia afecta al crecimiento de la planta aunque es necesario profundizar en estos estudios para comprender los mecanismos involucrados en dicho efecto.

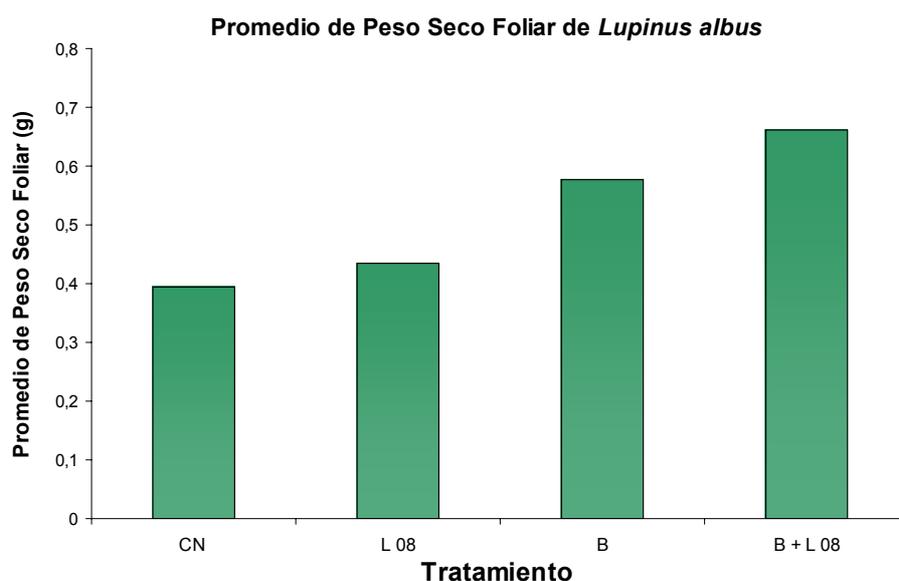


Fig. 3.10. Gráfico del promedio del peso seco foliar obtenidos en plantas de *Lupinus albus*. CN: control negativo, L 08: Plantas tratadas únicamente con cepa *Micromonospora* LUPAC 08, B: Plantas tratadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65 y B + L 08: Plantas inoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08. El número de observaciones fueron cinco plantas por tratamiento.

Finalmente, en el caso de las variables pesos húmedo y seco del área radicular, no se observó, según la prueba estadística de Tukey, diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos.

En resumen, la capacidad mostrada por la cepa de *Micromonospora* LUPAC 08, de crecer en medio carente de nitrógeno, la presencia en su genoma del gen *nifH* perteneciente al operon responsable de codificar la enzima nitrogenasa en dicha cepa, así como el incremento significativo en la nodulación y el desarrollo de la parte aérea en los ensayos de coinoculación con la cepa *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 65 en plantas de *Lupinus albus*, apoyan el potencial como PGPR de *Micromonospora* en asociación con microorganismos rizoendosimbioóticos naturales, que forman asociaciones fijadoras de nitrógeno con leguminosas. Sin embargo es necesario, de cara al futuro, ampliar y completar estos estudios para evaluar su interés real como biofertilizantes para su uso en la agricultura (Rosenblueth *et al.*, 2006; Compant *et al.*, 2005; Winding *et al.*, 2004; Gregor *et al.*, 2003; Molla *et al.*, 2001; Dashti *et al.*, 1997).

Tabla 3.3. Resultado del Ensayo de Inoculación con la cepa *Micromonospora* LUPAC 08 y *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65 en *Lupinus albus*

Tratamiento	Peso Húmedo*		Peso Seco*		Nódulos*
	Parte Área Foliar	Parte Radicular	Parte Área Foliar	Parte Radicular	
Control negativo	2,740±0,951 a	6,126±1,262 a	0,394±0,126 a	0,556±0,105 a	
<i>Micromonospora</i> LUPAC 08	2,984±1,003 ab	5,014±2,178 a	0,434±0,157 ab	0,594±0,233 a	
<i>B. canariense</i> ISLU 65	4,304±0,715 bc	6,828±0,785 a	0,576±0,100 abc	0,502±0,087 a	41,8±13 a
<i>B. canariense</i> ISLU 65+ <i>M. LUPAC</i> 08	4,868±0,668 c	6,494±0,903 a	0,662±0,903 bc	0,456±0,046 a	77,8±20 b

* Valores son las media de cinco réplicas ± la desviación estándar de cada uno de los tratamientos de las diferentes variables considerada en el ensayo. Valores en la misma columna con la misma letras no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$), de acuerdo a la prueba de Tukey.

3.4. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados en este capítulo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Lupinus* pertenecientes al género *Micromonospora* son capaces de crecer en ausencia de nitrógeno.

2. Se ha localizado en *Micromonospora* sp. LUPAC 08, una secuencia de ADN que corresponde al gen *nifH*, perteneciente al operon responsable de llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico. La secuenciación de éste fragmento mostró una relación próxima con el gen *nifH* de *Frankia alni* ACN 14a, con una similitud de un 99%.

3. *B. canariense* ISLU 65 no inhibe el crecimiento de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Lupinus*, y a su vez, éstas no producen ningún efecto negativo para el crecimiento de *B. canariense* ISLU 65.

4. La coinoculación de *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08, incrementa significativamente el número de nódulos en las plantas de *Lupinus albus* en comparación con las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65.

5. Existe un aumento en la parte aérea foliar de las plantas al ser coinoculadas con *B. canariense* ISLU 65 y *Micromonospora* LUPAC 08 en comparación con las plantas inoculadas únicamente con *B. canariense* ISLU 65.

6. Los miembros del género *Micromonospora* pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo y mejora de biofertilizantes para la agricultura.

CAPÍTULO 4

COINOCULACIÓN DE *Micromonospora* Y *Rhizobium* EN *Phaseolus vulgaris* CRECIDAS EN CÁMARA CLIMATIZADA

4.1. INTRODUCCIÓN

La fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico mediante la asociación *Rhizobium*/leguminosa es un proceso extensamente estudiado (Mylona *et al.*, 1995), sin embargo los estudios de coinoculación de las leguminosas con *Rhizobium* y otros microorganismos rizosféricos son bastante más escasos y los resultados obtenidos son poco concluyentes (Halverson and Haldelsman, 1991).

Durante muchos años se ha aceptado que las leguminosas han sido noduladas exclusivamente por miembros de la familia *Rhizobiaceae*, dentro de la subclase α -*Proteobacteria*. No obstante, en años recientes otros miembros de la subclase α -*Proteobacteria* han sido descritos como simbioses de leguminosas fijadoras de nitrógeno (Moulin *et al.*, 2001; Trujillo *et al.*, 2005). Además, un reciente informe reporta el aislamiento de nódulos de *Casuarina equisetifolia* de cepas de actinomicetos diferentes de *Frankia* capaces de fijar nitrógeno (Valdés *et al.*, 2005).

En investigaciones recientes se ha observado que al inocular *Pisum sativum* con *Streptomyces* se incrementaba significativamente la nodulación por *Rhizobium* (Tokala *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta el número de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos fijadores de nitrógeno de *Phaseolus vulgaris* y de *Arachis hypogaea* en el presente trabajo (capítulo 2) y los resultados sobre el efecto positivo de *Micromonospora* en *Lupinus albus* cuando fue inoculada conjuntamente con *Bradyrhizobium canariense* (capítulo 3) nos planteamos ampliar estos estudios para conocer el efecto de inocular las cepas aisladas de *Phaseolus vulgaris* en una asociación tripartita *Rhizobium-Phaseolus vulgaris-Micromonospora*.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Microorganismos usados en este estudio

Los microorganismos empleados en este estudio están recogidos en la siguiente Tabla:

Tabla 4.1. Microorganismos empleados en este estudio.

Código	Código
Fri 01	Fri 14
Fri 02A	Fri 15
Fri 02B	Fri 16
Fri 04A	Fri 17
Fri 05	Fri 18
Fri 07	Fri 19A
Fri 09A	Fri 19B
Fri 10	Fri 20A
Fri 11	Fri 20B
Fri 12	Fri 22
Fri 13	Fri 24

Las 22 cepas del presente estudio se aislaron a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* recogidos en la ciudad de León (Nicaragua). Las cepas han sido caracterizadas e identificadas en el género *Micromonospora* (Capítulo 2).

4.2.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno

Para determinar la capacidad de crecimiento de las 22 cepas aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* de crecer en medio libre de nitrógeno, los aislados fueron cultivados en medio libre de este elemento, empleando la metodología descrita en el apartado 3.2.2.

4.2.3. Amplificación y secuenciación del gen *nifH*

La amplificación y secuenciación del gen *nifH* de las cepas aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* crecidas en Nicaragua, Fri 02A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri 24A, se realizó mediante PCR y con dos tipos de oligonucleotidos para una amplificación directa del fragmento de aproximadamente 348 pb del gen *nifH*.

Amplificación de ADN

La amplificación del gen *nifH* se realizó mediante el empleo de dos oligonucleótidos Ela1 y POLR (Sigma), diseñados a partir de regiones conservadas por Gtari *et al.* (2007) y Poly *et al.* (2001). Los oligonucleótidos, Ela1 y POLR (Sigma) cuyas secuencias son las siguientes fueron empleados para la amplificación parcial del gen *nifH*:

Ela1 (f) 5'-ATGGC(G/T)GCCATGGCCGAG-3'

POLR (r) 5'-AT(GC)GCCATC AT(CT)TC(AG)CCGGA-3'

La preparación de la mezcla de reacción de PCR para la amplificación del segmento de 348 pb se llevó a cabo empleando el kit “REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de Sigma como se describe en el Anexo III, Tabla 4.1.

Condiciones de PCR del segmento 348 pb

La reacción de amplificación del ADN se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones descritas en el Anexo IV, Fig 4.1. Los productos de PCR fueron visualizados en agarosa y purificados siguiendo la metodología anteriormente descrita (apartado 2.2.2.5.).

Secuenciación de los productos de PCR purificados

Para la secuenciación del gen *nifH* se utilizó el oligonucleótido **Ela1**. Se preparó una mezcla con 100 ng de ADN y 3 picomoles del oligonucleótido para una reacción de PCR. La secuenciación automática del fragmento se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca.

Análisis de los fragmentos secuenciados

Las secuencias obtenidas se analizaron a través del programa BLASTn que compara cada una de las secuencias obtenidas con las depositadas en los bancos de genes y nos ofrece un listado de aquellas que presentan una mayor similitud (Zhang *et al.*, 2000).

4.2.4. Capacidad de nodulación por *Rhizobium* en semillas químicamente tratadas

Se evaluó la capacidad de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T y de *Rhizobium etli* CFN 42^T de formar nódulos en raíces de alubia de una variedad de ciclo corto cuyas semillas fueron tratadas químicamente con Thirame+ Dichlofenthion.

La metodología empleada fue la descrita por Trujillo *et al.* (2005) con ciertas modificaciones:

Las semillas fueron lavadas 7 veces con agua estéril para eliminar la mayor cantidad posible de sustancias químicas con las que habían sido tratadas.

Posteriormente, las semillas de *Phaseolus vulgaris* se esterilizaron en superficie con hipoclorito sódico al 35% (v/v) durante 12 minutos, pasados los cuales se realizaron seis lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos de la solución. Las semillas esterilizadas fueron colocadas en condiciones asépticas en placas de Petri estériles que contenían papel de filtro humedecido para una buena germinación.

Las semillas germinadas se dispusieron en macetas que contenían vermiculita estéril como soporte del cultivo. Para la esterilización de la vermiculita se la introdujo en autoclave durante una hora a 120°C y una atmósfera de presión, repitiendo la misma operación a las 24 y 48 horas.

Rhizobium phaseoli ATCC 14482^T y *Rhizobium etli* CFN 42^T fueron cultivadas en medio YMA durante 5 días a 28°C. De cada cepa cultivada se realizaron suspensiones bacterianas de 1×10^8 u.f.c/ml. A cada planta se le inoculó 1 ml de la suspensión anterior. Se efectuaron 10 réplicas por cepa y se dejaron los correspondientes controles negativos sin inocular.

Las plantas se mantuvieron durante treinta días en cámara iluminada con lamparas tipo fluorescentes Gro-Lux F36W/Gro (SYLVANIA). La cámara fue programada para un fotoperíodo de 16 horas, con una humedad relativa del 60% y una temperatura de 25°C y 20°C durante el día y la noche respectivamente. Las plantas se regaron durante

este tiempo de forma alternada con agua destilada estéril o una solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud and Puppo, 1975) (Tabla 3.3).

Finalmente, las plantas fueron recogidas, para analizar la infectividad, para lo cual se procedió a realizar un recuento de nódulos de las plantas inoculadas, obteniendo la media de los nódulos de todas las réplicas inoculadas con una misma cepa.

4.2.5. Ensayo de antagonismo entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium phaseoli*

Para determinar si las cepas de *Micromonospora* (Tabla 4.1, apartado 4.2.1), aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris* causaban efectos antagónicos en el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, los microorganismos se sembraron siguiendo la metodología de Gregor *et al.* (2003) con algunas modificaciones.

La cepa de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T fue crecida en medio YMA durante 5 días a 28°C. Las cepas de *Micromonospora* fueron crecidas en medio SA1 durante una semana a 28°C. De cada cepa cultivada se realizaron suspensiones bacterianas de aproximadamente 1×10^8 u.f.c./ml.

En placas con medio de YMA y en condiciones asépticas con un hisopo estéril se extendió una suspensión en forma de tapíz de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, y las placas se dejaron secar. Posteriormente se sembró mediante hisopo la suspensión que contenía la cepa de *Micromonospora* en forma de cruz. Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28°C.

Se observó el crecimiento de ambos microorganismos y los posibles efectos de antagonismo entre ellos. La presencia de un buen crecimiento de ambos tipos de microorganismos se consideró un resultado positivo.

4.2.6. Coinoculación de plantas de *Phaseolus vulgaris* con *Micromonospora* y *Rhizobium phaseoli* crecidas en cámara climatizada

La evaluación del efecto de la coinoculación en plantas de *Phaseolus vulgaris* con la cepa de *Micromonospora* Fri 11, y la cepa de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, se llevó a cabo de acuerdo a los protocolos descritos anteriormente (Trujillo *et al.*, 2005).

Primeramente se lavaron las semillas de *Phaseolus vulgaris* con agua estéril, siete veces, para eliminar la mayor cantidad posible de sustancias químicas con las que habían sido tratadas. Posteriormente las semillas de *Phaseolus vulgaris* se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico al 35% (v/v) durante 12 minutos, pasados los cuales se realizaron 6 lavados con agua estéril para eliminar los restos de la solución.

Las semillas esterilizadas fueron colocadas en placas Petri estéril que contenían papel de filtro humedecido con agua estéril, para que se llevara a cabo la germinación.

Las semillas germinadas se dispusieron en macetas que contenían vermiculita estéril como soporte del cultivo. La vermiculita se esterilizó como ya se explicó anteriormente.

Preparación de los inóculos

Rhizobium phaseoli ATCC 14482^T fue cultivada en medio YMA durante 5 días a 28°C. La cepa de *Micromonospora*, Fri 11, fue crecida en medio SA1 durante una semana a 28°C. De cada cepa cultivada se realizaron suspensiones bacterianas de 1x10⁸ u.f.c./ml.

Cada planta fue inoculada con 1ml de suspensión bacteriana de acuerdo con los siguientes tratamientos:

T1: Plántulas sin inocular: control negativo.

T2: Inóculo con *Micromonospora* Fri 11.

T3: Inóculo con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T.

T4: Inóculo con *R. phaseoli* ATCC 14482 + *Micromonospora* Fri 11.

Se inocularon 15 plantas con cada tratamiento para un total de 60 ejemplares.

Las plantas se mantuvieron en cámara iluminada con lámparas tipo fluorescentes Gro-Lux F36W/Gro (SYLVANIA) programada para un fotoperíodo de 16 horas, durante 30 días, con una humedad relativa del 60% y a una temperatura de 25°C y 20°C durante el día y la noche respectivamente.

Las plantas se regaron de forma alternada con agua estéril o una solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud and Puppo, 1975) Anexo II, Tabla 3.3.

Para evaluar el efecto de los tratamientos se recogieron las siguientes variables:

- peso seco y húmedo de la biomasa aérea y radicular
- longitud del tallo y la raíz
- número de nódulos por planta

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente usando el programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc., 1998), a cada variable se le realizó un análisis de ANOVA (varianza de las media) y prueba de Tukey.

4.3. RESULTADO Y DISCUSION

4.3.2. Crecimiento en medio libre de nitrógeno

Para evaluar la capacidad de los aislados de crecer en ausencia de nitrógeno las cepas aisladas de nódulos esterilizados en superficie de *Phaseolus vulgaris* fueron crecidas en medio libre de nitrógeno, así como en un medio conteniendo dicho elemento (control positivo).

Los resultados obtenidos después de tres semanas de incubación fueron positivos en todos los casos, observándose que la mayoría de las cepas inoculadas presentaba un buen crecimiento en el medio libre de nitrógeno así como en el medio control (Fig. 4.1). Esto nos permite inferir que nuestras cepas poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Estudios realizados con microorganismos clasificados en el género *Micromonospora* demostraron poseer la capacidad de crecer en medios con ausencia de nitrógeno (Guillén *et al.*, 1993; Valdés *et al.*, 2005;), al igual que las cepas aisladas de *Lupinus angustifolius* en este trabajo (Capítulo 3).

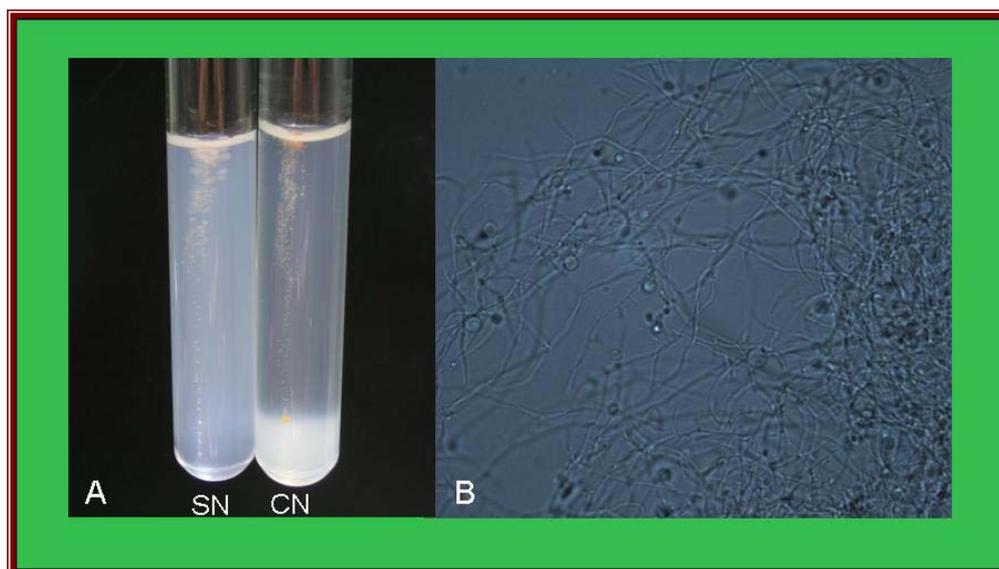


Fig. 4.1: Prueba de crecimiento en ausencia de nitrógeno de las cepas aisladas de *Phaseolus vulgaris*. (A) *Micromonospora* Fri 13 en medio libre de nitrógeno (SN) y en medio con nitrógeno (CN); (B) Células de Fri 13 crecidas en medio libre de nitrógeno observadas al microscopio.

4.3.3. Amplificación y secuenciación del gen *nifH*

Las cepas aisladas de nódulos de alubias presentaron un crecimiento significativo en medio libre de nitrógeno, lo cual nos llevo a pensar que dichos aislados podrían ser portadores del gen *nifH* al igual que la cepa aislada de nódulos de *Lupinus angustifolius* LUPAC 08 (Capítulo 3). Debido a ello nos propusimos realizar la amplificación y secuenciación del gen *nifH*, empleando un par de cebadores diseñados a partir de regiones conservadas por Poly, *et al.* (2001) y Gtari *et al.* (2007).

El fragmento de 348 pb obtenido de fue secuenciado y comparado con las secuencias depositadas en la base de datos públicos de genes, mostrando que las secuencias de las cepas Fri 02A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri 24A presentaban una alta similitud con la secuencia del gen *nifH* de *Frankia*, específicamente, nuestras cepas mostraron una similitud de un 99% con *Frankia alni* ACN 14a.

La capacidad de crecer en medio libre de nitrógeno y la presencia del gen *nifH* en nuestras cepas, así como en cepas aisladas de *Casuarina* y *Lupinus*, pertenecientes al género *Micromonospora*, sugieren que estos microorganismos que habitan dentro de nódulos fijadores de nitrógeno en diversas plantas pueden realizar algún proceso o algún papel beneficioso para la planta que los alberga, en este caso una posible fijación de nitrógeno (Normand *et al.*, 1989, Choo *et al.*, 2003; Raymond *et al.*, 2004; Valdés *et al.*, 2005)

Con el objetivo de determinar la posición filogenética de la secuencia parcial del gen *nifH* obtenida de las cepas de Fri 02A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri 24A, las secuencias fueron alineadas con otras secuencias obtenidas de la base de datos GenBank y posteriormente se realizaron los análisis filogenéticos tal y como se describió en el apartado 2.2.2.5. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 4.2.

En el árbol filogenético (Fig. 4.2) se observa que las cepas Fri 02A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri 24A son agrupadas en un clado con rangos de similitud del 90%, con la cepa *Frankia alni* ACN 14a y con la cepa LUPAC 08 (Capítulo 3).

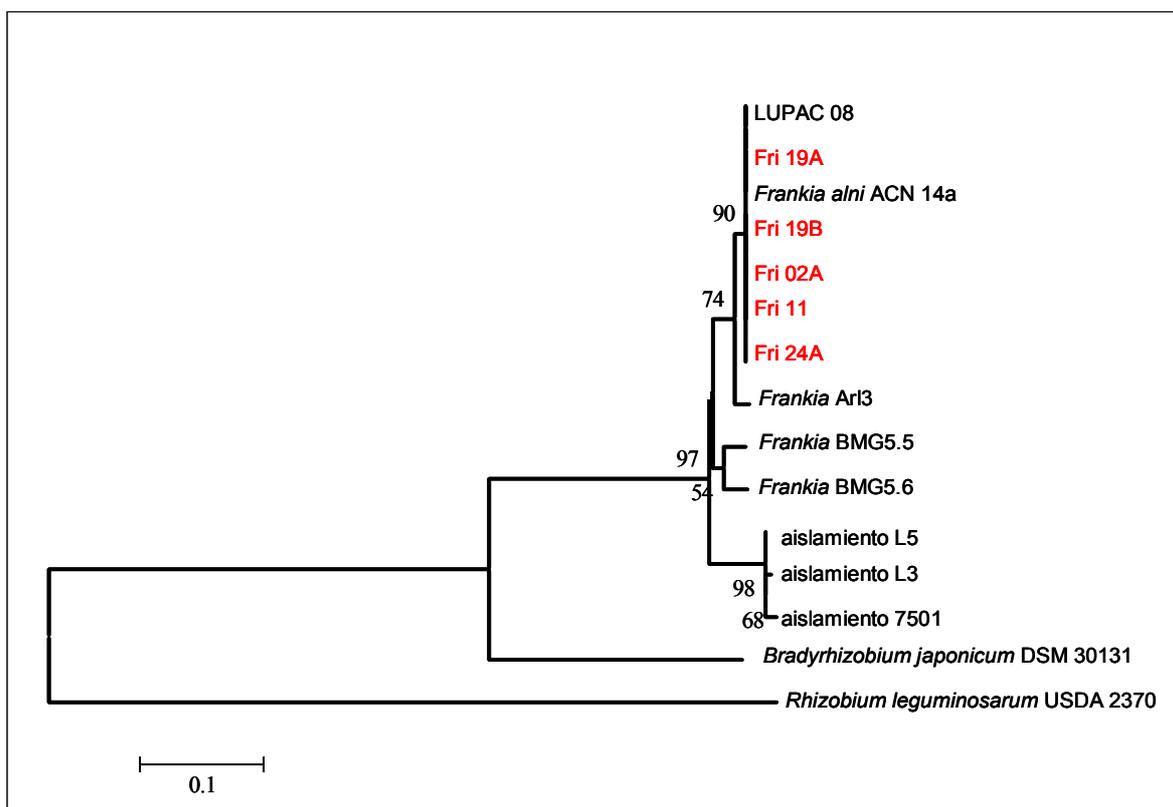


Fig. 4.2. Árbol filogenético basado en el método Neighbor-Joining y construido con secuencias parciales correspondientes al gen *nifH* de cepas de *Micromonospora* aisladas a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y secuencias de nucleótidos de genes *nifH* de otros fijadores de nitrógeno.

Los resultados obtenidos con nuestras cepas, así como con cepas aisladas de *Lupinus angustifolius* y *Casuarina* apoyan la hipótesis de que la presencia del gen *nifH* puede encontrarse en cepas del género *Micromonospora* y que dicho gen a lo largo de la evolución pudo ser transferido de un ancestro común.

4.3.4. Capacidad de nodulación por *Rhizobium* en semillas químicamente tratadas

Las semillas de algunas leguminosas están frecuentemente tratadas con productos de aplicación directa tales como insecticidas o fungicidas para prevenir daños por plagas o enfermedades, y en ciertos casos con fertilizantes a base de micronutrientes para proporcionar elementos minerales en suelos deficientes. Asimismo, la aplicación de

inoculantes formulados con cepas de rhizobia es una práctica común realizada para asegurar una efectiva nodulación y subsiguiente fijación de nitrógeno.

En ciertos casos puede existir incompatibilidad entre el producto químico y el inoculante, lo cual se traduce en una reducción en la nodulación de la leguminosa, así como, en el contenido de nitrógeno y el contenido de clorofilas, además en constante contacto con fungicidas la viabilidad de la población de microorganismos diazotrofos disminuye (Andrés *et al.*, 1997; Marenco *et al.*, 1993; Gaiind *et al.*, 2007; Aamil *et al.*, 2005; Kyei-Boahen *et al.*, 2001). En consecuencia, para los sistemas agrícolas actuales como el cultivo de soja, cacahuete y frijol entre otros, debe ser considerado el mejoramiento de la compatibilidad entre el inoculante y los productos químicos aplicados a la semilla.

Después de la inoculación se ha observado que, la mortalidad de *Bradyrhizobium japonicum* sobre la semilla de soja es muy alta, sobreviviendo a las 24 h menos del 10% de las bacterias incorporadas con la inoculación (Streeter, 2003). Un protector bacteriano de aplicación conjunta con el inoculante es un agente de protección del microsimbionte ante condiciones adversas tales como la desecación celular (Curley *et al.*, 1975) y el efecto tóxico de productos químicos que están presentes sobre la semilla y que interactúan con el inoculante (Thompson, 1960).

Para determinar si las cepas de *Rhizobium*, *R. phaseoli* ATCC 14482^T y *R. etli* CFN42^T, eran capaces de desarrollar nódulos en las raíces de alubias en plantas germinadas a partir de semillas que estaban tratadas químicamente con Thirame+Dichlofenthion llevamos a cabo ensayos de nodulación en cámara climatizada.

A los 30 días de crecidas las plantas, fueron procesadas, observando que existía un número significativo de nódulos efectivos en los diferentes tratamientos, independiente de la especie de *Rhizobium* inoculada. Sin embargo, se pudo observar que existía un 50% más de nódulos en las plantas inoculadas con *R. phaseoli* ATCC 14482^T con respecto a las plantas inoculadas *R. etli* CFN42^T.

En base a los resultados obtenidos podemos deducir que las cepas de *Rhizobium* usadas en este ensayo son capaces de formar nódulos efectivos a pesar de que las semillas estén químicamente tratadas con Thirame+Dichlofenthion, la capacidad de supervivencia y viabilidad de los microorganismos empleados como inoculantes en plantas debe ser también una característica a tener en cuenta en el momento de seleccionar y aplicar cepas de rhizobia para un mejor crecimiento de las plantas (Gaind *et al.*, 2007; Aamil *et al.*, 2005).

4.3.5. Ensayo de antagonismo entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de *Phaseolus vulgaris* y *Rhizobium phaseoli*

La aplicación conjunta de diferentes cepas de rhizobia en *P. vulgaris* puede conducir a la disminución en el número de nódulos formado habitualmente por ciertas cepas de *Rhizobium*, producto posiblemente de una interacción antagónica entre las cepas inoculadas simultáneamente en *P. vulgaris* (García-Frayles, 2008).

Con el fin de determinar la interacción existente entre las cepas de *Micromonospora* aisladas de alubia con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T y observar si no existía ningún efecto antagónico entre las mismas, se evaluó la capacidad de crecimiento simultáneo en medio YMA de las cepas, *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, según la metodología de Gregor *et al.* (2003).

Tras siete días de incubación se pudo observar la presencia de óptimo crecimiento de ambas cepas, por lo que podemos decir que no existe efecto antagónico entre ellas (Fig 4.2). Lo cual también fue observado en ensayos realizados con las cepas aisladas de *Lupinus angustifolius* y *Bradyrhizobium canariense* ISLU 65, en este trabajo (Capítulo 3).

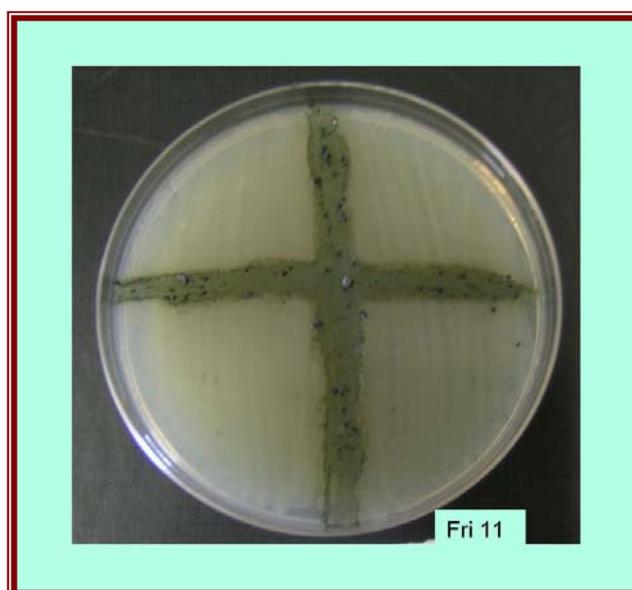


Fig. 4.3. Crecimiento en medio YMA de *R. phaseoli* ATCC 14482^T (crecimiento en masa) y *Micromonospora* Fri 11 (siembra en forma de cruz)

4.3.6. Coinoculación de plantas de *Phaseolus vulgaris* con *Micromonospora* y *Rhizobium phaseoli* crecidas en cámara climatizada

Algunos actinomicetes poseen la capacidad de proteger las plantas hospedadoras frente al daño causado por un gran número de agentes patógenos, así como tener una influencia positiva en el crecimiento y fisiología de las plantas debido a la producción de determinados metabolitos secundarios (Taechowisan *et al.*, 2003). La producción de metabolitos secundarios presente en ciertas especies de *Micromonospora* puede proporcionar directa o indirectamente a las plantas hospedadoras ventajas que le permitan un mejor desarrollo al inducir o facilitar el aumento en el número de nódulos producido por microorganismos noduladores de leguminosas.

Para evaluar el efecto de las cepas de *Micromonospora* aisladas de *Phaseolus vulgaris* llevamos a cabo un ensayo de coinoculación en condiciones de cámara climatizada, basado en la metodología descrita por Trujillo *et al.* (2005) y empleada también en ensayo de coinoculación en *Lupinus albus* (capítulo 3).

Las plantas de *Phaseolus vulgaris* fueron crecidas en condiciones controladas durante seis semanas tras la cuales las plantas inoculadas, así como las plantas que sirvieron como control positivo y negativo, fueron procesadas para evaluar el efecto de la coinoculación con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T y *Micromonospora* Fri 11.

En el caso de las plantas sin inocular (control negativo) se pudo observar que no hubo formación de nódulos en sus raíces, por consiguiente se puede decir que la técnica de esterilización de las semillas y la siembra se realizaron asépticamente y por ende los resultados obtenidos en los demás tratamientos son producto de la inoculación con las diferentes suspensiones bacterianas utilizadas.

Las plantas inoculadas con *Micromonospora* Fri 11, presentaron similar resultado que las plantas control con respecto a la ausencia de nódulos en sus raíces, así como a los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación de *Lupinus albus* con *Micromonospora* LUPAC 08, por lo cual podemos considerar que las cepas de *Micromonospora* usadas en ambos ensayos aparentemente no poseen la capacidad de formar nódulos al contrario que otras actinobacterias como las perteneciente a *Frankia* capaces de formar nódulos en plantas actinorrícicas.

Las plantas inoculadas con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T (control positivo) presentaron nódulos mayoritariamente en las raíces secundarias en la zona superior de la biomasa radicular de la planta. Dichos nódulos presentaban una forma redondeada y de color rosado. El número promedio de nódulos obtenido de las plantas inoculadas con esta cepa fue de 86 (Tabla 4.2). ATCC

En el caso de las plantas tratadas con las cepas *Micromonospora* Fri 11 y *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T se pudo observar al extraer las plantas del soporte de vermiculita, la presencia de nodulación en sus raíces. Los nódulos, al igual que en el caso de las plantas tratadas únicamente con cepas de *R. phaseoli* ATCC 14482^T, eran de color rosado y se encontraban ubicados en las raíces secundarias, así como su distribución en la biomasa radicular fue en la zona superior de la raíz (Fig. 4.4). El número de nódulos en las plantas coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, fue en promedio superior en comparación con las plantas inoculadas únicamente con *R. phaseoli* ATCC 14482^T (Cuadro 4.2). El porcentaje de

nódulos en las plantas coinoculadas fue de un 152% más que las inoculadas con *R. phaseoli* ATCC 14482^T (Fig. 4.5), cuya diferencia según la prueba de comparación de medias de Tukey es estadísticamente significativa ($P < 0.05$).



Fig. 4.4. Raíces y Nódulos de plantas de *Phaseolus vulgaris*. A: raíces con nódulos de plantas inoculadas únicamente con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T, B: raíces con nódulos de plantas coinoculadas con la cepa *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, C, D y E: nódulos efectivos de planta coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T.

Los resultados sobre el número de nódulos obtenido en las plantas tratadas con cepas de *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T indican que la presencia de microorganismos pertenecientes al género *Micromonospora* en el momento de la inoculación contribuyen significativamente en la eficacia de formación de nódulos por parte de la cepa *R. phaseoli* ATCC 14482^T. Resultados similares a los nuestros han sido reportados por Gregor *et al.* (2003) y Tokala *et al.* (2002) al emplear coinóculos de actinomicetos y bacterias fijadoras de nitrógeno pertenecientes al grupo de los rhizobia en leguminosas.

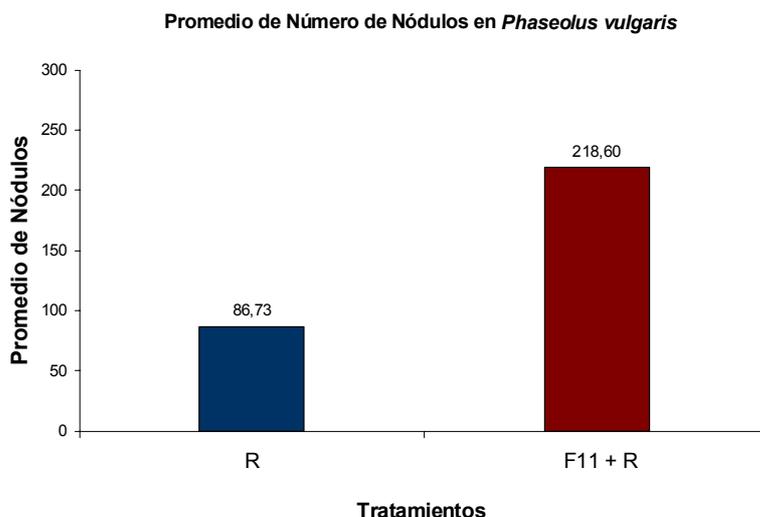


Fig. 4.5. Gráfico del promedio de nódulos obtenidos en plantas de *Phaseolus vulgaris*. R: Plantas tratadas únicamente con cepa *R. phaseoli* ATCC 14482^T, R+F11: Plantas coinoculadas con cepa *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T. El número de observaciones fueron quince plantas por tratamiento.

Con respecto a la altura de las plantas, se puede observar que las plantas correspondientes al control negativo presentaron un tamaño menor que las plantas de los tratamientos inoculados con *R. phaseoli* ATCC 14482^T ó bien las coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T. Por otra parte, se observó que en el caso de las plantas inoculadas únicamente con *Micromonospora* Fri 11 fueron las que presentaron el valor más pequeño (Tabla 4.2). Sin embargo, en todos los casos los análisis estadísticos de comparación de medias realizados a los datos obtenidos indicaron que no existía diferencia significativa entre los diferentes tratamientos ($P > 0.05$).

El análisis realizado a los datos correspondientes a la variable de longitud radicular nos dió como resultado que dichas variables, entre los diferentes tratamientos, no presentaron estadísticamente diferencia significativa ($P > 0.05$). Por consiguiente, podemos decir que ninguno de los tratamientos de inoculación empleados tiene efecto sobre el aumento en la longitud radicular de la planta.

En el caso del peso húmedo radicular, las plantas del control negativo (plantas sin inocular) no presentaron estadísticamente diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos, exceptuando el caso del tratamiento inoculado con *Micromonospora* Fri 11 que fue significativamente menor con respecto al control negativo, sin embargo, se puede observar que el valor más alto lo presentó el tratamiento coinoculado con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T (Tabla 4.2).

De igual manera, el promedio de peso seco radicular entre los diferentes tratamientos no presentaron diferencia significativa ($P > 0.05$) en la prueba de comparación de medias de Tukey, exceptuando el caso del tratamiento inoculado únicamente con *Micromonospora* Fri 11 y el tratamiento inoculado con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T entre los cuales se obtuvo una diferencia significativa ($P < 0.05$), además se puede observar en los resultados (Tabla 4.2) que el valor más alto fue el del tratamiento coinoculado, lo cual nos lleva a inferir que la asociación de ambos microorganismos puede tener algún tipo de efecto en la biomasa radicular de la planta (Meguro *et al.*, 2006 y Igarashi *et al.*, 2002).

En la variable de peso húmedo foliar se pudo observar que el mayor valor lo presentaron las plantas tratadas con las cepas de *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T (Cuadro 4.2, Fig 4.6), sin embargo, el análisis de comparación de medias de Tukey indica que no existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos. No obstante, estos resultados sugieren que la combinación *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, aparentemente beneficia el desarrollo de la planta, en este caso, aumentando el peso húmedo foliar.

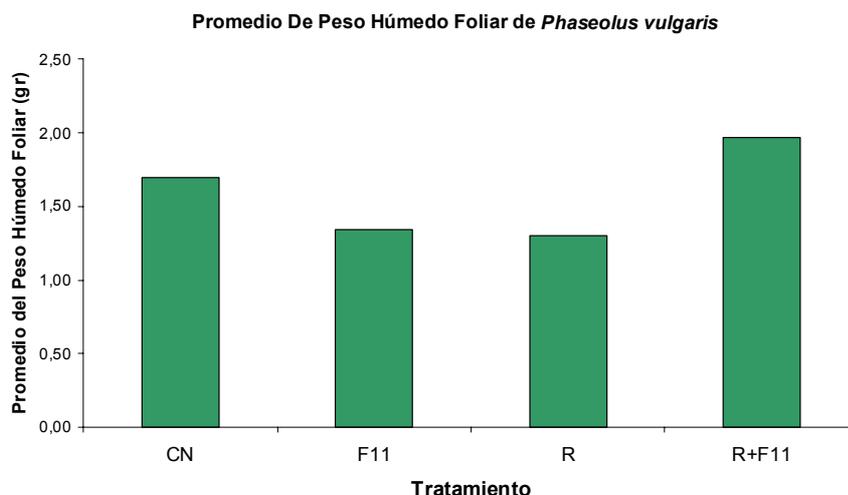


Fig. 4.6. Gráfico del promedio del peso húmedo foliar obtenidos en plantas de *Phaseolus vulgaris*. CN: tratamiento control negativo, F11: Plantas tratadas únicamente con *Micromonospora* Fri 11, R: Plantas tratadas únicamente con *R. phaseoli* ATCC 14482^T y R+F11: Plantas coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T. El número de observaciones fueron quince plantas por tratamiento.

Al igual que en el peso seco radicular y el peso húmedo foliar se pudo observar que en el caso del peso seco foliar, las plantas tratadas con las cepas *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T son las que presentaron un promedio más alto que los demás tratamientos (Tabla 4.2, Fig. 4.7), sin embargo, los análisis estadísticos de comparación de medias de Tukey nos indicaron que no existía diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los diferentes tratamientos exceptuando la plantas tratadas con la cepa de *Micromonospora* Fri 11 y las tratadas con las cepas de *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T.

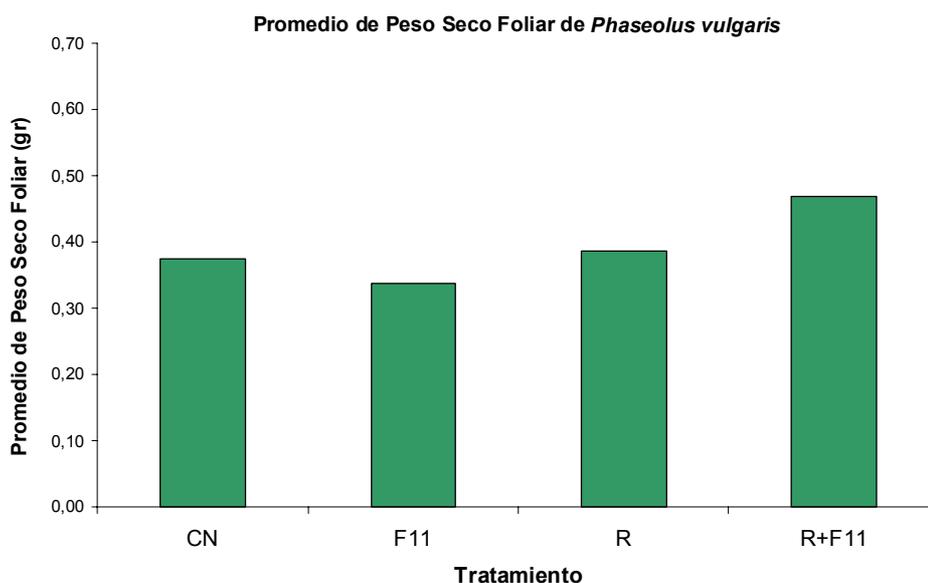


Fig. 4.7. Gráfico del promedio del peso seco foliar obtenidos en plantas de *Phaseolus vulgaris*. CN: tratamiento negativo, F 11: Plantas tratadas únicamente con *Micromonospora* Fri 11, R: Plantas tratadas con *R. phaseoli* ATCC 14482^T y R+F11: Plantas coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T. El número de observaciones fueron quince plantas por tratamiento.

Los resultados obtenidos tanto en la biomasa radicular como foliar, además del aumento en el número de nódulos formados en las plantas de *Phaseolus vulgaris* al inocular simultáneamente *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, sugieren que la asociación entre bacterias perteneciente al grupo de los actinomicetos con bacterias fijadoras de nitrógeno del tipo rhizobia puede suponer una mejora en la efectividad con respecto a la nodulación y posterior desarrollo de la planta. Resultados similares han sido también obtenidos en otros trabajos en los que se han empleado cepas de actinobacterias en *Pisum sativum* (Tokala *et al.*, 2002), plantas de *Glycine max* (Gregor *et al.*, 2003) y *Lupinus albus* (presente estudio, capítulo 3). Además, la capacidad demostrada de muchos actinomicetos de producir metabolitos secundarios con un efecto de promoción del crecimiento vegetal (Solans 2007), o como moléculas protectoras de la planta frente a posibles patógenos merece ser estudiada en relación con la interacción planta-microorganismo ya conocida: leguminosa-rhizobia.

Tabla 4.2. Resultado del ensayo de inoculación con la cepa *Micromonospora* Fri 11 y *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482 en plantas de *Phaseolus vulgaris*

Tratamiento	Parte Radicular			Parte Foliar			No. Nódulos
	Longitud (cm)	Peso Húmedo (g)	Peso Seco (g)	Altura (cm)	Peso Húmedo(g)	Peso Seco(g)	
CN	21,500±1.087a	0,338±0.263a	0,237±0.052a	13,993±1.120a	1,692±0.299a	0,375±0.065a	
F11	21,571±1.222a	0,181±0.043b	0,179±0.046ab	13,464±1.168a	1,337±0.321a	0,338±0.060ab	
R	21,667±1.345a	0,321±0.124a	0,211±0.047a	14,100±2.436a	1,301±0.458a	0,386±0.094a	86,733±32.788a
R+F11	20,536±1.216a	0,375±0.098a	0,317±0.060ac	14,679±2.044a	1,971±0.527a	0,469±0.110ac	218,600±54.001b

CN: control negativo; F11: Plantas inoculadas únicamente con *Micromonospora* Fri 11; R: Plantas inoculadas con *R. phaseoli* ATCC 14482^T; R+F11: Plantas inoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T.

Los valores son la media de cinco replicas ± la desviación estandar de cada uno de los tratamientos de las diferentes variables considerada en el ensayo. Valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$), de acuerdo a la prueba de Tukey.

4.4. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes experimentos realizados en este trabajo, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. Las cepas aisladas de nódulos radiculares de *Phaseolus vulgaris* pertenecientes al género *Micromonospora* pueden crecer en ausencia de nitrógeno.

2. Se ha localizado en las cepas de *Micromonospora* spp. Fri 2A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri una secuencia de ADN que corresponde al gen *nifH*, perteneciente al operon responsable de llevar a cabo la fijación de nitrógeno atmosférico.

3. El gen *nifH* de las cepas de *Micromonospora* Fri 2A, Fri 11, Fri 19A, Fri 19B y Fri 24A presentan una relación próxima con el gen *nifH* de *Frankia alni* ACN 14a, con una similitud de un 99%.

4. *R. phaseoli* ATCC 14482^T no inhibe el crecimiento de las cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, y a su vez, éstas no producen ningún efecto negativo para el crecimiento de *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T.

5. La coinoculación de *Micromonospora* Fri 11 y *R. phaseoli* ATCC 14482^T, incrementa significativamente el número de nódulos en las plantas de *Phaseolus vulgaris* en comparación con las plantas inoculadas únicamente con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T.

6. Existe un aumento en la parte aérea foliar de las plantas al ser coinoculadas con *Micromonospora* Fri 11 y *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T en comparación con las plantas inoculadas únicamente con *Rhizobium phaseoli* ATCC 14482^T.

7. El empleo de cepas pertenecientes al género *Micromonospora* en prácticas agroforestales, como biofertilizantes, puede ejercer una función importante en la aplicación y efectividad de los inóculos de cepas de rhizobia.

BIBIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aamil, M., Zaidi, A. Saghir, Khan S.** (2005). Fungicidal Impact on chickpea-*Mesorhizobium* Symbiosis. *J Environ Science and Health* **39**: 779-790.
- Ainouche, A. & Bayer, R. J.** (1999). Phylogenetic relationships in *Lupinus* (*Fabaceae*, *Papilionoideae*) based on internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Am J Bot* **86**: 590-607.
- Allen, O. N. & Allen, E.K.** (1981). The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. Madison, Wisconsin, U.S.A., University of Wisconsin Press.
- Andrés, J. A., Correa, N. S. & Rosas, S. B.** (1997). Survival and symbiotic properties of *Bradyrhizobium japonicum* in the presence of thiram: isolation of fungicide resistant strains. *Biology and Fertility of Soil* **26**: 141-145.
- Ara, I. and Kudo, T.** (2007). Two new species of the genus *Micromonospora*: *Micromonospora chokoriensis* sp. nov. and *Micromonospora coxensis* sp. nov., isolated from sandy soil. *J Gen Appl Microbiol* **53**:29-37.
- Asensio, C.** (1996). La judía I. En el cultivo de las leguminosas de grano en Castilla y León. Publicaciones de la Consejería de Agricultura y Ganadería (Castilla y León). pp. 295-318
- Azevedo, K. L., Maccheroni, J. R. & Pereira, J.O.** (2000). Endophytic microorganisms, a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic J Biotech* **3**:41-67.
- Barrera, L. L., Trujillo, M. E., Goodfellow, M., García, F. J., Hernández-Lucas, I., Dávila, G., van Berkaum, P. & Martínez-Romero, E.** (1997). Genetic Diversity of *Bradyrhizobia* nodulating *Lupinus* spp. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 1086-91.
- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. & Gresshoff, P. M.** (1992). DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**:70-76.
- Benson, D. R. & Silvester, W. B.** (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol Rev* **57**: 293-319.
- Bottomley, P., Cheng, H. H. & Strain, S. R.** (1994). Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1754-1761
- Bowcock, A.M.; Ruiz Linares, A.; Tomfohrde, J.; Minch, E.; Kidd, J.R. & Cavalli-Sforza, L.L.** (1994). High resolution trees with polymorphic microsatellites. *Nature* **368**: 455-457.
- Brenner, S. E.** (1995). BLAST, Blitz, BLOCKS and BEAUTY: sequence comparison on the net. *Trends Genet* **11**: 330-331.

- Bruijn, F. J., Rademaker, J., Schenider, M., Rossbach, U. & Louws, F.J.** (1996). Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analyses. *Biology of Plant-Microbe Interaction*. APS Press, 497-502.
- Bryan, J. A., Berlín, G.P., Gordon, J.C.** (1996). Toward a new concept of evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. *Plant and Soil* **186**: 151-159.
- Bull, A., Ward, A. & Goodfellow, M.** (2000). Setarch and discovery strategies for biotechnology, the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 573-606.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.P.** (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9**:553-6.
- Carro-García, L.** (2007). Análisis de poblaciones de *Micromonospora* aisladas de nódulos y de la rizosfera de *pisum sativum*. Salamanca. Tesina
- Chaintreuil, C., Giraud, E. & Prin, Y.** (2000). Photosynthetic Bradyrhizobia are natural endophytes of the african wild rice *Oryza breviligulata*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5437-5447.
- Chien, Y.** (2003). Replacement of soybean (*Glycine max*) meal by lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal in diet for juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) reared indoors. *Aquaculture Res* **3**: 1261-1268.
- Choo, Q., Samian, M. & Najimudin, N.** (2003). Phylogeny and Characterization of Three *nifH*-Homologous Genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Appl and Environ Microbiology* **69**:3658-3662
- Cole, M.A. & Elkan, G.H.** (1979). Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*, *Appl. Environ. Microbiol* **37** 867–870.
- Colwell, R. R.** (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol* **104**: 410-433.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka, E. A.** (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4951–4959, 2005
- Conn, V. M. & Franco, C. M.** (2004). Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1787–1794.
- Coombs, J. & Franco, C.** (2003). Isolation and Identification of actinobacteria from surface sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5603-5608.

- Coombs, J.T., Michelson, P.P. & Franco, M. M.** (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonist of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. *Biol. Cont.* **29**: 359-366.
- Crawford, D. L., Lynch, J.M., Whipps, J.M. & Ousley, M.A.** (1993). Isolation and Characterization of Actinomycete Antagonists of a funga Root Pathogen. *Appl Environ Microbiol* **59**: 3899-905.
- Culey, T. & Burton, J. C.** (1975). Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. *Agronomy Journal* **67**: 807-808.
- Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. & Smith, D. L.** (1997). Application of plant-growth promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* (L) Merr) increases protein and dry matter under short-season conditions. *Plant Soil* **188**: 33-41.
- De Araujo, J. M., da Silva, A. C. & Azevedo, J. L.** (2000). Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L). *Braz Arch Biol Technol* **434**: 447-451.
- Doetsch, R. N.** (1981). Determinative methods of light microscopy. In Manual of Methods for General Bacteriology, pp. 21-33. Edited by P. Gerhardt, R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg & G. B. Phillips. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Doyle, J. J.** (1998). Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in plant science reviews* **3**: 473-478.
- Elbeltagy, A. & Ando, Y.** (2008). Expression of nitrogenase gene (*NIFH*) in roots and stem of rice, *Oryza sativa*, by endophytic nitrogen-fixing communities. *Afr J Biotechnology* **7**: 1950-1957.
- El-Tarabily, K. & Soliman, M.** (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol* **49**: 573
- El-Tarabily, K.** (1997). The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non streptomycete actinomycetes. *New Phytol* **137**: 495-507.
- Epplen, C., Santos, E.J., Mäueler, W., van Helden, P. & Epplen, JT.** (1997). On simple repetitive DNA sequences and complex diseases. *Electrophoresis* **18**: 1577-85.
- Fernández-Molinero, C. R.** (2005). Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de *Lupinus angustifolius*. Salamanca. Tesina.
- Fiedler, H.P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. & Mihm, G.** (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* **87**: 37-42.
- Foster, C. M., Horner, H.T., Graves, W.R.** (1998). Nodulation response of woody Papilionoid species after inoculation with rhizobia and soil from Hawaii, Asia and North America. *Plant and Soil* **205**: 103-111.

- Fox, G.E., Wisotzkey, J.S. & Jurkshuk, P.** (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol.* **42**: 166-170.
- Gaind, Sunita., Rathi, M. S., Kaushik, B. D., Nain, Lata. & Verma, O. P.** (2007) Survival of bio-inoculants of fungicides-treated seeds of wheat, pea and chickpea and subsequent effect on chickpea yield. *J of Environ Science and Health.* **42**: 663-668
- Gladstones, J.** (1970). Lupin as crop plants. *Fields crop.* **23**: 123-148.
- Gómez, A.** (1983). Los granos de leguminosas como componentes proteicos para la alimentación animal. En: Cubero, J. I., Moreno, M. T. (eds). Leguminosas de grano. Mundi Prensa. Madrid. pp 247-262.
- Goodfellow, M.** (1989). Suprageneric classification of actinomycetes. En "Bergey's manual of systematic bacteriology". Editado por S.T. Williams, M.E. Sharpe y J.G. Holt. Williams &Wilkins, Baltimore. 2333-2339.
- Goodwin, C.M.** (2005). Investigations into Actinomycetes Isolated from Coastal Environments, with a Special Emphasis on the Genus *Micromonospora*. Cape Town. Tesis Maestria.
- Gregor, A. K., Klubek, B. & Varsa, E. C.** (2003). Identification and use of actinomycetes for enhanced nodulation of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. *Canadian J of Microbiology* **49**: 483-491.
- Grimont, F. & Grimont, P.** (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as possible taxonomic tools. *Ann Inst Pasterur Microbiol (Paris)* **137B**: 165-175.
- Gtari, M., Brusetti, M., Hassen, A., Mora, D., Daffonchio, D. & Boudabous, A.** (2007). Genetic diversity among Eleagnus compatible *Frankia* strains and sympatric-related nitrogen-fixing actinobacteria revealed by *nifH* sequence analysis. *Soil biology & Biochemistry* **39**: 372-377.
- Guillén, G. M., Valdés, J. Lian, & Hirsch, A. M.** (1993). Identificación de actinobacterias aisladas de nódulos de *Casuarina*, por técnica tradicionales y moleculares. *Rev Lat Amer Microbiol* **35**: 195-200.
- Halverson LJ, Handelsman J.** (1991). Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. *Appl Environ Microbiol.*: **57**: 2767-2770.
- Hasegawa, S., Meguro, A., Shimizu, M., Nishimura, T. & Kunoh, H.** (2006) Endophytic Actinomycetes and Their Interactions with Host Plants. *Actinomycetologica* **20**: 72-81.
- Hayakawa, M., Sadakata, T., Kihura, T. & Honomura, H.** (1991). New method for the selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *J. Ferment. Bioeng* **72**: 320-326.

- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R., Schumann, P. & Sackebrandt, E.** (2004). Cryptoendolithic Actinomycetes from Antarctic Sandstone Rock Sample: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two Isolates Related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Int Syst Appl Microbiol* **27**: 166-174.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Stanley, J. T. & Williams, S.T.** (eds) (1994). Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9th Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Maryland. USA. 532p.
- Horan, A. C. & Brodsky, B. C.** (1986). *Micromonospora Rosaria* sp. nov. nom. rev., the rosaramicin producer. *Int J Syst Bacteriol* **36**: 478-80.
- Horan, A.C. & Gullo, V. P.** (editor) (1994). Aerobic *actinomycetes*. a continuing source of novel natural products. The discovery of Natural products with therapeutic potential. Butterworth-heinemann, USA.
- Huang, H., Lv, J., Hu. Y., Fang, Z., Zhang, K. & Bao, S.** (2008). *Micromonospora rifamycinica* sp. Nov., a novel actinomycete from mangrove sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 17-20
- Huddleston, A., Cresswell, N., Neves, M., Beringer, J., Baumberg, S., Thomas, D. & Wellington, E.** (1997). Molecular detection of streptomycin-producing *Streptomycetes* in Brazilian soils. *Appl Environ Microbiol* **63**:1288-1297.
- Hungate, R. E.** (1946). Studies on cellulose fermentation. II. An anaerobic cellulose decomposing actinomycete, *Micromonospora propionici* n. sp. *J. Bacteriol* **51**: 51-56.
- Igarashi, Y Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E., Yanase, S., Miyanaga, S., Obata, T., Sakurai, H., Saiki, I., Fujita, T. & Furumai, T.** (2007). Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov. *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 3702-3705.
- Igarashi, Y., Iida, T. Yoshida, R. & Furumai, T.** (2002). Pteridic acids A and B, novel plant growth promoters with auxin-like activity from *Streptomyces hygroscopicus* TP-A0451. *J. Antibiot* **55**: 764–767.
- Ishizawa, S., Araragi, M. & Suzuki, T.** (1969). Actinomycete flora of Japanese soils III. Actinomycete flora of paddy soils. *Soil Sci Plant Nutr* **15**: 104-112.
- Jambrina, J.** (1993). Grain legumes. Cold and calcareous stress in lupin. *Issue 3*.
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L.** (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* **11**: 424-429.
- Jeanmougin, F., Thompson, J. D., Gouy, M., Higgins, D.G. & Gibson, T. J.** (1998). Multiple sequence alignment with ClustalX. *Trend. Biochem Sci* **23**: 403-405.
- Jensen, H.L.** (1932). Contributions to our knowledge of the actinomyetes. III. Further observations on the genus *Micromonospora*. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.* **57**: 173-180.

- Jones, K. L. 1949.** Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J of Bacteriolog* **57**: 141–145.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008).** *Micromonospora chaiyamhumensis* sp. nov., isolated from Thai soils. *Int J Syst and Evo Microbiol* **58**: 924- 928.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S. & Kudo, T. (2008).** *Micromonospora krabiensis* sp. nov., isolated from marine soil in Thailand. *J Gen Appl Microbiol* **54**: 127-133.
- Kasai, H., Tamura, T. & Harayama, S. (2000).** Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int J Evol Microbiol* **50**: 127-134.
- Kawamoto, I. (1989).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4. Section 28: actinoplanetes. Genus *Micromonospora*. 2442-2450.
- Kawamoto, I. Yamamoto, M. & Nara, T. (1983).** *Micromonospora olivasterospora* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* **33**: 107-112.
- Kawamoto, I., Okachi, R., Kato, H., Yamamoto, S., Takahashi, I., Takasawa, S. & Nara, T. (1974).** The antibiotic XK-41 complex. I. Production, isolation and characterization. *Journal J. Antibiot. (Tokyo)* **27**:493-501.
- Kokare, C.R., Mahadik, K.R., Kadam, S.S. & Chopade, B.A. (2004).** Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian J Mar Sc* 248-256.
- Kriss, A.E. (1939).** *Micromonospora*-an actinomycete-like organism (*Micromonospora globosa* n. sp). *Microbiol* **8**: 178-175.
- Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., & Stackebrandt, E. (2005).** Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov., *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Int J Syst Appl Microbiol* **28**: 328-39.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B. & Nei, M. (2001).** MEGA 2, moléculas evolutionary genetics análisis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- Küster, E. (1959).** Outline of a comparative study of criteria used in the characterisation of the actinomycetes. *International Bulletin of Bacteriology Nomenclature and Taxonomy* **9**: 94-104.
- Kuykendall, L. D., Saxena, B., Devine, T. E. & Udell, S. E. (1991).** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkani* sp. nov. *Can J Microbiol* **38**: 501-505.

- Kyei-Boahn, S., Slinkard, A. E. & Walley, F. L.** (2001). *Rhizobial* survival and nodulation of chickpea as influenced by fungicide seed treatment. *Can J Microbiol* **47**: 585-589
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z. & Jean S.** (2004). BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Applied Microbiology* **27**: 84-92.
- Lareo, L. R.** (1988). Acceptability parameters and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L). En: Lareo, L. R., Gónzalez (eds). Acceptability and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L). CIAT. Colombia. Pp 1-2.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. & Marinelli, F.** (2000) Rare genera of Actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Ant van Leeuwenhoek*. **78**: 399-405.
- Lechevalier, H.A.** (1964). Principles and application in aquatic microbiology. In Heukelekan and Dondero (Editors). The Actinomycetes, John Wiley & Sons, New York, 230-250.
- Lechevalier, M.P., De Bievre, C. & Lechevalier, H.A.** (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Bioch Syst and Ecology*. **5**: 249-260.
- Lee, M. D., Dunne, T.S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. & Borders, D. B.** (1987). Calichemicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calichemicin (γ II). *J Am Chem Soc* **109**: 3464-6.
- Lee, S. D., Goodfellow, M. & Hah, Y. C.** (1999). A phylogenetic analysis of the genus *Catellatospora* based on 16S ribosomal DNA sequences, including transfer of *Catellatospora matsumotoense* to the genus *Micromonospora* as *Micromonospora matsumotoense* comb. Nov. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 349-54.
- Leiva, S., Yañez, M. & Zaror, L.** (2004). Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev Med Chile* **132**: 151-9.
- Luedemann, G. M. & Casmer, C. J.** (1973). Electron microscope study of whole mounts and thin section of *Micromonospora chalcea* ATCC 12452. *Int. J. Syst. Bacteriol* **23**: 243-255.
- Luedemann, G. M. & Brodsky, B. C.** (1965). *Micromonospora carbonacea* sp. nov., an everninomicin-producing organism. *J Antimicrob. Agents Chemother.* **1964**:47-52.
- Luedemann, G. M.** (1971). *Micromonospora purpureochromogenes* (Waksman and Curtis, 1916) comb. nov. (subjective synonym: *Micromonospora fusca* Jensen, 1932). *J Int. J. Syst. Bacteriol* **21**:240-247.

- Magarvey, N.A., J.M. Keller, V. Bernan, M. Dworkin & D.H. Sherman.** (2004). Isolation and characterization of novel marine derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol* **70** :7520-7529.
- Maiese, W., Lechevalier, M. P., Lechevalier, H. A., Korshalla, J., Kuck, N., Fantini, A., Wildey, M.J., Thomas, J. & Greenstei, M.** (1989). Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics, taxonomy, fermentation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **42**: 558-63.
- Maldonado, L., Stach., J. E., Ward, A. C., Bull, A. T. & GoodFellow, M.** (2008). Characterisation of micromonosporae from aquatic environments using molecular taxonomic methods. *Ant van Leeuwenhoek* **94**: 289-298.
- Maluszynska, G. M. & Janoto-Bassalik, L.** (1974). A cellulolytic rumen bacterium *Micromonospora ruminantium* sp. Nov. *J. Gen. Microbiol.* **82**: 57-65.
- Manulis, S., Shafrir, H., Epetein, E., Lichter, A. & Barash, I.** (1994): Biosynthesis of indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. *Microbiol* **140**: 1045–1050.
- MAPA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación – España.** (2007). Producción nacional de semillas, serie histórica. <http://www.mapa.es>
- Marengo, R. A., Fernandez, N. & Mosquim, P. R.** (1993). Nodulation and Nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. *Rev Brasileira de Fisiologia Vegetal* **5**:121-126
- Meguro, A., Ohmura, Y., Hasegawa, S., Shimizu, M., Nishimura, T. & Kunoh, H.** (2006) An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. MBR-52, that accelerates emergence and elongation of plant adventitious roots. *Actinomycetologica* **20**: 1–9.
- Miller, M. S., & Pepper, I. I.** (1988). Survival of a fast-growing strain of lupin rhizobia in Sonoran desert soils. *Soil Biol Biochem* **20**: 323-327.
- Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. & Fenical, W.** (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Envirom Microbiol* **68**: 5005-5011.
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio.** (2008). Ficha de producto “Mani”. Nicaragua. <http://www.mific.gob.ni:81/>.
- Miyoshi-Saitoh, M., Morisaki, N., Tokiwa, Y., Iwasaki, S., Koishi, M., Sayito, K. & Oki T.** (1991). Dynemicins O, P and Q, novel antibiotics related to dynemicin A, isolation, characterization and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **44**: 1037-4.
- Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziak, M. & Putek, A. B.** (2001). Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azosporillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. *Soil Biol Biochim.* **33**: 457-263.

- Moulin, L. Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the β subclass of Proteobacteria. *Nature* **411**: 948-950.
- Mubarak, A.** (2001). Chemical, nutritional and sensory properties of Bread supplemented with lupin seed (*Lupinus albus*) products. *Nahrung* **45**: 241-245.
- Mylona, P., Pawlosky, K. & Bisseling, T.** (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* **7**: 869-885.
- Myrold, D. D.** (2003). Alder and lupine enhance nitrogen cycling in a degraded forest soil in Northern Sweden. *Plant soil* **254**: 47-56.
- Nalin, R., Putra, S. R., Domenach, A. M., Rohmer, M., Gourbiere, F. & Berry, A. M.** 2000. High hopanoid/total lipids ratio in *Frankia* mycelia is not related to the nitrogen status. *Microbiology* **146**: 3013-3019.
- Niner, M., Brandt, J. P., Villegas, M., Marshall, C. R., Hirsch, A. M. & Valdés, M.** (1996). Analysis of Partial Sequences of Genes Coding for 16S rRNA of Actinomycetes Isolated from *Casuarina equisetifolia* Nodules in Mexico. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3034-3036.
- Normand, P. & Bousquet, J.** (1989). Phylogeny of Nitrogenase Sequences in *Frankia* and Other Nitrogen-Fixing Microorganisms. *J Mol Evolution* **29**: 436-447.
- Omura, S.** (1992). The expanded horizon for microbial metabolites a review. *Gene* **115**: 141-149.
- Ørskov, J.** (1923). Investigations into the Morphology of the Ray Fungi. Copenhagen: Levin & Munksgaard.
- Polhill, R. M. & Raven, P. H.** (1981). Advances in legume systematics. Kew.
- Poly, F., Jocteur-Monrozier, & Bally R.** (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixer in soil. *Res Microbiol* **152**: 95-103.
- Raymond, J. Siefert, J., Staples, C. & Blankenship, R.** (2004). The Natural History of Nitrogen Fixation. *Mol Biol Evolution* **21**: 541-554.
- Ribbe, M., Gadkari, D. & Meyer, O.** (1997). N_2 fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N_2 reduction to the oxidation of superoxide produced from O_2 by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J Biol Chem* **272**: 26627-26633.
- Rigaud, J. & Puppo, A.** (1975). Indol-3-acetic catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**: 223-228.
- Rivas, R., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E.** (2005). *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of Phoenix dactylifera. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 743-746.

- Rivas, R., Sánchez, M., Trujillo, M.E., Zurdo-Piñeiro, J.L., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2003). *Xylanimonas cellulosityca* gen. nov., sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a decayed tree (*Ulmus nigra*). *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 99-103
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2004a). *Cellolomonas xylanilytica*, sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from a decayed elm tree. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:533-536
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2004b). *Agromyces ulmi* sp. nov., xylanolytic bacteria from *Ulmus nigra* in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1987-1990.
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Sánchez, M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2004d). *Micromonospora ulmi* sp. nov., a xylanolytic, phosphate-solubilizing bacterium isolated from sawdust of *Ulmus nigra*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 513-517.
- Rivas, R., Trujillo, M.E., Schumann, P., Kroppenstedt, Sánchez,M., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2004c). *Xylanibacterium ulmi* gen. nov., sp. nov., a novel xylanolytic member of the family *Promicromonosporaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 557-561.
- Robinson, K. O. & Beyene, D. A.** (2000). Variability in plant-microbe interaction between *Lupinus* lines and *Bradyrhizobium* strain. *Plant Science* **159**: 257-264
- Rodríguez-Castillo, L. y Fernández-Rojas, X. E.** (2003). Los frijoles (*Phaseolus Vulgaris*): su aporte a la dieta del costarricense. *Acta méd Costarric* **45**: 120-125
- Roselló-Mora, R. & Amann, R.** (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 39-67.
- Rosenblueth, M. & Martinez-Romero, E.** (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol Plant-Microbe Interact.* **19**: 827–837.
- Rost, T.L., M.G. Barbour, R.M. Thornton, T.E. Weir y C.R. Stocking.** (1984). Botany: A brief introduction to plant biology. John Wiley & Sons.
- Rubio, L. M. & Ludden, P. W.** (2005). Maturation of Nitrogenase: a Biochemical Puzzle . *J Bacteriol* **187**: 405-414.
- Sackin, M. J.** (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J of General Microbiol* **129**: 1743-1813.
- Sadowsky, J. J. & Graham, P. H.** (1998). Soil biology of the *Rhizobiaceae*. In *The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Edited by H. P. Spaink, A. Kondorosi, and P. J. J. Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 155-172.
- Sadowsky, M. J., Kinell L. L., Bowers, J. H. & Scholtel, J. L.** (1996). Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3489-3493.

- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**: 406-425.
- Santalla, M. (1995).** Estudio genético y evaluación de sistemas de cultivo en poblaciones de judía común de Galicia: en monocultivo y cultivo asociado con maíz. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Sardi, P., Saracchi, M., Quaroni, Q., Petrolini, B. Borgonovi, G. E., & Merli, S. (1992).** Isolation of Endophytic *Streptomyces* Strains from Surface-Sterilized Roots. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2691-2693
- Schwarzenbach K., Widmer F., & Enkerli J. (2007).** Cultivation-independent analysis of fungal genotypes in soil by using simple sequence repeat markers. *Appl Environ Microbiol* **73**:6519-25.
- Sebald, M. & Prevot, A. R. (1962).** Étude d'une nouvelle espèce anaérobie stricte *Micromonospora acetoformici* n. sp. isolée de l'intestin postérieur de *Reticulitermes lucifugus* var. *saintonnensis*. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **102**: 199-214.
- Shierlin, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* **16**: 313-340.
- Sierra, G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between Cells and Fatty acid substrates. *Ant van Leeuwenhoek J of Microbiol* **23**: 15-22
- Silvester, W. B., Harris, S. L. & Tjepkema, J. D. (1990).** Oxygen regulation and hemoglobin. In *The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, pp. 157-173. Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D. (Eds.). New York: Academic Press.
- Singh, U. & Sing, B. (1992).** Tropical grain legumes as important human foods. *Economic Botany* **46**: 310-321
- Sitter, P., Weiler, E., Kadereit, J., Bresinsky, A. & Körner, C. (2004).** Strasburger. Tratado de Botánica. Barcelona (España), Ediciones Omega.
- Skerman, V. B. D., Mc Gowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980).** Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 225-340.
- Sneath, P.H. A. & Socal, R. R. (1973).** Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman.
- Solans, M. (2007).** Discaria trinervis-Frankia symbiosis promotion by saprophytic actinomycetes. *J Basis Microbiol* **47**:243-250.
- Solovieva, N.K. & Singal, E.M. (1972).** Some data on ecology of *Micromonospora*. *Antiotiki* **17**: 387-392

- Solovieva, N.K.** (1972). Actinomycetes of littoral and sub. Littoral zones of the White Sea. *Antibiotiki* **17**: 778-781.
- Sprent, J. I. & Sprent, P.** (1990) Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects. Chapman and Hall, New York
- Sprent, J. I., Minchin, F. R. & Parsons, R.** (1993). Evolution since Knoxville: were nitrogen-fixing organisms wise to inhabit land plants? New Horizons in Nitrogen Fixation. R. Palacios, Mora, J., Newton, W. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academy Publishers: 65-76.
- Stackebrandt, E., Rainey, A. & Ward-Rainey, N.L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-91.
- Stackebrandt, E., & Schumann, P.** (2006). Introduction to the taxonomy of *Actinobacteria*. In: Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes* 3rd edn. Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. New York: Springer.
- Stahl, D.A.** (1995). Application of phylogenetically based hybridization probes to microbial ecology. *Molecular Ecology* **4**: 535-542.
- Stevenson, I.L.** (1967). Utilization of aromatic hydrocarbons by *Artheobacter* spp. *Can J of Microbiol* **13**: 205-211
- Streeter, J. G.** (1994). Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. *Can J Microbiol* **40**: 513-522.
- Streeter, J. G.** (2003). Efect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *J of Appl Microbiol* **95**: 481- 491
- Sveshnikova, M. A., Maksimova, T. S. & Kudrina, E. S.** (1969). The species of the *Micromonospora* Orskov, 1923 and their taxonomy. *Mikrobiologiya*. **38**: 883-893.
- Szabó, Z. & Fernández, C.** (1984). *Micromonospora brunnea* Sveshnikova, Madsimova, and Kudrina 1969 is a junior subjective synonym of *Micromonospora Purpureochromogenes* (Waksman and Curtis 1916) Luedemann 1971. *Int J Syst Bacteriol* **34**: 463-4.
- Taechowisan, T. Peberdy, J. F., Lumyong, S.** (2003). Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World J of Microbiology & Biotechnology* **19**: 381-385.
- Tan, R. W. & Zou, W. X.** (2001). Endophytes, a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* **18**: 448-459.
- Tautz, D.** (1989). Hypervariability of simple sequecens as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* **17**: 643-6471.

- Thawai, C., Tanasupawat, S. & Kudo, T.** (2008). *Micromonospora pattaloongensis* sp. nov., isolated from a Thai mangrove forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1516-1521.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2004). *Micromonospora aurantionigra* sp. nov., isolated from a peat swamp forest in Thailand. *Actinomycetologica* **18**: 8–14.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2005). *Micromonospora eburnea* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *Int J Syst Bacteriol* **55**: 417-422.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Itoh, T., Suwanborirux, K. & Kudo, T.** (2006). *Micromonospora siamensis* sp. nov., isolated from Thai peat swamp forest. *J. Gen. Appl. Microbiol* **51**: 229-234.
- Thawai, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K., Itoh, T. & Kudo, T.** (2007). *Micromonospora narathiwatensis* sp. nov., from Thai peat swamp forest soil. *J Gen Appl Microbiol* **53**: 287-293.
- Thompson, J. A.** (1960). Inhibition of nodule bacteria by an antibiotic from legume seed coats. *Nature London* **187**: 619-620.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997). The clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* **24**: 4876
- Todar, K.** 2004. *Todar's Online Textbook of Bacteriology. Important Groups of Prokaryotes.* Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>
- Tokala, R. K., Strap, J. L., Jung C. M., Crawford, D.L, Salove, M.H., Deobald, L. A., J., Bailey, J. F. & Morra, M.J.** (2005). Novel Plant-Microbe Rhizosphere Interaction Involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the Pea Plant (*Pisum sativum*). *Appl Environ Microbiol* **68**: 2161-2171.
- Tomita, K., Hoshino Y., Ohkusa, N. & Miyaki, T.** (1992). *Micromonospora chersina* sp. Nov. *Actinomycetol* **6**: 21-8.
- Trujillo, E. M., Willems, A., Abril, A., Planchuelo, A., Rivas, R., Ludeña, D., Mateo, P. F., Martinez-Molina, E. & Velásquez, E.** (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1318-1327.
- Trujillo, M. E., Fernandez-Molinero, C., Velásquez, E., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P., Mateos, P.F. & Martinez-Molina, E.** (2005). *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbio* **55**: 877-80.
- Trujillo, M. E. & Goodfellow, M.** (1997). Polyphasic taxonomic study of clinically significant actinomadurae including the description of *Actinomadura Latina* sp. nov. *Int J of Medical Microbiol* **285**: 212-233.

- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L. & Martínez- Molina, E.** (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2381-2385.
- Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernandez-Molinero, C., Schumann, P., & Martinez, E.** (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2799-2804
- Valdés, M., Pérez, N., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., Peña-Cabriales, J. J., Normand, P. & Hirschs, A.M.** (2005). Non-Frankia Actinomycetes Isolated from Surface-Sterilized Roots of *Casuarina equisetifolia* Fix Nitrogen. *Applied Environ Microbiol* **71**: 460-466.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. & Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**:407-438.
- Versalovic, J., Koeth, T. & Lupski, J. R.** (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**:6823-6831.
- Vieser, M. & Busse, H. J.** (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 1087-93
- Vincent, J.M.** (1970). The cultivation, isolation and maintenance of rhizobia. In a Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Edited by J. M. Vincent. Oxford: Blackwell Scientific. 1-13.
- Voysest, O.** (1993). Mejoramiento del frijol por introducción y selección. En Frijol, investigación y producción, pp. 89-107. López, M., Fernández, F., and Schoonhoven, A. (eds). CIAT.
- Watson, E.T. & Williams, S.T.** (1974). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. VII. Actinomycetes in a coastal sand belt. *Soil Biol. Biochem.* **6**: 43-52.
- Weiburg, W. C., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J.** (1991). 16S ribosomal DNA Amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol* **173**: 697-703
- Welsh, J. & McClelland, M.** (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 7213-8.
- Weyland, H.** (1969). Actinomycetes in north sea and Atlantic ocean sediments. *Nature,Lond* **223**: 858.
- Williams, J. G. K., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531-6535.
- Williams, S. T., Lanning, S. & Wellington, E. M. H.** (1983). Ecology of Actinomycetes. In The biology of actinomycetes. Edited by M. Goodfellow, M. Mordarsdi & S. T. Williams. London: Academic Press Inc. 481-528.

- Williams, S.T., Lanning, S. & Wellington, E.M.H.** (1984). Ecology of actinomycetes, p. 481-528. In M. Goodfellow, M. Mordarky and ST Williams (ed.), *The biology of the actinomycetes*. Academic Press Ltd., London, United Kingdom.
- Winding, A., Binnerup, S. J. & Pritchard, H.** (2004). Non-target effects of bacterial control agents suppressing root pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Ecol* **47**: 129–141.
- Woese, C. R. & Olsen, G. J.** (1986). Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdoms. *Syst Appl Microbiol* **7**:161-77.
- Woese, C. R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **51**: 221-71.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T.** (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**: 1-16
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. & Steward, G. F.** (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Appl Environ Microbiol* **5**: 539-554.
- Zhang, H., Kyung Lee, Y. & Zhang, W.** (2006). Culturable actinobacterias from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Ant van Leewenhoek*. **90**: 159-169.
- Zhang, Z., Schwartz, S. Wagner, L. & Miller W.** (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *J. Computational Biology* **7**: 203-214.
- Zhao, H., Kassama, Y., Young, M., Kell, D.B. & Goodacre, R.** (2004). Differentiation of *Micromonospora* isolates from a coastal sediment in Wales on the basis of fourier transform infrared spectroscopy, 16S rRNA sequence analysis, and the amplified fragment length polymorphism technique. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6619-6627.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P. & Harris, N. B.** (2002). Isolation and Characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2198-2208.

ANEXOS

ANEXO I MEDIOS DE CULTIVOS

Tabla 2.1 Medio YMA (Vincent, 1970)

Fórmula (gramos por litros)	
K ₂ HPO ₄	0,5 g.
MgSO ₄	0,2 g.
NaCl	0,1 g.
Manitol	10,0 g.
Extracto de levadura	0,2 g.
Agar	20,0 g.

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

Tabla 2.2 Medio Basal SA1 (Trujillo *et al.*, 2005)

Fórmula (gramos por litros)	
Glucosa	10 g
Extracto de levadura	3 g
Tristona	5 g
Almidón	2 g
Triptosa	2 g
CaCO ₃	0,1 g
CoCl ₂	trazas
Citrato de Hierro	trazas
Agar	18 g

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

Tabla 2.3 Medio Avena (Küster, 1959)

Formula (para un litro)	
Avena	20 g
Solución de sales*	1 ml
Agar	18 g
Agua destilada	1000 ml
pH 7.2	

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

* Solución patrón de sales según Shierlin and Gottlieb, 1966 (Anexo II, Tabla 2.11).

Tabla 2.4. Medio Bennett's (Jones, 1949)

Fórmula (gramos por litros)	
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	2 g
Glucosa	10 g
Almidón	0,1 g
Triptosa	2 g
CaCO ₃	0,1 g
CoCl ₂	trazas
Citrato de hierro amónico	trazas
Agar	18 g

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

Tabla 2.5 Medio M65 (Shirling & Gottlieb, 1966)

Fórmula (gramos por litros)	
Glucosa	4 g
Extracto de levadura	4 g
Extracto de malta	10 g
CaCO ₃ *	2 g
Agar	18 g

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

* El CaCO₃ no se debe adicionar en caso de preparar medio líquido.

Tabla 2.6. Medio libre de Carbono (Stevenson, 1967)

1. Disolución de azúcar o aminoácido en agua destilada esterilizadas tres veces por tindalización a 100 °C durante 20 minutos.	
2. Preparar Yeast Nitrogen Base (6.7 g/L) en agua destilada estéril, y esterilizada por filtración.	
3. Disolución de sales,	Agar 18 g
	KH ₂ SO ₄ 0.5 g
	MgSO ₄ 0.5 g
	Agua destilada 1L
Disolución de sales esterilizada en autoclave a 120 °C durante 20 minutos	
La disolución de cada fuente de carbono se une a las alícuotas correspondientes de las disoluciones 2 y 3, en campana de flujo laminar.	

Tabla 2.7. Medio Base (Williams, 1983)

Formula (gramos por litro)	
Citrato amónico-férrico	0,5 g
Extracto de levadura	3 g
Agar	7,5 g
pH 7.2	

Tabla 2.8. Caldo de UREA (Fluka® Germany)

Fórmula (en gramos por litro)	
Urea	20.0
Fosfato monopotásico	9.1
Fosfato disódico	9.5
Extracto de levadura	0.1
Rojo fenol	0.01
pH final 6.8±0.2	

Tabla 2.9. Medio Basal para Tween (Sierra, 1957)

Fórmula (en gramos por litro)	
Bacto Peptona	10 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Cloruro de Calcio	0.1 g
Agar	15 g
pH 7.4	

Se esteriliza en autoclave durante 15 min a 15 psi de presión (115 °C).

Tabla 2.10. Azúcares y Aminoácidos evaluados como fuentes de carbono.

FUENTES DE CARBONO			
Sustancia	Concentración final (%) p/v	Sustancia	Concentración final (%) p/v
Alanina	0.1	Melobiosa	1
Almidón	1	Prolina	0.1
Arabinosa	1	Rafinosa	1
Arginina	0.1	Ramnosa	1
Celobiosa	1	Sacarosa	1
Fructosa	1	Salicina	1
Galactosa	1	Serina	1
Gluconato sódico	1	Sorbitol	1
Glucosa	1	Sorbosa	1
Histidina	0.1	Tirosina	0.1
Lisina	0.1	Trehalosa	1
Maltosa	1	Valina	0.1
Manosa	1	Xilitol	1
Melecitosa	1	Xilosa	1

ANEXO II SOLUCIONES

Tabla 2.11. Solución patrón de sales (Shierlin and Gottieb, 1966)

Fórmula (gramos por litros)	
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.1 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0.1 g
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.1 g

Se esteriliza en autoclave durante 20 min a 15 psi de presión (121°C).

Tabla 2.12. Soluciones Tampones

2.1- Solución tampón ácido cítrico - hidrogenofosfato disodio.

Se mezclaron en las cantidades a continuación indicadas según el pH deseado, y la mezcla se vierte sobre 100 ml de medio estéril de SA1 a doble concentración.

pH	X ml de ácido cítrico	Y ml de Na ₂ HPO ₄
4,5	54,6	45,4
5,5	43,1	56,9

2.2- Solución tampón de Tris (hidroximetil) aminometano

Cincuenta mililitros de Tris se añadieron a los ml indicados de HCl según el pH deseado, se diluye hasta 100 ml con agua esteril, se mezcla y se vierte sobre 100 ml de medio estéril de SA1 a doble concentración.

pH	X ml HCl
8	29,2
9	0,2

Las soluciones de ácido cítrico 0,2M (monohidratado), Na₂HPO₄ 0,4M (deshidratado), Tris 0,2M y HCl 0,2M se esterilizaron en autoclave durante 15' a 121°C.

Tabla 2.13. Solución de HgCl₂

Formula (mililitro)	
Cloruro de Mercurio	12.5 ml
Acido Clohidrico	16.8 ml
Agua destilada	83.2 ml

Tabla 2.14. Solución Tampón TBE para Electroforesis del ADN, PCR-Microsatelite y PCR-BOX

Reactivo	Concentración	Cantidades
Tris (Fluka®)	100 mM	12,11 g
Bórico (H ₃ BO ₃) (Fluka®)	83 mM	5,13 g
EDTA (sal sódica) (Fluka®)	1 mM	0,37 g
Agua c.s.p.		1,00 L

Tabla 3.3. Solución Rigaud & Puppo (1975)

Fórmula (gramos por litros)	
KH ₂ PO ₄	0,200 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,200 g
KCL	0,200 g
EDTA Fe Na ₂	0,025 g
Na ₂ Mo ₄	0,004 g
H ₃ BO ₃	0,018 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,020 g
ZnSO ₄	0,030 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,002 g
Agua destilada c.s.p.	1,000 l

ANEXO III REACTIVOS DE PCR

Tabla 2.15. Reactivos y cantidad para PCR-MICROSATELITE para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer CSM 13 (20 μ M)	1 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	6 μ l
ADN (100-150ng)	1 μ l

Los reactivos de la PCR son los incluidos en el kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®].

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución)

Tabla 2.16. Reactivos y cantidad para BOX-PCR para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer BOX ARI (20 μ M)	2.5 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	4.5 μ l
ADN molde (100-150ng)	1 μ l

“REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®] contiene el magnesio, el tampón, los dNTPs y la *Taq* polimerasa.

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución).

Tabla 2.17. Reactivos y cantidad para PCR-16S para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REDEExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer SF1 (20 μ M)	0.5 μ l
Primer SR5 (20 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	5.0 μ l
ADN molde (100-150ng)	2 μ l

Los reactivos de la PCR son los incluidos en el kit “REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®]

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REDEExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución)

Tabla 3.1. Reactivos y cantidad para la amplificación del segmento 1.2 Kb para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer IGK (20 μ M)	0.5 μ l
Primer NDR-1 (20 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	5.0 μ l
ADN molde (100-150ng)	2 μ l

Los reactivos de la PCR son los incluidos en el kit “REExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®]

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución)

Tabla 3.2. Reactivos y cantidad para la amplificación del segmento 454 pb para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer POLF (20 μ M)	0.5 μ l
Primer POLR (20 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	5.0 μ l
ADN molde (100-150ng)	2 μ l

Los reactivos de la PCR son los incluidos en el kit “REExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®]

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución)

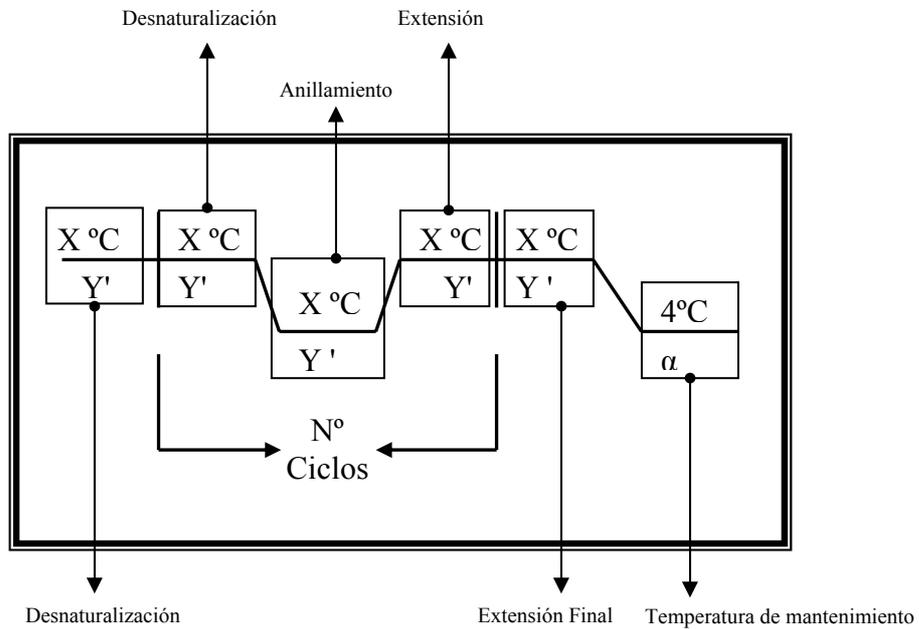
Tabla 4.2. Reactivos y cantidad para la amplificación del segmento 348 pb para un volumen total de 20 μ l

Reactivo (concentración inicial)	Volumen por reacción de PCR
REDExtract-N-Amp PCR ReadyMix	10 μ l
Solución A:B	2 μ l
Primer ELA1 (20 μ M)	0.5 μ l
Primer POLR (20 μ M)	0.5 μ l
H ₂ O mili-Q estéril	5.0 μ l
ADN molde (100-150ng)	2 μ l

Los reactivos de la PCR son los incluidos en el kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” de SIGMA[®]

La Solución A:B contiene la mezcla 1:1 de los reactivos de extracción de ADN incluidos en el Kit “REDExtract-N-Amp Plant PCR Kit” (Solución de Extracción: Solución de dilución)

ANEXO IV CONDICIONES DE PCR



Esquema de la temperatura usada ($X^\circ\text{C}$), los minutos (Y') y el número de ciclos (N°) para las diferentes fases de la PCR.

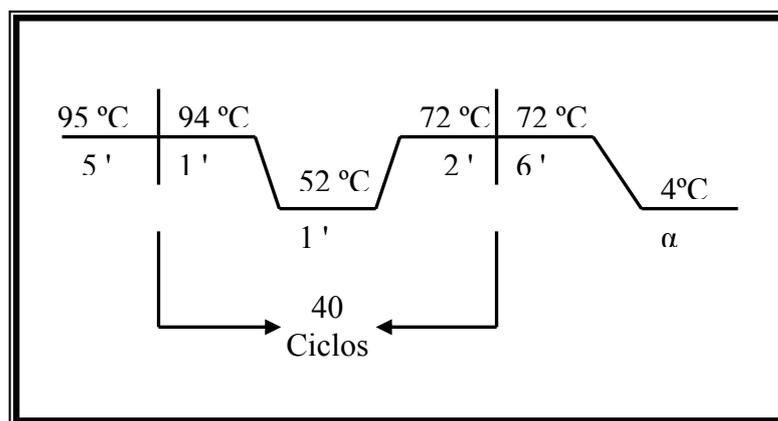


Fig. 2.3. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación de perfiles de PCR-Microsatélites

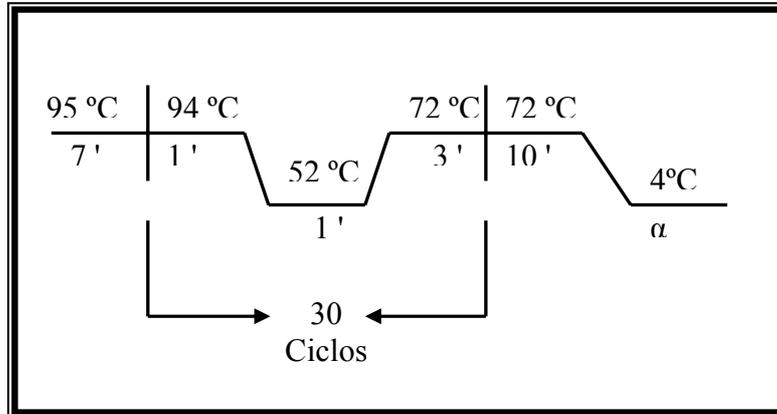


Fig. 2.4. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación de perfiles de BOX-PCR

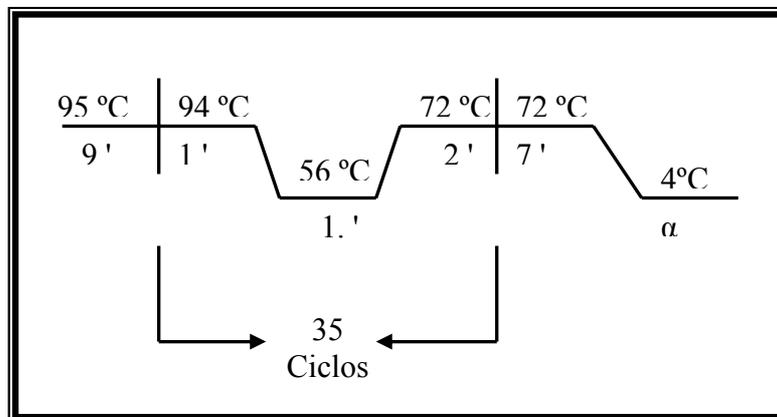


Fig. 2.5. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación del gen que codifica para el RNA 16S.

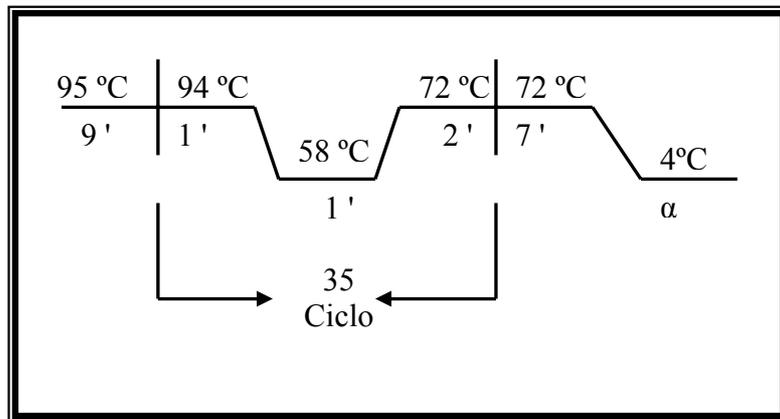


Fig. 3.1. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación del segmento 1.2 Kb del gen *nifH*.

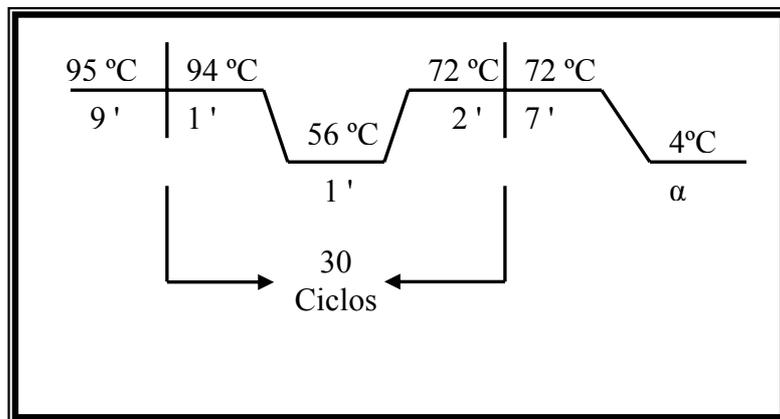


Fig. 3.2. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación del segmento 454 pb del gen *nifH*.

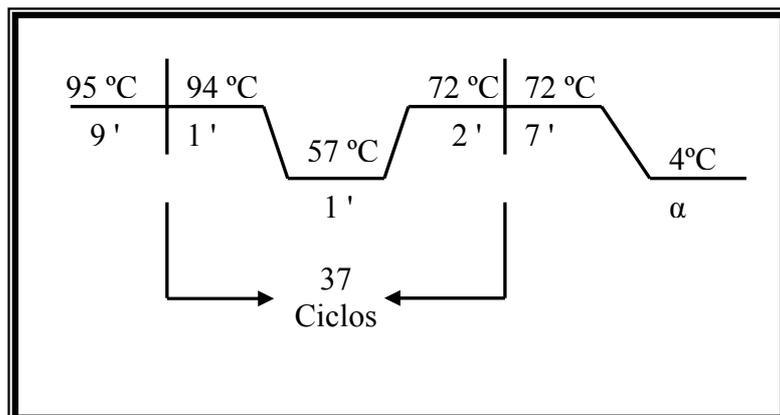


Fig. 4.1. Esquema de las condiciones de PCR para la amplificación del segmento de 348 pb del gen *nifH*